



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Carrica, Mariela del Carmen

Caracterización estructural y funcional del factor de virulencia *iivA* de *Brucella abortus*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Carrica, M. del C. (2008). *Caracterización estructural y funcional del factor de virulencia *iivA* de *Brucella abortus*. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/139>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Caracterización estructural y funcional del factor de virulencia livA de *Brucella abortus*

TESIS DOCTORAL

Mariela del Carmen Carrica

carricamariela@yahoo.com.ar

Resumen

Brucella spp. son patógenos intracelulares facultativos pertenecientes al grupo de las α -2-proteobacterias. Estas bacterias son el agente etiológico de una enfermedad zoonótica, llamada brucelosis, que infecta tanto a animales domésticos y salvajes, como al humano.

Si bien, *Brucella spp.* no posee factores de virulencia clásicos, mediante técnicas de biología molecular se han identificado numerosas proteínas involucradas en el establecimiento de su virulencia. Estas moléculas frecuentemente están implicadas en la infección, multiplicación y establecimiento del nicho intracelular de la bacteria.

En nuestro laboratorio se ha determinado que la mutación *knockout* del ORF BAB1_1543 de *Brucella abortus* cepa 2308 afecta drásticamente la virulencia de la misma en ratones BALB/c. Mediante la complementación en *trans* de dicha cepa mutante con BAB1_1543 salvaje se restaura la virulencia bacteriana a los niveles de la cepa parental. A la proteína codificada por el ORF BAB1_1543 se la denominó livA y la misma pertenece a un grupo de proteínas ortólogas, el COG 2960, conservado en más de 200 proteobacterias.

A pesar de que livA esta altamente conservada en proteobacterias no se ha identificado su función en ninguna de ellas y el mecanismo por el cual esta proteína contribuye a la virulencia de *Brucella spp.* se desconoce.

Teniendo presentes los datos anteriormente mencionados, el objetivo de este trabajo de tesis es caracterizar estructural y bioquímicamente la proteína livA, con el fin de contribuir al entendimiento de su función, y establecer si otras proteínas del COG 2960 también están involucradas en la virulencia bacteriana.

Mediante el uso de técnicas biofísicas se determinó que livA es una proteína trimérica, que posee dos dominios estructurales: un dominio C-terminal α -hélice *coiled-coil*, a través del cual la proteína oligomeriza y un dominio N-terminal que se encuentra desestructurado a pH neutro y es capaz de formar una α -hélice anfipática en diferentes condiciones. Por otro lado se identificó que livA interacciona con vesículas fosfolipídicas, lo que conlleva a un cambio estructural de la proteína, dando lugar a la formación de una α -hélice anfipática en el dominio N-terminal.

La estructura de livA es característica de proteínas involucradas en la fusión de membranas biológicas, por lo que se decidió ensayar la actividad fusogénica de la proteína en membranas fosfolipídicas

modelos. De este modo se encontró que livA es capaz de fusionar membranas, tanto a pH neutro como a pH ácido. Además, se identificó que para que se produzca eficientemente la fusión de membranas es necesaria la proteína en su totalidad, dado que los dominios de livA por separado no tienen actividad fusogénica o su actividad es mínima.

Por otro lado, se caracterizó a la proteína ortóloga a livA de *Salmonella typhimurium*: YqiC. Se eligió la γ -proteobacteria *S. typhimurium*, como un miembro representativo del COG 2960, debido a que, al igual que *Brucella spp.*, es un patógeno intracelular facultativo ampliamente estudiado. De este modo se encontró que las características estructurales y la capacidad de interactuar con membranas fosfolípicas y producir la fusión de las mismas son conservadas entre livA e YqiC. Por último se realizó la mutación *knockout* del gen *yqiC* en *S. typhimurium* y se analizó el fenotipo de la cepa mutante. Al igual que lo que sucede con la inactivación del gen *iivA* de *Brucella spp.*, la inactivación del gen *yqiC*, disminuye drásticamente la virulencia de *S. typhimurium*, además de disminuir la resistencia a temperaturas elevadas.

Si bien son necesarias futuras investigaciones para establecer la función biológica y el mecanismo específico por el cual las proteínas livA e YqiC contribuyen a la virulencia de *B. abortus* y *S. typhimurium* respectivamente, en este trabajo de tesis se aportan los primeros datos que contribuirán a elucidar la función de un grupo de proteínas ortólogas no caracterizado hasta el momento.

Agradecimientos

A Patricio Craig de la Fundación Instituto Leloir, que me enseñó muchísimo y que siempre me ayudó desinteresadamente.

A mis compañeros de trabajo del grupo de Brucelosis del Instituto de Biotecnología del INTA: Silvio Cravero, Julia Sabio y García, Alicia Arese, Eleonora Campos, Haydee Gil y Marcos Trangoni.

A mi director y co-director de tesis: Osvaldo Rossetti y Mario Ermácora.

Al Dr. Fernando Goldbaum y su grupo de trabajo de la Fundación Instituto Leloir que colaboraron ampliamente con mi proyecto de tesis, me permitieron trabajar en su laboratorio y finalmente me incorporaron a él para realizar mi post-doctorado.

A la Dra. Silvia Alonso y su grupo de la Universidad Nacional de Quilmes que me enseñaron a hacer liposomas y me prestaron lípidos y aparatos.

A Fabiana Bigi del grupo de tuberculosis del INTA por leer mi tesis y hacer muy buenos comentarios.

Al CONICET y la SECyT por el sustento económico.

Al grupo de tuberculosis, mi segundo grupo de trabajo en el instituto de Biotecnología, por las charlas, por prestarme material de trabajo cuando se terminaba el de mi grupo y por los mates que tomamos a la tarde.

Al grupo de hemoparásitos, por los mates con galletitas y por la buena onda de siempre.

A toda la gente del instituto de Biotecnología (virólogos, plantólogos, hemoparásitos, tuberculosos, brucelosos, técnicos, personal del lavadero, personal del bioterio, secretarias y recepcionistas) por tener siempre buena onda y estar predispuestos a colaborar para solucionar los problemas cotidianos que surgen cuando uno hace sus experimentos.

Y finalmente, aunque no menos importante, a todas las personas que me quieren y siempre estuvieron conmigo: mi familia (mi mamá, mi papá, mis hermanas y mis tíos/as), mis amigas de siempre (Dani, Nati, Kari, Vani, Mel, Leti, Pili, Marina, Ele, Mariana y Nati2), a mi novio Hernán y a mis mascotas que me entretienen mientras escribo (Sofi y Damián).

Abreviaturas

AT: Agar triptosa

BCA: Ácido bicinconínico

BCV: Vacuolas conteniendo Brucella (Brucella-containing vacuole)

BSA: Seroalbúmina bovina

BTH: Doble híbrido bacteriano (Bacterial two hybrid)

CD: Dicroísmo circular (circular dichroism)

Cm: Cloranfenicol

CMC: Concentración micelar crítica

COG: Grupo de proteínas ortólogas (Cluster of Orthologous Groups)

CyaA: Adenilato ciclasa de Bordetella pertussis

Da: Dalton

DL50: Dosis letal 50

DLS: Dispersión de la luz dinámica (Dynamic light scattering)

dNTP: Deoxi-nucleotidos

DO: Densidad óptica

DPA: Dipicolinato de sodio

DPPA: L- α -di-palmitoil ácido fosfatídico

DPPC: L- α -di-palmitoil fosfatidil colina

EDTA: Ácido etilén diamino tetracético

EGS: Etilen-glicol bis-(succinimidilsuccinato)

FRET: Transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia.

HA: Hemaglutinina

IPTG: Isopropil- β -D-thiogalactósido

KDa: Kilo dalton

Km: Kanamicina

LB: Medio Luria-Bertani

LPS: Lipopolisacárido

LUV: Vesículas unilamelares grandes (Large Unilamellar Vesicles)

moi: Multiplicidad de infección

NBD: N-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl

Ni-NTA: Niquel-nitrilotriacetic acid

NSF: Ethylmaleimide-sensitive factor

ONPG: O-nitrofenol β -D-galactopiranosido

PAGE-SDS: Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

PBS: Buffer fosfato salino (saline phosphate buffer)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)

PI: Punto isoeléctrico

PM: Peso molecular

PMSF: Phenylmethylsulphonyl fluoride

PTF: Toxinas formadoras de poros (Pore Toxin forming)

PVDF: Polyvinylidene fluoride

RE: Retículo endoplasmático

Rho: N-lissamine rhodamine

RMN: Resonancia magnética nuclear

rpm: Revoluciones por minuto

SCV: Vacuolas conteniendo Salmonella (Salmonella-containing vacuole)

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

SNARE: Soluble NSF attachment protein receptor

SPI: Isla de patogenicidad de Salmonella (Salmonella pathogenicity island)

SST3: Sistema de secreción tipo 3

SUV: Vesículas unilamelares pequeñas (Small Unilamellar Vesicle) SUV-PA:PC: SUV compuestas de 25% de DPPA y 75% de DPPC

SUV-PC: SUV compuestas solamente de DPPC

T18: Fragmento de CyaA que contiene los aminoácidos 225 a 399

T25: Fragmento de CyaA que contiene los aminoácidos 1 a 224

TAE: Buffer Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM pH 8

TFA: Acido trifluoro acético

T_m: Temperatura de melting

TSB: Medio de tripticasa de soja (Tryptic Soy Broth)

UFC: Unidades formadoras de colonia

UV: Luz ultra-violeta

Zip: Región de cierre de leucina de la proteína GCN4

Indice

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. La Brucelosis
2. El genero Brucella
3. Virulencia de Brucella
 - 3.1. Invasión y tráfico intracelular
 - 3.2. Factores de virulencia
 - 3.2. a. Lipopolisacarido
 - 3.2. b. Glucanos β (1,2) cíclicos
 - 3.2. c. Sistema de secreción tipo IV
 - 3.2. d. Sistema de dos componentes bvrR-bvrS
 - 3.2. e. BacA
 - 3.2. f. cydB
 - 3.2. g. Proteínas de respuesta a estrés
 - 3.2. h. Proteínas de membrana externa
 - 3.2. i. Lipoproteínas
 - 3.2. j. Genes flagelares
4. Antecedentes en que se basa este trabajo

BIBLIOGRAFÍA

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

CAPITULO 1

Caracterización estructural y bioquímica de la proteína livA de Brucella abortus

INTRODUCCION

- 1.1. Estructuras Coiled-coil
- 1.2. Predicción de coiled-coil a partir de la secuencia proteica
 - 1.2. a. Coils
 - 1.2. b. Paircoil

- 1.2. c. Multicoil
- 1.3. Proteínas coiled-coil triméricas
 - 1.3. a. Proteínas coiled-coil triméricas en eucariotas
 - 1.3. b. Proteínas coiled-coil triméricas en procariontas
 - 1.3. c. Proteínas coiled-coil triméricas virales
- 1.4. Proteínas intrínsecamente no estructuradas

MATERIALES Y METODOS

- 1.1. Herramientas de bioinformática
- 1.2. Cepas bacterianas y medios de cultivos
- 1.3. Preparación de células competentes y transformación
- 1.4. Metodología de ADN recombinante
 - 1.4. a. Aislamiento de plásmidos
 - 1.4. b. Utilización de enzimas de restricción y modificantes
 - 1.4. c. Electroforesis en geles de agarosa
 - 1.4. d. Aislamiento de los fragmentos de interés de geles de agarosa
 - 1.4. e. Ligación
 - 1.4. g. Reacción en cadena de la polimerasa
- 1.5. Obtención de las proteínas livA, livA-N e livA-C
 - 1.5. a. Clonado en los vectores de expresión para E. coli
 - 1.5. b. Expresión en E. coli y purificación de las proteínas recombinantes
 - 1.5. c. Cuantificación de las proteínas
 - 1.5. d. Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida
 - 1.5. e. Tinción con azul de coomassie
 - 1.5. f. Identificación de proteínas mediante western-blot
- 1.6. Ensayo de doble híbrido bacteriano
- 1.7. Ensayo de actividad β -galactosidasa
- 1.8. Cross-linking químico
- 1.9. Determinación del peso molecular de proteínas por light scattering estático
- 1.10. Proteólisis limitada

1.11 Espectroscopia de dicroísmo circular

1.12. Generación de suero policlonal dirigido contra livA

1.13. Determinación de la localización subcelular de livA en Brucella abortus

RESULTADOS

1.1. Análisis bioinformático

1.2. Estudio de la interacción de livA consigo misma y del estado de oligomerización

1.3. Análisis de los dominios estructurales de livA por proteolisis limitada

1.4. Estructura secundaria de livA y sus dominios

1.5. Inducción de estructura secundaria en diferentes condiciones

1.5. a. Efecto del pH

1.5. b. Efecto de diferentes sales

1.5. c. Efecto del detergente dodecil sulfato de sodio

1.6. Determinación de la localización subcelular de livA en B. abortus

DISCUSIÓN

BIBLIOGRAFÍA

CAPITULO 2

Interacción y capacidad fusogénica de livA con membranas fosfolipídicas

INTRODUCCIÓN

2.1. Membranas biológicas

2.2 Membranas modelos

2.3. Proteínas que interaccionan con membrana

2.3.1. Toxinas bacteriales formadoras de poros

2.3.2. Péptidos antimicrobianos

2.4. Fusión de membranas

2.4.1. Proteínas fusogénicas celulares

2.4.2. Proteínas Fusogénicas virales

2.4.3. Proteínas fusogénicas bacterianas

2.4.4. Péptidos fusogénicos sintéticos

MATERIALES Y METODOS

- 2.1. Construcción de las mutantes de livA con residuos de triptofano
- 2.2. Preparación de las vesículas
- 2.3. Fluorescencia intrínseca del triptofano
- 2.4. Cromatografía de filtración molecular
- 2.5. Proteólisis limitada en presencia de vesículas
- 2.6. Producción de livA sin fusión a histidina
- 2.7. Ensayos de turbidez
- 2.8. Medidas del diámetro de liposomas por light scattering dinámico
- 2.9. Ensayos de fusión de liposomas
 - 2.9. a. Ensayo de mezclado de la bicapa lipídica
 - 2.9. b. Ensayo de mezclado del contenido acuoso de liposomas

RESULTADOS

- 2.1. Estudio de la interacción de livA con membranas
- 2.2. Inducción de estructura secundaria en presencia de membranas lipídicas
- 2.3. Estudio de la capacidad fusogénica de livA

DISCUSIÓN

BIBLIOGRAFÍA

CAPITULO 3

Identificación de los aminoácidos esenciales para la estructura y función de livA.

INTRODUCCIÓN

MATERIALES Y METODOS

- 3.1. Construcción de la proteína livA- Δ M
- 3.2. Construcción de los derivados de livA, llevando mutaciones puntuales, en un vector replicativo para *Brucella* spp.
- 3.3. Condiciones de crecimiento de las cepas de *Brucella*
- 3.4. Preparación de *Brucella abortus* iivA::Km electrocompetentes
- 3.5. Transformación de los vectores conteniendo las mutaciones
- 3.6. Análisis de la expresión de las proteínas mutantes en *Brucella abortus*
- 3.7. Ensayos de supervivencia en ratones BALB/c

RESULTADOS

3.1. Análisis estructural de livA- Δ M

3.2. Estudio de la capacidad fusogénica de livA- Δ M

3.3. Identificación de los aminoácidos esenciales para la función de livA

DISCUSIÓN

BIBLIOGRAFÍA

CAPITULO 4

Caracterización de la proteína YqiC de *Salmonella typhimurium* y construcción y evaluación de una cepa deficiente en la misma

INTRODUCCIÓN

4.1. El genero *Salmonella*

4.2. La Salmonelosis

4.3. Infección y replicación intracelular

4.4. Factores de virulencia

4.4. a. Factores de virulencia que forman estructuras superficiales

4.4. b. Islas de patogenicidad

4.4. c. Islotes de patogenicidad y genes aislados

4.4. d. Plasmidos de virulencia

4.5 Modelos de experimentación animal

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Clonado del gen yqiC con fusión a histidina

4.2. Expresión y purificación de la proteína YqiC recombinante

4.3. Caracterización estructural y análisis de la capacidad fusogénica de YqiC

4.4. Generación de suero policlonal dirigido contra YqiC

4.5. Cepas bacterianas y medios de cultivos

4.6. Preparación de células competentes y transformación

4.7. Construcción de una cepa de *S. typhimurium* mutante en el gen yqiC

4.8. Complementación de *S. typhimurium* yqiC::cm con yqiC salvaje

4.9. Ensayos de virulencia en ratones BALB/c

4.10. Curvas de crecimiento bacteriano

4.11. Infección y replicación intracelular

RESULTADOS

4.1. Análisis bioinformático

4.2. Caracterización estructural

4.3. Estudio de la capacidad fusogénica de YqiC

4.4. Construcción y evaluación de la virulencia de una cepa de *Salmonella typhimurium* deficiente en YqiC

4.5. Estudio del comportamiento in vitro de *S. typhimurium* mutante en yqiC

4.6. Estudio de la replicación intracelular de *S. typhimurium* yqiC::cm

DISCUSIÓN

BIBLIOGRAFIA

CONCLUSIÓN GENERAL



Introducción general

1. La Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infecciosa zoonótica causada por bacterias del género *Brucella*, que afecta a una gran variedad de mamíferos, como bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, perros e inclusive al humano.

En los animales la fuente principal de infección son las placentas, los fetos abortados y las secreciones vaginales que contienen una elevada carga bacteriana. La vía de infección más frecuente es el tracto gastrointestinal, aunque también puede producirse por aerosoles y el uso de semen contaminado en las inseminaciones artificiales. Los síntomas generales que produce la enfermedad son placentitis y aborto en hembras preñadas y aumento del tamaño de los testículos (orquitis) y esterilidad en los machos (Nicoletti, Lenk et al. 1989; Corbel 1997).

En humanos, históricamente la enfermedad ha recibido varios nombres, como fiebre del Mediterráneo, fiebre de Gibraltar, fiebre de Malta y fiebre ondulante. La transmisión de la bacteria ocurre por el contacto con animales o productos animales infectados o por exposición en el ambiente laboral a través de aerosoles o heridas en la piel. El periodo de incubación de la enfermedad es de 2 a 4 semanas, aunque ocasionalmente puede prolongarse por varios meses. La sintomatología general es diversa y presenta varios estadios. El primer estadio de la enfermedad o fase aguda, que resulta en la diseminación septicémica de la bacteria, se caracteriza por la presencia de fiebre elevada continua o

intermitente, sudores profusos y decaimiento general. Esta etapa puede durar de dos a cuatro meses si no se inicia el tratamiento con antibióticos. Luego de varios meses e inclusive años posteriores a la fase aguda, puede desarrollarse una etapa crónica de la enfermedad, cuya sintomatología es difusa. En esta etapa son frecuentes las complicaciones osteoarticulares, la endocarditis, los abscesos hepatoesplénicos y ocasionalmente la aparición de desordenes neurológicos (Smith and Ficht 1990).

Debido a que el humano y una gran variedad de animales domésticos y salvajes son susceptibles a la infección por *Brucella spp.*, la brucelosis es una de las zoonosis más ampliamente distribuidas en el mundo. Las áreas más afectadas por dicha enfermedad son Europa (en especial los países mediterráneos), medio oriente, América y en menor medida África y el lejano oriente. Los únicos países en que se ha erradicado totalmente la enfermedad son Canadá, Australia y Nueva Zelanda (Cosivi and Corbel 1998).

En Argentina, en donde el sector agropecuario cumple un papel importante en la economía del país, las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad (principalmente por infección del ganado bovino con *Brucella abortus*) son de aproximadamente 60 millones de dólares por año (SENASA, 2000).

2. El genero *Brucella*

Las bacterias del genero *Brucella* son cocobacilos Gram negativos, pequeños, sin presencia de flagelos y no formadores de esporas. Pertenecen a la subdivisión α -2 de las proteobacterias junto con *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Ochobactrum*, *Rickettsia* y *Rhodobacter*. Todas estas bacterias establecen una interacción íntima con las células eucariotas, ya sea como patógenos o como simbioses (Moreno, Stackebrandt et al. 1990; Jumas-Bilak, Michaux-Charachon et al. 1998).

Si bien *Brucella spp.* puede sobrevivir en el medio ambiente por un período variable, su multiplicación se produce solo dentro de las células del animal hospedador, por lo que se la considera un parásito intracelular facultativo (Moreno and Moriyon 2002; Kohler, Michaux-Charachon et al. 2003).

Brucella spp., al igual que otras bacterias Gram negativas, posee una pared celular compuesta por membrana interna y externa que encierra un espacio periplásmico con una malla de péptido glicano y componentes solubles. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de las bacterias Gram negativas, la membrana externa de *Brucella spp.* es altamente hidrofóbica, resistente a péptidos catiónicos y a detergentes (Martinez de Tejada, Pizarro-Cerda et al. 1995). La membrana externa está compuesta por fosfolípidos, lipopolisacáridos (LPS) y proteínas características (Moriyon and Lopez-Goni 1998). La estructura del LPS determina si una cepa es lisa (S-LPS) o rugosa (R-LPS), siendo la diferencia entre ambas

la presencia o no del antígeno O en el LPS.

La clasificación actual del género *Brucella* las divide en seis especies, que comparten más de un 95% de homología a nivel nucleotídico (Verger, Grimont et al. 1987). Las especies se nombraron según el hospedador del que fueron aisladas originalmente y por el que tienen preferencia y son: *B. melitensis* (aislada de cabras), *B. abortus* (aislada de bovinos), *B. suis* (aislada de cerdos), *B. neotomae* (aislada de un tipo de rata del desierto), *B. ovis* (aislada de ovejas) y *B. canis* (aislada de perros). Si bien cada especie de *Brucella* tiene su hospedador natural, al cual infectan más eficientemente, pueden potencialmente ser transmitidas a otras especies animales susceptibles. Posteriormente, se ha reportado el aislamiento de una nueva especie de *Brucella* a partir de mamíferos marinos a la que se propuso darle el nombre de *B. maris* o *B. delphinii* (Broughton and Jahans 1997; Jahans, Foster et al. 1997; Miller, Adams et al. 1999).

Hasta el momento se ha secuenciado el genoma de tres especies lisas de *Brucella*: *B. melitensis* 16M (NC 003317/18) (DelVecchio, Kapatral et al. 2002), *B. suis* 1330 (NC 004310/11) (Paulsen, Seshadri et al. 2002) y dos cepas de *B. abortus*: *B. abortus* biovar 1 9-941 (NC 006932/33) y *B. melitensis* biovar *abortus* 2308 (NC007618/24) (Chain, Comerci et al. 2005; Halling, Peterson-Burch et al. 2005). Recientemente (4-6-2007) se ha depositado en *Gen Bank* la secuencia completa de la primera cepa de *Brucella* rugosa secuenciada: *B. ovis* ATCC 25840 (NC 009504/5).

El tamaño promedio de los genomas de las especies de *Brucella* es de 3.29 Mb, distribuido en dos cromosomas circulares de 2.12 Mb y de 1.18 Mb con 57% de contenido de GC. Ambos replicones codifican para funciones metabólicas y replicativas esenciales por lo que son cromosomas y no plásmidos.

3. Virulencia de *Brucella*

Mediante el análisis de los genomas secuenciados de *Brucella spp.* no se han encontrado factores de virulencia clásicos, como exotoxinas, citolisinas, cápsulas, fimbrias, flagelos, formas de resistencia o variación antigénica. Incluso el lipopolisacárido de *Brucella spp.* posee menor actividad endotóxica que el hallado en otras bacterias Gram negativas (Moreno, Speth et al. 1981). La virulencia de *Brucella spp.* reside principalmente en su habilidad para invadir, sobrevivir y replicarse dentro de células fagocíticas profesionales o no profesionales, siendo el macrófago la principal célula blanco (Gorvel and Moreno 2002). Por el hecho de que la bacteria establece una íntima relación con su hospedador causando el menor daño posible, *Brucella spp.* se asemeja más a un endosimbionte que a un patógeno clásico (Ugalde 1999).

3.1. Invasión y tráfico intracelular

La entrada de *Brucella spp.* en la célula eucariota se produce en dominios especializados de la membrana plasmática llamados “*lipid rafts*”. Se postula que la internalización de la bacteria se da por un proceso de fagocitosis mediado por receptor llamado “*membrana ruffling*” (Naroeni and Porte 2002; Watarai, Makino et al. 2002a; Watarai, Makino et al. 2002b). Los dominios “*lipid raft*” se caracterizan por ser ricos en colesterol, esfingolípidos, gangliósidos GM1 y proteínas asociadas a membrana por glicosilfosfatidilinositol.

Un camino alternativo para la internalización de *Brucella spp.* en la célula hospedadora es a través de receptores Fc. Este proceso, que es más frecuente en las cepas rugosas, se da cuando las bacterias son previamente opsonizadas por el sistema del complemento. Las bacterias internalizadas por este mecanismo son eliminadas más rápidamente del organismo que las que utilizan los dominios “*lipid raft*”(Gorvel and Moreno 2002).

El tráfico intracelular de *Brucella spp.* se ha estudiado tanto en células fagocíticas profesionales como no profesionales, observándose que los mecanismos que utiliza la bacteria para controlar su supervivencia y replicación intracelular son similares en ambos tipos celulares (Detilleux, Deyoe et al. 1990; Pizarro-Cerda, Meresse et al. 1998; Pizarro-Cerda, Moreno et al. 1998; Celli, de Chastellier et al. 2003).

Posterior a la internalización por fagocitosis, las bacterias se encuentran en unas vacuolas (denominadas BCV por *Brucella-containing vacuole*) que interactúan con compartimientos del sistema endocítico temprano, adquiriendo marcadores del mismo como EEA-1 y Rab5. Transcurridos 5-30 minutos las BCV escapan del camino endocítico, eludiendo la fusión con los compartimientos del endosoma tardío y del lisosoma (Figura 1). Si bien las BCV no se fusionan con los compartimientos lisosomales, son capaces de adquirir la glicoproteína de membrana asociada al lisosoma LAMP-1, aunque no adquieren el resto de los marcadores lisosomales. En los primeros estadios de la maduración de las BCV, cuando se adquiere LAMP-1, es necesaria la acidificación de las mismas, lo que permite que *Brucella spp.* exprese los componentes del sistema de secreción tipo IV. Posteriormente, entre las 2 y 8 horas postinfección, las BCV intermediarias interactúan con sitios del retículo endoplásmico (RE) llamados ERES (*Endoplasmic Reticulum Exit Sites*), lo que permite que se lleve a cabo la fusión entre las BCV y las membranas del RE, generando organelas permisivas para la replicación bacteriana.

A pesar de no conocerse todos los factores de virulencia necesarios para el establecimiento del nicho replicativo de *Brucella spp.*, se sabe, por estudios del tráfico intracelular, de cepas mutantes que para la entrada en la célula eucariota y los primeros

estadios de infección son necesarios el LPS y el β -1,2-glucano cíclico, y que para adquirir membranas derivadas del RE e impedir la fusión con el lisosoma es necesario el sistema de secreción tipo IV.

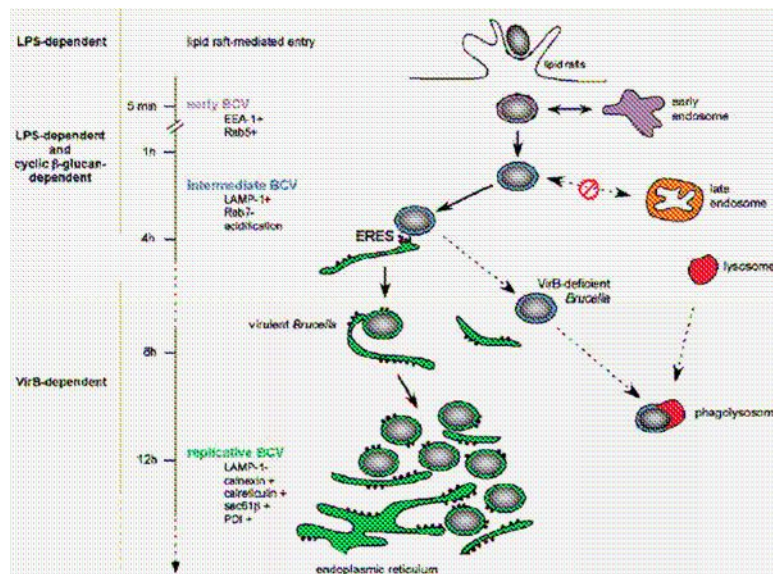


Figura 1. Representación esquemática del modelo propuesto para la entrada de *Brucella spp.* en la célula hospedadora y la biogénesis de la vacuola replicativa. Se muestra el proceso para la cepa salvaje, *B. abortus* 2308, y para la cepa mutante en el sistema de secreción tipo IV *virB*. (Celli, 2006).

3.2. Factores de virulencia

En un comienzo la búsqueda de factores de virulencia de *Brucella spp.* se realizó mediante pasajes sucesivos de las cepas virulentas fuera de su organismo hospedador principal e identificación de fenotipos avirulentos. De este modo solo se encontraron las cepas rugosas deficientes en el antígeno O del LPS (Winter, Schurig et al. 1996).

A partir de la obtención de la secuencia completa del genoma de una especie de *Brucella* y que fueron accesibles las técnicas de biología molecular para manipular los mismos, se pudieron identificar nuevos factores de virulencia. La mutagénesis dirigida hacia factores de virulencia putativos previamente caracterizados en otros patógenos, a menudo fracasaba en *Brucella spp.* Por este motivo se optó por producir mutagénesis al azar, por ejemplo con transposones, e identificar las bacterias con fenotipos avirulentos en cultivos celulares o en animales de experimentación (Price, Templeton et al. 1990; Tatum, Detilleux et al. 1992; Elzer, Phillips et al. 1994; Sha, Stabel et al. 1994; Denoel, Crawford et al. 1997; Ko and Splitter 2003). A continuación, se detallan los factores de virulencia de *Brucella spp.* más relevantes encontrados en las últimas décadas.

3.2. a. Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) es un constituyente de la membrana externa de bacterias Gram negativas que está compuesto por tres dominios: uno proximal hidrofóbico compuesto por el lípido A, uno central o *core* oligosacárido y una cadena de polisacárido externa "O". El polisacárido O es inmunodominante y se encuentra presente en las cepas lisas (S-LPS) y ausente en las cepas rugosas (R-LPS).

En *Brucella spp.*, el lípido A consiste en una estructura carbonada de glucosaminil- β (1-6) glucosamina sustituida con ácidos grasos saturados. El *core* contiene glucosa y manosa y está unido al lípido A por medio del 2-ceto-deoxioctonato (KDO). El antígeno O está formado por el polisacárido α -1,2 o α -1,3 4-formamido-4,6-dideoxi-D-manosa (N-formil-perosamina) (Moreno, Berman et al. 1981; Caroff, Bundle et al. 1984; Caroff, Bundle et al. 1984).

En general, las cepas rugosas son menos virulentas y menos resistentes al ataque por complemento que las cepas lisas, por lo que el LPS es considerado el factor de virulencia más importante de *Brucella* (Riley and Robertson 1984; Schurig, Roop et al. 1991). Sin embargo, las cepas *B. ovis* y *B. canis* son rugosas naturalmente y aun así son virulentas, lo que indica que hay otros factores que influyen en la virulencia bacteriana.

Se han generado cepas de *Brucella* mutantes en distintos genes que codifican para enzimas de la ruta de biosíntesis del LPS (*pgm*, *rfaE*, *pmm* y *wboA*) y todas resultaron atenuadas en animales de experimentación (Allen, Adams et al. 1998; McQuiston, Vemulapalli et al. 1999; Ugalde, Czibener et al. 2000).

A pesar de que el LPS ha sido ampliamente estudiado en *Brucella spp.* no se conoce su función biológica específica. En los últimos años se han publicado trabajos asignándole distintas funciones, como por ejemplo, que cumple un rol en la invasión y multiplicación intracelular (Porte, Naroeni et al. 2003) y que podría actuar como un efector anti-apoptótico (Fernandez- Prada, Zelazowska et al. 2003).

3.2. b. Glucanos β (1,2) cíclicos

Los glucanos cíclicos están presentes casi exclusivamente en los miembros del grupo de las α -2-proteobacterias, como *Agrobacterium* y *Rhizobium*, y están involucrados en la interacción de la bacteria con el organismo hospedador (Geremia, Cavaignac et al. 1987). Los glucanos β (1,2) cíclicos son polisacáridos de entre 17 a 24 unidades de glucosa, que se localizan en el periplasma bacteriano tanto en *Agrobacterium* como en *Rhizobium*, y su síntesis está sujeta a osmoregulación. Los glucanos cíclicos periplásmicos de *Brucella spp.* son sintetizados por la enzima codificada por el gen *cgs*. A diferencia de

lo que ocurre en *Agrobacterium* y *Rhizobium*, los glucanos cíclicos de *Brucella spp.* no son regulados por la osmolaridad del medio (Inon de Iannino, Briones et al. 1998). Se observó que cepas de *Brucella* mutantes en *cgs* tienen afectado el tráfico intracelular, mostrando una reducción significativa de la virulencia tanto *in vivo* como en cultivos celulares (Briones, Inon de Iannino et al. 2001).

3.2. c. Sistema de secreción tipo IV

El sistema de secreción tipo IV está presente en todas las especies de *Brucella* secuenciadas, formando parte de un operón llamado *virB*. Este operón es homólogo al operón *virB* de *Agrobacterium tumefaciens* y a los genes *ptl* de *Bordetella pertussis*. En *A. tumefaciens* el operón *virB* actúa en la secreción del ADN de transferencia bacteriana dentro de la célula eucariota, mientras que en *B. pertussis* el operón *ptl* constituye la maquinaria necesaria para la secreción de la toxina pertúsica (O'Callaghan, Cazevieille et al. 1999; Sieira, Comerci et al. 2000).

El operón *virB* de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* posee 11 marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican para proteínas homólogas a las codificadas por el operón *virB* de *A. tumefaciens* y un ORF 12 que codifica para una lipoproteína putativa. Las cepas de *Brucella* mutantes en el operón *virB* son deficientes en la replicación intracelular y en la persistencia en el modelo murino, por lo cual el sistema de secreción tipo IV es considerado un factor de virulencia.

La expresión del operón *virB* se induce después de la entrada de la bacteria al macrófago, siendo necesario para ello la acidificación de las BCV (Boschioli, Ouahrani-Bettache et al. 2002). El sistema de secreción tipo IV está involucrado en la secreción de moléculas efectoras dentro de la célula hospedadora, lo que permite redireccionar el tráfico intracelular para que las bacterias alcancen su nicho replicativo (Comerci, Martínez-Lorenzo et al. 2001; Delrue, Martínez-Lorenzo et al. 2001). Sin embargo aun no se han podido identificar las moléculas secretadas por el sistema de secreción tipo IV de *Brucella spp.* (Sexton and Vogel 2002).

3.2. d. Sistema de dos componentes BvrR-BvrS

El sistema de dos componentes BvrR-BvrS de *Brucella spp.* consiste en una proteína reguladora histidina quinasa y una proteína sensora, llamadas BvrR y BvrS respectivamente. El sistema BvrR-BvrS de *Brucella spp.* es homólogo a los sistemas de dos componentes ChvG- ChvI de *A. tumefaciens*, ExoS-ChvI de *Rhizobium meliloti*, PhoP-PhoQ de *Salmonella typhimurium* y BvgA-BvgS de *Bordetella bronchiseptica*.

En *Brucella spp.* el sistema de dos componentes BvrR-BvrS controla la expresión de las proteínas de membrana externa Omp25 y Omp22. Las cepas de *Brucella* mutantes en los genes *bvrR-bvrS* tienen afectada la membrana externa y son avirulentas tanto en cultivos celulares como en animales de experimentación (Sola-Landa, Pizarro-Cerda et al. 1998).

3.2. e. Sistema de transporte BacA

El gen *bacA* de *Brucella spp.* codifica para un transportador de membrana homólogo al de *Rhizobium meliloti*. En *R. meliloti* el transportador BacA es necesario para el establecimiento de la simbiosis entre la bacteria y las raíces de alfalfa. BacA transporta moléculas similares a bleomicina y tiene un rol en la determinación de la composición y estructura del LPS.

Las cepas de *B. abortus* mutantes en el sistema de transporte BacA presentan una marcada atenuación de su virulencia tanto en macrófagos como en ratones (LeVier, Phillips et al. 2000; Parent, Goenka et al. 2007).

3.2. f. *cydB*

Las cepas de *Brucella spp.* mutantes en el gen *cydB* se han reportado como atenuadas tanto en animales de experimentación como cultivos celulares (Endley, McMurray et al. 2001). El gen *cydB* forma parte del operón *cydAB*, que codifica para la enzima citocromo oxidasa bd.

Dicha enzima cataliza un paso terminal del sistema de transporte de electrones de la respiración bacteriana.

El gen homólogo a *cydB* de *Escherichia coli* codifica una enzima que posee alta afinidad por oxígeno, que actúa en condiciones de microaerobiosis. Las cepas mutantes en *cydB* de *Brucella spp.* presentan sensibilidad elevada a especies altamente reactivas de oxígeno, a pH ácidos y a inhibidores respiratorios. La virulencia atenuada y sensibilidad a especies reactivas de oxígeno de las bacterias mutantes fue restaurada por complementación en *trans* con el gen *cydB* salvaje o con los genes que codifican para la enzima superóxido dismutasa SOD o catalasa. Esto indica que las enzimas mencionadas tienen un rol común en la prevención de los daños causados por radicales libres del oxígeno.

3.2. g. Proteínas de respuesta a estrés

Los patógenos intracelulares deben sobrellevar las condiciones adversas encontradas en el interior del macrófago, como: pH ácido, presencia de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno y falta de nutrientes. Por lo que la adaptación fisiológica de la bacteria, mediante la expresión de proteínas de estrés, como chaperonas y proteasas que actúan sobre las proteínas dañadas, es crítica para establecer una interacción duradera con la célula eucariota.

Se han construido cepas de *Brucella* deficientes en diversas proteínas de respuesta a estrés, observándose que mientras que la ausencia de algunas proteínas afectaron la supervivencia intracelular de la bacteria otras no lo hicieron. Así, mientras que mutantes que no expresan Hsp70 (*dnaK*) o proteasa Lon (*lon*) resultaron atenuadas (Elzer, Phillips et al. 1996; Robertson, Kovach et al. 2000; Kohler, Ekaza et al. 2002), no lo fueron las mutantes en la serina proteasa A (*htrA*), sugiriendo una probable redundancia en su función (Phillips and Roop 2001). Recientemente, se han reportado otras proteínas que actúan ante condiciones de estrés, como factores de virulencia. Un grupo de estas proteínas son los factores sigma de choque térmico (Delory, Hallez et al. 2006). Mediante el análisis de la secuencia genómica de *Brucella spp.* se identificaron 6 genes que codifican para factores sigmas putativos: *rpoD*, *rpoH1*, *rpoH2*, *rpoE1*, *rpoE2* y *rpoN*. Se construyeron cepas mutantes deficientes en cada uno de ellos, excepto *rpoN*, y se observó que todas ellas fueron defectivas en la supervivencia en ratones.

Por otro lado, también se observó que el gen *rsh*, que codifica para una enzima ppGpp sintasa, está involucrado en la virulencia de *B. melitensis* y *B. suis*. Los homólogos a este gen en *Sinorhizobium meliloti*, *relA/spoT*, están relacionados con la respuesta ante la privación de nutrientes, vía la molécula efectora (p)ppGpp (Dozot, Boigegrain et al. 2006).

Por último, también se ha identificado que están asociadas con la virulencia bacteriana la proteína de respuesta a estrés de fase estacionaria: HF-I (*RNA binding protein host factor*) (Roop, Gee et al. 2003) y la proteína involucrada en la supervivencia a bajas concentraciones de Zn²⁺: ZnuA (Yang, Becker et al. 2006).

3.2. h. Proteínas de membrana externa

La membrana externa desempeña un rol importante en la virulencia de *Brucella spp.* Mediante análisis proteómico se ha predicho que más de 25 proteínas y lipoproteínas se localizan en la membrana externa de la bacteria (Lamontagne, Butler et al. 2007).

Las proteínas principales de membrana externa (OMP) de *Brucella spp.* fueron inicialmente clasificadas en tres grupos según su masa: grupo 1 (88-94 KDa), grupo 2 (36-38 KDa) y grupo 3 (31-34 y 25-27 KDa). El grupo 1 está conformado por una única

proteína cuya función no ha sido aun elucidada (CloECKaert, Verger et al. 1996). El grupo 2 está integrado por dos proteínas, clasificadas como porinas, codificadas por genes con 85% de homología: *omp2a* y *omp2b* (CloECKaert, Vizcaino et al. 2002). El grupo 3 está conformado por 7 proteínas, de las cuales las más representativas son: Omp25 (también llamada Omp3a), Omp31 y Omp22 (también llamada Omp3b), que están codificadas por los genes *omp25*, *omp31* y *omp22*, respectivamente.

El gen *omp25* se encuentra altamente conservado entre las especies de *Brucella*, salvo por una pequeña delección en *B. ovis*. Las cepas mutantes de *omp25* construidas a partir de las cepas virulentas *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16M y *B. ovis* 63/290 resultaron atenuadas en animales de experimentación (Edmonds, CloECKaert et al. 2001; Edmonds, CloECKaert et al. 2002). Estos resultados demuestran que la proteína Omp25 está involucrada en la virulencia de *Brucella spp.*

Por otro lado, la proteína Omp31, que está presente en todas las especies de *Brucella* excepto en *B. abortus*, no está involucrada en la virulencia bacteriana (Vizcaino, Verger et al. 1997). La función de Omp31 aun no ha sido elucidada, si bien se especula que podría tratarse de una porina (CloECKaert, Vizcaino et al. 2002).

El estudio de la supervivencia en ratones de cepas mutantes en *omp22* derivadas de *B. ovis* y *B. abortus*, identificó que en la primera especie se vio afectada la virulencia mientras que en la segunda no (Caro-Hernandez, Fernandez-Lago et al. 2007; Manterola, Guzman-Verri et al. 2007). Esta diferencia en los resultados obtenidos con las distintas especies de *Brucella* podría ser explicada aludiendo al fenotipo rugoso de *B. ovis* y liso de *B. abortus*.

3.2. i. Lipoproteínas

Se han identificado tres lipoproteínas de bajo peso molecular en la membrana externa de *Brucella spp.*: Omp19, Omp16 y Omp10 (Tibor, Decelle et al. 1999). La lipoproteína Omp16 presenta similitud con las lipoproteínas asociadas a péptidoglicano (PALs) de otras bacterias Gram negativas y se ha propuesto que está asociada al peptidoglicano, anclada del lado periplásmico de la membrana externa por su residuo lipídico. Omp10 y Omp19 no presentan homólogos funcionales en las bases de datos. Ambas proteínas están asociadas a la superficie de la membrana externa por uniones covalentes a ácidos grasos y son inmunodominantes.

Se han construido cepas mutantes en Omp10 y Omp19 en *B. abortus*, las cuales resultaron reducidas en su virulencia en el modelo de experimentación murino (Tibor, Wansard et al. 2002). Ninguna de las cepas mutantes fue deficiente en la supervivencia intracelular. La cepa mutante en Omp10 fue defectiva en el crecimiento en medio mínimo y

la cepa mutante en Omp19 mostró un incremento en la susceptibilidad a péptidos catiónicos y al detergente no iónico deoxicolato de sodio. Este último resultado sugiere que la cepa mutante en Omp19 tiene dañada la membrana externa. Se postuló que ambas cepas mutantes están afectadas en la supervivencia extracelular, por ejemplo por presentar mayor susceptibilidad a la muerte mediada por el sistema del complemento.

3.2. j. Genes flagelares

A diferencia de la mayoría de las bacterias del grupo *Rhizobiaceae*, al que pertenece el género *Brucella*, estas últimas fueron descritas como no móviles (Alton, Jones et al. 1975). Sin embargo al disponerse de las secuencias genómicas de diversas especies de *Brucella* se encontró que están presentes todos los genes necesarios para la construcción del flagelo. Sin embargo no se identificaron genes que codifiquen para los receptores quimiotácticos o transductores de señales (Halling 1998, Letesson, Lestrade et al. 2002).

Se ha observado en diversas bacterias patógenas que el sistema flagelar, relacionado filogenéticamente con el aparato de secreción tipo III (Blocker, Komoriya et al. 2003), está involucrado en la virulencia (Young, Schmiel et al. 1999; Ghelardi, Celandroni et al. 2002; Song, Jin et al. 2004). Las cepas de *B. melitensis* mutantes *knockout* en genes que codifican para componentes esenciales del flagelo (*fliF*, *flgI* y *fliC*) resultaron atenuadas en el modelo murino. Ninguna de estas cepas mutantes mostró diferencias con respecto a la cepa parental en cuanto a la replicación en líneas celulares (Lestrade, Dricot et al. 2003).

Se ha reportado que los genes que codifican para los componentes basales (anillo MS) y distales (gancho o *hook* y filamento) del aparato flagelar de *B. melitensis* son inducidos en un medio particular en la etapa logarítmica temprana de crecimiento de la bacteria. En esta condición experimental puntual se observó por microscopía electrónica una estructura semejante a un flagelo polar. A pesar de esto, aun no se ha registrado que *Brucella spp.* sea capaz de moverse (Fretin, Fauconnier et al. 2005).

4. Antecedentes en que se basa este trabajo

Con el objetivo de identificar nuevos factores de virulencia en el género *Brucella*, en nuestro grupo de trabajo se construyó una cepa mutante *knockout* en el ORF BAB1_1543 de *Brucella abortus* 2308, mediante la inserción de un cassette de resistencia a kanamicina. La cepa mutante construida resultó deficiente en la supervivencia en ratones BABL/c y en cobayos. El fenotipo de virulencia atenuada fue restaurado a los niveles de la cepa parental al complementar en *trans* la cepa mutante con un plásmido replicativo para

Brucella spp. que contiene al ORF BAB_1543 salvaje (Figura 2) (Cravero et al., no publicado).

El ORF BAB_1543 está conservado en todas las especies secuenciadas de *Brucella*. También se ha realizado la inactivación de dicho ORF en *B. melitensis* 16M y *B. suis* 1330, las cuales, del mismo modo que la mutante derivada de *B. abortus* 2308, resultaron atenuadas en animales de experimentación. Teniendo en cuenta los resultados mencionados, se postuló que el producto del ORF estudiado, al cual se denominó *iivA* (por *involved in virulence A*), es un nuevo factor de virulencia del género *Brucella*.

Las cepas mutantes en *iivA* de *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16M y *B. suis* 1330, no arrojaron diferencias significativas con respecto a la cepa parental, ya sea en la replicación intracelular o en el crecimiento en medio mínimo o rico. El único fenotipo distintivo de las cepas mutantes fue una leve sensibilidad al pH ácido y a temperaturas elevadas, siendo esta última característica solo observada en la cepa mutante en *iivA* derivada de *B. melitensis*.

Además de estar conservada en el género *Brucella*, la proteína codificada por el gen *iivA* (llamada livA) está presente en más de 200 especies de proteobacterias y forma parte del grupo de proteínas ortólogas 2960 (COG 2960). A pesar de la conservación de livA en diversas especies bacterianas, no se ha caracterizado ninguna de las proteínas ortólogas a livA y la función de este grupo de proteínas es desconocida.

En este trabajo de tesis se presentan caracterizaciones estructurales y bioquímicas de proteínas pertenecientes al COG 2960, constituyendo los primeros datos experimentales que contribuyen a elucidar la función de este grupo de proteínas ortólogas.

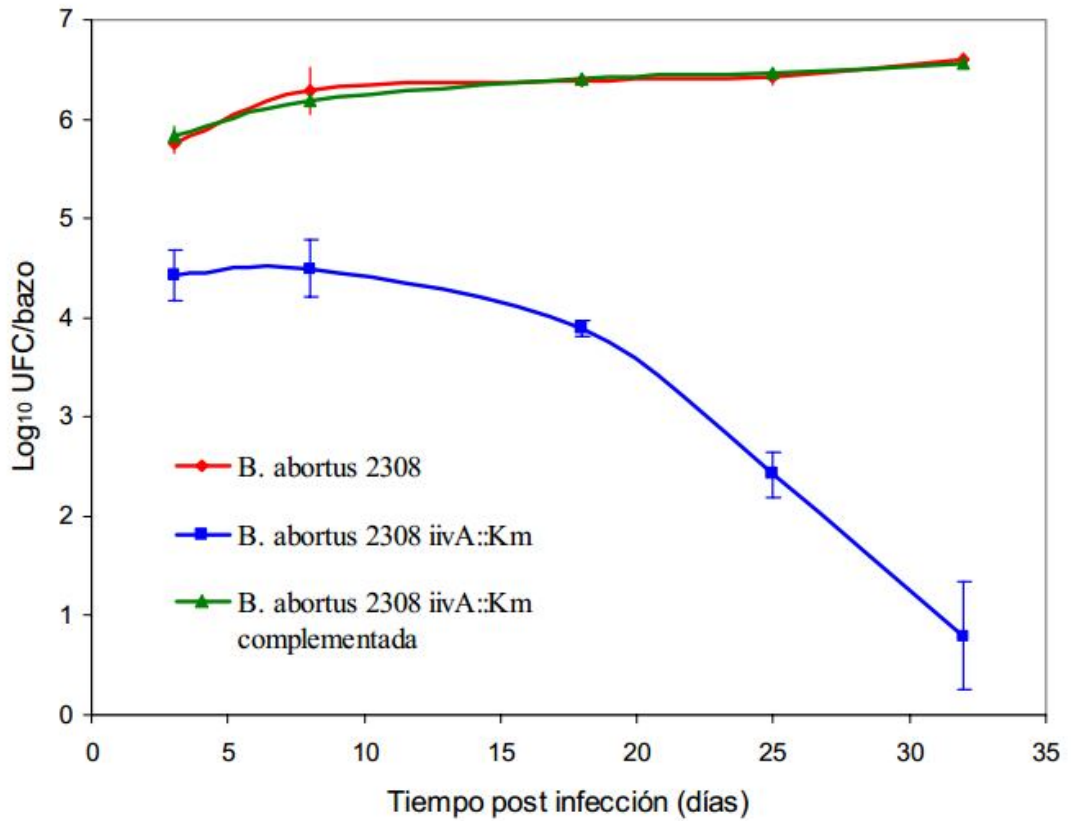


Figura 2. Replicación de las cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* 2308 *iivA*::Km y *B. abortus* 2308 *iivA*::Km complementada en *trans* con *iivA* salvaje, en bazos de ratones BALB/c a distintos tiempos post infección. En el gráfico se representa el logaritmo en base 10 promedio de ⁵ las unidades formadoras de colonia por bazo. Se inocularon grupos de 5 ratones con 2x10⁵ UFC/ratón para cada tiempo. En el gráfico se indican las barras correspondientes al error estándar.

Bibliografía

- Allen, C. A., L. G. Adams, et al. (1998). "Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival." *Infect Immun* **66**(3): 1008-16.
- Alton, G. G., L. M. Jones, et al. (1975). "Laboratory techniques in brucellosis." *Monogr Ser World Health Organ*(55): 1-163.
- Blocker, A., K. Komoriya, et al. (2003). "Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3027-30.
- Boschiroli, M. L., S. Ouahrani-Bettache, et al. (2002). "Type IV secretion and *Brucella* virulence." *Vet Microbiol* **90**(1-4): 341-8.
- Briones, G., N. Inon de Iannino, et al. (2001). "*Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells." *Infect Immun* **69**(7): 4528-35.
- Broughton, E. S. and K. L. Jahans (1997). "The differentiation of *Brucella* species by substrate specific tetrazolium reduction." *Vet Microbiol* **57**(2-3): 253-71.
- Caro-Hernandez, P., L. Fernandez-Lago, et al. (2007). "Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*." *Infect Immun* **75**(8): 4050-61.
- Caroff, M., D. R. Bundle, et al. (1984). "Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9." *Eur J Biochem* **139**(1): 195-200.
- Caroff, M., D. R. Bundle, et al. (1984). "Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3." *Infect Immun* **46**(2): 384-8.
- Celli, J. (2006). "Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*." *Res Microbiol* **157**(2): 93-8.
- Celli, J., C. de Chastellier, et al. (2003). "*Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum." *J Exp Med* **198**(4):545-56.
- Chain, P. S., D. J. Comerchi, et al. (2005). "Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*." *Infect Immun* **73**(12): 8353-61.
- Cloekaert, A., J. M. Verger, et al. (1996). "Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*." *FEMS Microbiol Lett* **145**(1): 1-8. Cloekaert, A., N. Vizcaino, et al. (2002). "Major outer membrane proteins of *Brucella* spp: past, present and future." *Vet Microbiol* **90**(1-4): 229-47.
- Comerchi, D. J., M. J. Martinez-Lorenzo, et al. (2001). "Essential role of the VirB

- machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole." Cell Microbiol **3**(3): 159-68.
- Corbel, M. J. (1997). "Brucellosis: an overview." Emerg Infect Dis **3**(2): 213-21.
- Cosivi, O. and M. J. Corbel (1998). "WHO consultation on the development of new/improved brucellosis vaccines. 17 December 1997, Geneva, Switzerland." Biologicals **26**(4): 361-3.
- Crawford, R. M., L. Van De Verg, et al. (1996). "Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* infection in mice." Infect Immun **64**(6): 2188-92.
- Delory, M., R. Hallez, et al. (2006). "An RpoH-like heat shock sigma factor is involved in stress response and virulence in *Brucella melitensis* 16M." J Bacteriol **188**(21): 7707-10. Delrue, R. M., M. Martinez-Lorenzo, et al. (2001). "Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking." Cell Microbiol **3**(7): 487-97.
- DelVecchio, V. G., V. Kapatral, et al. (2002). "The genome of *Brucella melitensis*." Vet Microbiol **90**(1-4): 587-92.
- Denoel, P. A., R. M. Crawford, et al. (1997). "Survival of a bacterioferritin deletion mutant of *Brucella melitensis* 16M in human monocyte-derived macrophages." Infect Immun **65**(10): 4337-40.
- Detilleux, P. G., B. L. Deyoe, et al. (1990). "Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro." Infect Immun **58**(7): 2320-8.
- Dozot, M., R. A. Boigegrain, et al. (2006). "The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system *virB*." Cell Microbiol **8** (11): 1791-802.
- Drazek, E. S., H. S. Houg, et al. (1995). "Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* 16M for growth in human monocyte-derived macrophages." Infect Immun **63**(9): 3297-301. Edmonds, M. D., A. Cloeckaert, et al. (2001). "Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle." Am J Vet Res **62**(9): 1461-6. Edmonds, M. D., A. Cloeckaert, et al. (2002). "Brucella species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*." Vet Microbiol **88**(3): 205-21.
- Elzer, P. H., R. W. Phillips, et al. (1994). "Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant." Infect Immun **62**(10): 4135-9.
- Elzer, P. H., R. W. Phillips, et al. (1996). "The HtrA stress response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes." Infect Immun **64** (11): 4838-41.
- Endley, S., D. McMurray, et al. (2001). "Interruption of the *cydB* locus in *Brucella*

- abortus attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection." J Bacteriol **183**(8): 2454-62.
- Fernandez-Prada, C. M., E. B. Zelazowska, et al. (2003). "Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis." Infect Immun **71**(4): 2110-9.
- Foulongne, V., K. Walravens, et al. (2001). "Aromatic compound-dependent *Brucella suis* is attenuated in both cultured cells and mouse models." Infect Immun **69**(1): 547-50.
- Fretin, D., A. Fauconnier, et al. (2005). "The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection." Cell Microbiol **7**(5): 687-98.
- Geremia, R. A., S. Cavaignac, et al. (1987). "A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form beta-(1---2) glucan." J Bacteriol **169**(2): 880-4.
- Ghelardi, E., F. Celandroni, et al. (2002). "Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*." J Bacteriol **184**(23): 6424-33.
- Gorvel, J. P. and E. Moreno (2002). "Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication." Vet Microbiol **90**(1-4): 281-97.
- Halling, S. M. (1998). "On the presence and organization of open reading frames of the nonmotile pathogen *Brucella abortus* similar to class II, III, and IV flagellar genes and to *LcrD* virulence superfamily." Microb Comp Genomics **3**(1): 21-9.
- Halling, S. M., B. D. Peterson-Burch, et al. (2005). "Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*." J Bacteriol **187**(8): 2715-26.
- Inon de Iannino, N., G. Briones, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic beta(1-2) glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti* *ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens* *chvB* mutants." J Bacteriol **180**(17): 4392-400.
- Jahans, K. L., G. Foster, et al. (1997). "The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals." Vet Microbiol **57**(4): 373-82.
- Jumas-Bilak, E., S. Michaux-Charachon, et al. (1998). "Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria." J Bacteriol **180**(10): 2749-55.
- Ko, J. and G. A. Splitter (2003). "Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans." Clin Microbiol Rev **16**(1): 65-78.

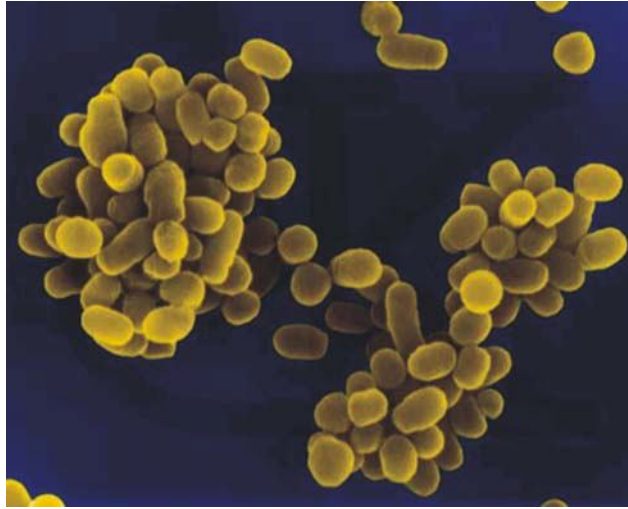
- Kohler, S., E. Ekaza, et al. (2002). "Induction of dnaK through its native heat shock promoter is necessary for intramacrophagic replication of *Brucella suis*." Infect Immun **70**(3): 1631-4.
- Kohler, S., S. Michaux-Charachon, et al. (2003). "What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*?" Trends Microbiol **11**(5): 215-9.
- Lamontagne, J., H. Butler, et al. (2007). "Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*." J Proteome Res **6**(4): 1519-29.
- Lestrade, P., A. Dricot, et al. (2003). "Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice." Infect Immun **71**(12): 7053-60.
- Letesson, J. J., P. Lestrade, et al. (2002). "Fun stories about *Brucella*: the "furtive nasty bug"." Vet Microbiol **90**(1-4): 317-28.
- LeVier, K., R. W. Phillips, et al. (2000). "Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival." Science **287**(5462): 2492-3.
- Manterola, L., C. Guzman-Verri, et al. (2007). "BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence." Infect Immun **75**(10): 4867-74.
- Martinez de Tejada, G., J. Pizarro-Cerda, et al. (1995). "The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides." Infect Immun **63**(8): 3054-61.
- McQuiston, J. R., R. Vemulapalli, et al. (1999). "Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence." Infect Immun **67**(8): 3830-5.
- Miller, W. G., L. G. Adams, et al. (1999). "Brucella-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)." J Zoo Wildl Med **30**(1): 100-10.
- Moreno, E., D. T. Berman, et al. (1981). "Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides." Infect Immun **31**(1): 362-70.
- Moreno, E. and I. Moriyon (2002). "*Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 1-3.
- Moreno, E., S. L. Speth, et al. (1981). "Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides." Infect Immun **31**(1): 214-22.
- Moreno, E., E. Stackebrandt, et al. (1990). "*Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria." J Bacteriol **172**(7): 3569-76.
- Moriyon, I. and I. Lopez-Goni (1998). "Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*." Int Microbiol **1**(1): 19-26.
- Naroeni, A. and F. Porte (2002). "Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry

- and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages." Infect Immun **70**(3): 1640-4.
- Nicoletti, P., R. P. Lenk, et al. (1989). "Efficacy of various treatment regimens, using liposomal streptomycin in cows with brucellosis." Am J Vet Res **50**(7): 1004-7.
- O'Callaghan, D., C. Cazevielle, et al. (1999). "A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*." Mol Microbiol **33**(6): 1210-20.
- Parent, M. A., R. Goenka, et al. (2007). "Brucella abortus bacA mutant induces greater pro-inflammatory cytokines than the wild-type parent strain." Microbes Infect **9**(1): 55-62.
- Paulsen, I. T., R. Seshadri, et al. (2002). "The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13148-53.
- Phillips, R. W. and R. M. Roop, 2nd (2001). "Brucella abortus HtrA functions as an authentic stress response protease but is not required for wild-type virulence in BALB/c mice." Infect Immun **69**(9): 5911-3.
- Pizarro-Cerda, J., S. Meresse, et al. (1998). "Brucella abortus transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes." Infect Immun **66**(12): 5711-24.
- Pizarro-Cerda, J., E. Moreno, et al. (1998). "Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments." Infect Immun **66**(5): 2387-92.
- Porte, F., A. Naroeni, et al. (2003). "Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages." Infect Immun **71**(3): 1481-90.
- Price, R. E., J. W. Templeton, et al. (1990). "Survival of smooth, rough and transposon mutant strains of *Brucella abortus* in bovine mammary macrophages." Vet Immunol Immunopathol **26**(4): 353-65.
- Riley, L. K. and D. C. Robertson (1984). "Brucellacidal activity of human and bovine polymorphonuclear leukocyte granule extracts against smooth and rough strains of *Brucella abortus*." Infect Immun **46**(1): 231-6.
- Robertson, G. T., M. E. Kovach, et al. (2000). "The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice." Mol Microbiol **35**(3): 577-88.
- Roop, R. M., 2nd, J. M. Gee, et al. (2003). "Brucella stationary-phase gene expression and virulence." Annu Rev Microbiol **57**: 57-76.
- Schurig, G. G., R. M. Roop, 2nd, et al. (1991). "Biological properties of RB51; a stable

- rough strain of *Brucella abortus*." Vet Microbiol **28**(2): 171-88.
- Sexton, J. A. and J. P. Vogel (2002). "Type IVB secretion by intracellular pathogens." Traffic **3**(3): 178-85.
- Sha, Z., T. J. Stabel, et al. (1994). "Brucella abortus catalase is a periplasmic protein lacking a standard signal sequence." J Bacteriol **176**(23): 7375-7.
- Sieira, R., D. J. Comerci, et al. (2000). "A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication." J Bacteriol **182**(17): 4849-55.
- Smith, L. D. and T. A. Ficht (1990). "Pathogenesis of *Brucella*." Crit Rev Microbiol **17**(3): 209-30.
- Sola-Landa, A., J. Pizarro-Cerda, et al. (1998). "A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence." Mol Microbiol **29**(1): 125-38.
- Song, Y. C., S. Jin, et al. (2004). "FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion." Mol Microbiol **53**(2): 541-53.
- Tatum, F. M., P. G. Deltelleux, et al. (1992). "Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice." Infect Immun **60**(7): 2863-9.
- Tibor, A., B. Decelle, et al. (1999). "Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins." Infect Immun **67**(9): 4960-2.
- Tibor, A., V. Wansard, et al. (2002). "Effect of omp10 or omp19 deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice." Infect Immun **70**(10): 5540-6.
- Ugalde, J. E., C. Czibener, et al. (2000). "Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication." Infect Immun **68**(10): 5716-23.
- Ugalde, R. A. (1999). "Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts." Microbes Infect **1**(14): 1211-9.
- Verger, J. M., F. Grimont, et al. (1987). "Taxonomy of the genus *Brucella*." Ann Inst Pasteur Microbiol **138**(2): 235-8.
- Vizcaino, N., J. M. Verger, et al. (1997). "DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers." Microbiology **143** (Pt 9): 2913-21.
- Watarai, M., S. Makino, et al. (2002). "Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication." Cell Microbiol **4**(6): 341-55.

- Watarai, M., S. Makino, et al. (2002). "Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice." Infect Immun **70**(9): 4818-25.
- Winter, A. J., G. G. Schurig, et al. (1996). "Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4." Am J Vet Res **57**(5): 677-83.
- Yang, X., T. Becker, et al. (2006). "Deletion of *znuA* virulence factor attenuates *Brucella abortus* and confers protection against wild-type challenge." Infect Immun **74**(7): 3874-9.
- Young, G. M., D. H. Schmiel, et al. (1999). "A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6456-61.

Hipótesis y objetivos



Hipótesis

La hipótesis de este trabajo de tesis es que la caracterización bioquímica y estructural de livA permitirá elucidar la función biológica de esta proteína en *Brucella* spp.

Además, se postula que la estructura y las características bioquímicas del grupo de proteínas ortólogas a livA están conservadas y que estas proteínas son relevantes para el proceso de interacción de las bacterias del COG 2960 con su organismo hospedador.

Para aceptar o rechazar las hipótesis formuladas se propone desarrollar los objetivos mencionados a continuación.

Objetivo general

Caracterizar estructural y funcionalmente a la proteína livA de *Brucella abortus* y establecer si la proteína ortóloga a livA en *Salmonella typhimurium* esta relacionada con la virulencia bacteriana, con el fin de elucidar la función biológica de las proteínas pertenecientes al COG2960.

Objetivos particulares

Caracterizar estructural y bioquímicamente a la proteína livA de *Brucella abortus*
(CAPITULO I)

Estudiar la interacción y la capacidad fusogénica de livA con membranas fosfolipídicas modelos (CAPITULO II).

Identificar los aminoácidos esenciales para la estructura y función de livA (CAPITULO III).

Caracterizar estructural y bioquímicamente a la proteína ortóloga a livA en *Salmonella typhimurium*, construir una cepa deficiente en la misma y evaluar su contribución a la virulencia bacteriana (CAPITULO IV).

CAPÍTULO I.

Caracterización estructural y bioquímica de la proteína livA de *Brucella abortus*



1.1. Estructuras Coiled-Coil

Introducción

La estructura α -hélice coiled-coil fue descrita en primer lugar por Crick y por Pauling y Corey en 1953 como el principal elemento estructural de una serie de proteínas fibrosas que incluían la queratina, la miosina y el fibrinógeno (Crick 1952; Pauling and Corey 1953). Actualmente, se conoce que este motivo estructural está presente en más de 200 proteínas naturales. Las proteínas con estructuras coiled-coil están involucradas en diversas funciones biológicas, como regulación de la expresión de genes, fusión de membranas, síntesis de tRNA, etc (Lupas 1996).

La estructura coiled-coil canónica propuesta por Crick comprende un superenrollamiento (supercoil) de sentido izquierdo, formado por dos o tres α -hélices, en orientación paralela. Con el transcurso del tiempo se obtuvieron nuevas estructuras proteicas de alta resolución donde se vio que existen numerosas variantes a lo propuesto en un principio por Crick: el número de hélices puede variar desde 2 a 7, la orientación entre las hélices puede ser paralela o anti-paralela, las hélices que componen el supercoil pueden ser idénticas (homotípica) o distintas (heterotípica). También se ha visto que el supercoil puede ser de sentido derecho en estructuras que están formadas por repeticiones de 11 residuos en vez de la típica repetición heptamérica (Mason and Arndt 2004). De todos modos, las estructuras coiled-coil más abundantes son las de sentido

izquierdo compuestas de 2 hélices en forma paralela o anti- paralela o de 3 hélices paralelas.

La secuencia primaria de proteínas coiled-coil típicas está conformada por repeticiones de siete residuos llamadas heptadas. El número de heptadas en una proteína coiled-coil puede variar desde más de 200 repeticiones en proteínas fibrosas hasta solamente 2 en péptidos coiled-coil sintéticos designados de novo. Los residuos que componen la heptada son designados convencionalmente como a-b-c-d-e-f-g. Las posiciones a y d están comúnmente ocupadas por residuos hidrofóbicos (los más usuales son Leu, Ile y Val), aunque se observó una tolerancia de hasta 20% de residuos polares en dichas posiciones (Yu 2002). Las posiciones e y g están comúnmente ocupadas por residuos cargados (los más frecuentes son Lys y Glu). El resto de las posiciones, b-c-f, suelen ser ocupadas por residuos polares. Esta distribución de los residuos aminoacídicos hace que las α -hélices coiled-coil sean anfipáticas con los residuos a y d formando el centro hidrofóbico inter-hélice y con los residuos e y g formando interacciones iónicas inter-hélice (Figura 1.1).

Las α -hélices estándares tienen una periodicidad de 18/5 (18 residuos aminoacídicos cada 5 vueltas de hélice) lo que equivale a colocar 3.6 residuos por vuelta de hélice, mientras que las α -hélices coiled-coil sufren una distorsión que hace que se coloquen 3.5 residuos aminoacídicos por vuelta de hélice, lo que es equivalente a una periodicidad de 7/2 (7 residuos cada 2 vueltas de hélice) de donde proviene la característica repetición heptamérica (Gruber and Lupas 2003).

Figura 1.1. Representación esquemática de un coiled-coil dimérico paralelo (A y B) y ribbon plot de la estructura de rayos-X del dominio cierre de leucina de la proteína GCN4 (C y D). En los diagramas A y B los residuos están anotados como a-g en una hélice y como a'-g' en la otra hélice. Se muestran las interacciones hidrofílicas (e y g' en azul y rojo, g y e' en violeta y naranja) dentro de la repetición heptamérica. El centro hidrofóbico (a/a' y d/d') es mostrado en verde y gris. (Manson et al., 2004).

1.2. Predicción de motivos coiled-coil a partir de la secuencia proteica

Existen diversos programas de acceso libre en la WEB que permiten predecir motivos coiled-coil, ya sea formando parte de proteínas enteras o inmersos en pequeñas regiones dentro de proteínas complejas. Estos métodos se basan en la característica repetición heptamérica y en comparaciones con bases de datos de proteínas coiled-coil de estructura conocida. Los programas mayormente utilizados son Coils, Paircoil y Multicoil y se detallan a continuación.

1.2. a. Coils

Coils (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) fue el primer algoritmo creado para predecir estructuras coiled-coil y fue diseñado por Andrei Lupas y colaboradores (Lupas, Van Dyke et al. 1991). Coils es un programa que compara una secuencia contra una base de datos de proteínas coiled-coil diméricas paralelas conocidas y arroja un puntaje de similitud. Por comparación de este puntaje con la distribución de puntajes en proteínas globulares y proteínas coiled-coil, el programa calcula la probabilidad de que la secuencia estudiada pueda adoptar una conformación coiled-coil.

1.2. b. Paircoil

Después del programa Coils surgió un nuevo programa para predecir proteínas coiled-coil desarrollado por Bonnie Berger y colaboradores (Berger, Wilson et al. 1995). Este nuevo algoritmo es más riguroso que el programa creado originalmente por Lupas. Paircoil (<http://groups.csail.mit.edu/cb/paircoil>) predice dominios coiled-coil en secuencias proteicas usando una correlación de residuos pairwise obtenida a partir de una base de datos de 58.217 residuos aminoacídicos de coiled-coils de dos cadenas.

1.2. c. Multicoil

Multicoil (<http://multicoil.lcs.mit.edu/cgi-bin/multicoil>) es una extensión del programa Paircoil que además de predecir la localización de regiones coiled-coil en la secuencia proteica los clasifica como diméricos o triméricos (Wolf, Kim et al. 1997). El programa se sustenta en bases de datos de proteínas coiled-coil triméricas que comprenden 6.319 residuos aminoacídicos sumados a la ya existente base de datos de proteínas coiled-coil diméricas.

1.3. Proteínas coiled-coil triméricas

1.3. a. Proteínas coiled-coil triméricas en eucariotas

Las proteínas eucariotas son las más estudiadas y por lo tanto es donde encontramos mayor cantidad de estructuras conocidas que están formadas totalmente de estructuras coiled-coil triméricas (como la proteína de unión al factor de choque térmico, HSBP) o poseen dominios coiled-coil que permiten su trimerización (como la proteína de unión a manosa, MBP). Esta variedad de proteínas abarca desde proteínas estructurales como la proteína de la matriz del cartílago (Matrilina), proteínas reguladoras como el factor

de transcripción de choque térmico, proteínas que reconocen carbohidratos como las colectinas, proteínas receptoras de lipoproteína como el receptor scavenger del macrófago, proteínas que interactúan con el receptor del factor de necrosis tumoral TRAF y proteínas relacionadas con el reordenamiento del citoesqueleto de actina como coronina 1.

En la tabla 1.1 se muestra un resumen de las proteínas eucariotas de estructura conocida que poseen α -hélices coiled-coil triméricas formando parte de su estructura y en el gráfico 1.2 se muestra la estructura terciaria obtenida por rayos-X o RMN de alguna de ellas como ejemplo.

Tabla 1.1. Proteínas eucariotas con dominios coiled-coil triméricos de estructura conocida.

	Función	Estructura	Cita
Colectinas (Familia que incluye a la proteína de unión a manosa (MBP) y a la proteína surfactante pulmonar D (SP-D))	Son lectinas animales tipo C dependientes de calcio. Reconocen carbohidratos de la pared celular de los patógenos y disparan su aglutinación y eliminación.	Tienen 4 dominios: Un N-terminal corto, un dominio semejante a colágeno que une el carbohidrato, un dominio <i>coiled-coil</i> responsable de la trimerización y un dominio lectina.	(Weis and Drickamer 1994; Hakansson, Lim et al. 1999)
Coronina 1 de mamíferos	Tiene un rol en el reconocimiento dinámico del citoesqueleto de actina y en su rearreglo.	<i>Coiled-coil</i> trimérico paralelo	(Gatfield, Albrecht et al. 2005)
Factor de transcripción de choque térmico (HSF) (está conservado desde levaduras hasta humanos)	Se une al DNA ante el estrés térmico e induce la transcripción de genes de choque térmico.	Forma trímeros en solución y cuando está unido al DNA es 80% α -hélice	(Westwood and Wu 1993; Zuo, Baler et al. 1994)
Proteína de unión al factor de transcripción de choque térmico (HSBP)	Se une al dominio de trimerización de la proteína de transcripción de choque térmico. No se conoce su función específica.	α -hélice <i>coiled-coil</i> continua con C-terminal no estructurado.	(Tai, McFall et al. 2002)

GCN4 Zip mutante en Asn16Gln	Proteína de unión a DNA reguladora de la transcripción.	La proteína salvaje forma dímeros paralelos, pero cuando se muta la asparagina que se encuentra en el centro hidrofóbico puede formar trímeros.	(Harbury, Kim et al. 1994)
Proteína de la matriz del cartílago o Matrilina 2	Es el principal componente del cartílago. Actúa como proteína adaptadora conectando otras proteínas y el péptido glicano en la matriz extracelular.	Tiene dos dominios semejantes a vWFA, 4 semejantes al factor de crecimiento epidermal y un C-terminal <i>coiled-coil</i> que media la oligomerización.	(Pan and Beck 1998)
Cubilina (Factor intrínseco receptor de vitamina B12)	Se obtuvo de riñón bovino y está unido periféricamente a la membrana plasmática de las células epiteliales. Facilita la endocitosis de ligandos.	El dominio N-terminal es coiled-coil trimérico	(Lindblom, Quadt et al. 1999)
TRAF (Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF))	TRAF interacciona con el dominio citoplasmático de muchos miembros de la familia de TNF (TNFR2, CD40, CD30, etc.) y permite iniciar la transducción de señales.	Tiene dos dominios: El N-terminal coiled-coil trimérico paralelo y el C-terminal que es β -sandwich y media la unión al receptor.	(Park, Burkitt et al. 1999)
Receptor scavenger de macrófagos (MSR)	Es un receptor reciclable que une la lipoproteína LDL modificada en la superficie celular y la internaliza por endocitosis mediada por receptor. Luego el receptor libera al ligando en el endosoma ácido donde es digerido en el lisosoma y es enviado nuevamente a la superficie celular vía el aparato de Golgi. Cuando se encuentra en pH ácido la parte C-terminal cambia de β -coil a α -hélice.	Trímeros paralelos. Tiene 6 dominios: citoplasmático, transmembrana, espaciador, coiled-coil (es el dominio de oligomerización), colágeno-like (dominio que une al LDL modificado) y un dominio específico C-terminal.	(Kodama, Freeman et al. 1990; Frank, Lustig et al. 2000)

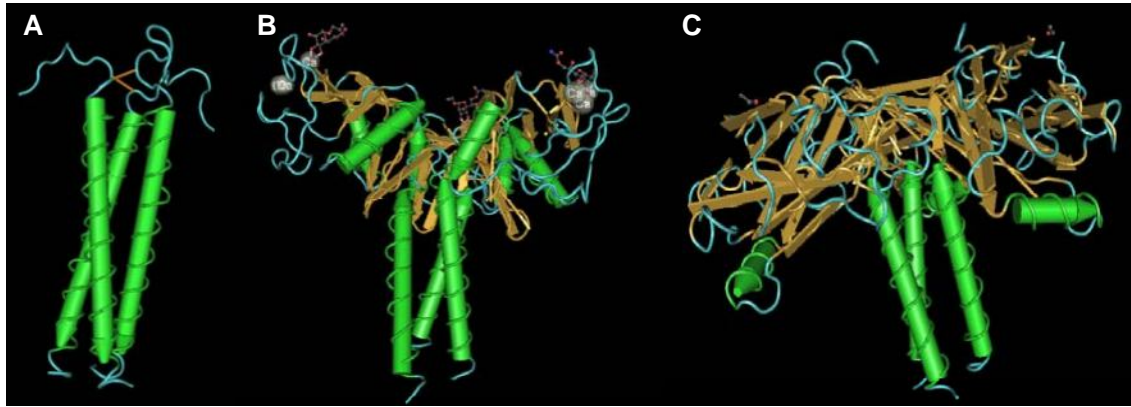


Figura 1.2. Ejemplos de proteínas con estructuras *coiled-coil* triméricas. (A) Estructura del motivo de trimerización de la proteína de la matriz del cartílago de pollo, obtenida por RNM. (B) Estructura del dominio de trimerización y dominio de reconocimiento a carbohidratos de la proteína surfactante humana D acoplada con una heptosa obtenida por Rayos-X. (C) Estructura de la proteína TRAF2 humana con péptidos del receptor CD40 unidos obtenida por Rayos-X. Los cilindros verdes denotan α -hélices y las flechas amarillas hojas β .

1.3. b. Proteínas *coiled-coil* triméricas en procariontas

En contraste a lo que sucede con las proteínas eucariotas, las proteínas bacterianas han sido menos estudiadas y se conocen pocas estructuras tridimensionales de alta resolución de proteínas *coiled-coil* triméricas.

Una proteína *coiled-coil* trimérica paralela bacteriana cuya estructura fue obtenida en alta resolución es la lipoproteína de la membrana externa de *Escherichia coli*. Esta lipoproteína que posee un motivo polipeptídico de 56 aminoácidos, por lo que fue llamada Lpp-56, es la más abundante de la membrana externa bacteriana. Posee la clásica modificación lipídica en una cisteína N-terminal y se puede unir al peptidoglicano a través de una lisina en el C-terminal. La estructura tridimensional y experimentos biofísicos en solución mostraron que Lpp-56 está compuesta en un 90% de α -hélice, que es altamente estable (T_m 67°C) y que posee una disposición del arreglo *coiled-coil* trimérico particular en el que se forma una estructura semejante a un cierre de alanina (Shu, Liu et al. 2000; Bjelic, Karshikoff et al. 2006) (Figura 1.3).

Por otro lado, un sistema bacteriano constituido por varias proteínas con estructuras *coiled-coil* es el sistema de secreción tipo III de bacterias Gram negativas patógenas, tales como *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* y *Yersinia spp.* El sistema de secreción tipo III forma una estructura similar a una aguja que permite la inyección de proteínas efectoras directamente en el citoplasma del hospedador, permitiendo la regulación de la señalización de la célula eucariota a favor del patógeno. Una clase de proteínas componentes de este sistema de secreción son las llamadas proteínas translocadoras que, o forman parte de la zona extracelular del complejo o son transportadas para contactarse

con la membrana plasmática eucariota o penetran al citosol. Las proteínas translocadoras son: EspA, EspB y EspD en *E. coli*, YopB, YopD y LcrV en *Yersinia spp.*, IpaB, IpaC y IpaD en *Shigella spp.* y SipB, SipC y SipD en *Salmonella spp.* Mediante predicciones bioinformáticas y ensayos biofísicos y bioquímicos se ha observado que SipB y SipC y sus homólogos IpaB e IpaC tienen motivos *coiled-coil* triméricos formando parte de su estructura. Se ha observado que algunas de estas proteínas están relacionadas con el rearrreglo del citoesqueleto de actina, lo cual es importante para permitir que la bacteria ejerza su virulencia (Hayward, McGhie et al. 2000; Delahay and Frankel 2002; Hume, McGhie et al. 2003).

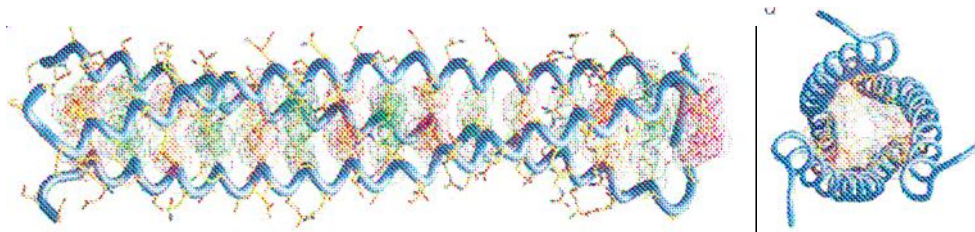


Figura 1.3. Estructura de Lpp-56 obtenida por difracción de Rayos-X: (A) Vista longitudinal del trímero de N-terminal a C-terminal. (B) Vista axial del trímero donde se ve el extremo N-terminal. (Wei Shu et al., 2000).

1.3. c. Proteínas *coiled-coil* triméricas virales

Se ha obtenido la estructura tridimensional de numerosas proteínas *coiled-coil* triméricas virales, todas correspondientes a las proteínas de fusión de membrana de virus envueltos. La primera proteína fusogénica viral cristalizada fue la hemaglutinina del virus influenza en el año 1981 y de allí en adelante se han obtenido numerosas estructuras como las de la proteína F de Paramixovirus, la gp160 de HIV y SIV, la proteína Env retroviral, la Gp del virus Ebola, etc. Dichas proteínas poseen características en común tales como tener sitios de glicosilación, trimerizar a través de dominios *coiled-coil* en el N-terminal, poseer dominios transmembranas y sufrir clivaje proteolítico para ser fusogénicamente activas. Además del *coiled-coil* N-terminal por el que trimerizan, estas proteínas tienen otra región *coiled-coil* corta en el C-terminal, que cuando están en la conformación fusogénicamente activa se dobla sobre el dominio de trimerización quedando en forma antiparalela (Dutch, Jardetzky et al. 2000).

1.4. Proteínas intrínsecamente no estructuradas

Las proteínas intrínsecamente no estructuradas o desordenadas, también llamadas nativamente desplegadas, pertenecen a un grupo de proteínas único. Para que una

proteína pueda ser considerada como nativamente desordenada la totalidad o una región grande de ella (de más de 50 aminoácidos) debe ser flexible, no compacta (extendida) y no tener o tener pocas estructuras secundarias ordenadas bajo condiciones fisiológicas (Uversky 2002).

La lista de proteínas perteneciente a esta familia tiene más de 100 miembros que incluye proteínas involucradas en la regulación transcripcional y traduccional, en la transducción de señales celulares, proteínas de fosforilación, chaperonas, etc. Se piensa que las regiones intrínsecamente desordenadas le atribuyen a la proteína plasticidad para interactuar con diferentes ligandos.

La secuencia aminoacídica de las regiones desordenadas tienen características comunes, tales como poseer baja complejidad, bajo contenido de aminoácidos hidrofóbicos voluminosos (Val, Leu, Ile, Met Phe, Trp y Tyr), los cuales normalmente conforman el centro de las proteínas globulares plegadas y tener una proporción alta de aminoácidos polares y cargados (Gln, Ser, Pro, Glu, Lys y en ocasiones Gly y Ala). Teniendo en cuenta estas características se han diseñado numerosos programas para predecir regiones desordenadas, como PONDR, FoldIndex, DisEMBL, GLOBPLOT y DISOPRED, a los cuales se puede acceder libremente en la Web (Iakoucheva and Dunker 2003; Dosztanyi, Csizmek et al. 2005; Prilusky, Felder et al. 2005).

Eventualmente, las proteínas nativamente desplegadas pueden adquirir estructuras ordenadas cuando se encuentran con su ligando natural o en condiciones del entorno específicas (Dyson and Wright 2005). Las condiciones del entorno que comúnmente se ha encontrado que inducen estructura en estas proteínas son:

- La temperatura, probablemente debido a que el aumento de la misma puede incrementar la fuerza iónica y las interacciones hidrofóbicas. Un ejemplo en el que ocurre esto es la α -sinucleína.
- El pH, esto es debido a que a pHs extremos se pueden neutralizar las cargas de los aminoácidos cargados y disminuir las fuerzas de repulsión que impiden el plegamiento. Ejemplos en que ocurre esto están dados por α -sinucleína y protomiosina α .
- Los iones, esto es debido a que la presencia de iones con carga opuesta a la de los aminoácidos cargados pueden compensar las cargas de la proteína y disminuir las fuerzas de repulsión. Esto también es ejemplificados con la α -sinucleína.

Por último, las proteínas nativamente desplegadas, pueden plegarse en el medio natural en el que son activas debido a la presencia de ligandos o blancos a

los que se unen, tales como una variedad de moléculas pequeñas, sustratos, cofactores, otras proteínas, ácidos nucleicos, membranas lipídicas, etc.

Materiales y métodos

1.1. Herramientas de bioinformática

El acceso a las secuencias se realizó a través del sitio NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). El peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas se obtuvo por programas de acceso libre a través del servidor de proteómica ExpASy (www.expasy.ch). La predicción de estructura secundaria se realizó mediante los programas de predicción de acceso libre: Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/submit.html> Cuff & Barton 2000), PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html> Bryson et al 2005, McGuffin et al 2000, Jones 1999), SAM-T99 (<http://www.cse.ucsc.edu/compbio/HMM-apps/T99-query.html> Karplus et al 1998) y PHD (Rost et al 1993 and 1994). Para la predicción de estructuras coiled-coil se utilizaron los programas PAIRCOIL (<http://groups.csail.mit.edu/cb/paircoil/cgi-bin/paircoil>) y MULTICOIL (<http://multicoil.lcs.mit.edu/cgi-bin/multicoil>). El análisis de sitios de restricción y el diseño de oligonucleótidos para las reacciones de amplificación se hizo a través de las herramientas del sitio JustBio.com de acceso libre (www.justbio.com).

1.2. Cepas bacterianas y medios de cultivos

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α (Gibco), BL21 (λ DE3) (Invitrogen) y BTH101 fueron crecidas en medio líquido Luria-Bertani (LB) en agitación o LB agar (5 g/l triptosa, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, DIFCO) a 37°C o 30°C en el caso de BTH101. En los casos requeridos, los antibióticos se suministraron en las siguientes concentraciones: Kanamicina (sigma) 25 μ g/ml, Ampicilina (USB) 100 μ g/ml y Cloranfenicol (sigma) 20 μ g/ml.

1.3. Preparación de células competentes y transformación

Las células de *E. coli* se prepararon químicamente competentes mediante incubación con CaCl₂ y se congelaron a -70°C hasta su uso (Sambrook et al. 1989). La transformación se realizó incubando en hielo 50 μ l de células competentes con 50 ng de plásmido o de ligación durante 30 minutos. Luego se incubó a 42°C durante 2 minutos e inmediatamente se resuspendió las células en medio LB durante 1 hora en agitación, para permitir la expresión de la resistencia a antibiótico. Finalmente se plaqueó en LB agar suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubó durante toda la noche a 37°C.

1.4. Metodología de ADN recombinante

La construcción y análisis de plásmidos recombinantes se realizaron por técnicas clásicas de biología molecular (Sambrook et al. 1989).

1.4. a. Aislamiento de plásmidos

Los plásmidos fueron aislados utilizando el método de lisis alcalina (Sambrook et al. 1989), columnas de intercambio aniónico de Qiagen y también con el Kit de Wizard para mini y midipreps (Promega).

1.4. b. Utilización de enzimas de restricción y modificantes

Las digestiones con enzimas de restricción (simples o dobles) así como la utilización de enzimas modificantes se realizaron de acuerdo con los buffers, las temperaturas, la duración de la incubación y las condiciones de inactivación recomendadas por los respectivos proveedores (Promega y NEB).

1.4. c. Electroforesis en geles de agarosa

Las concentraciones de los geles de agarosa fueron 0.7-1.5% según los tamaños de los fragmentos de restricción a analizar. La agarosa fue disuelta en TAE (10 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8), a la que se le adicionó bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Las muestras de ADN fueron sembradas en el gel previo agregado de 1/10 del volumen del sembrado de buffer de siembra (0.5% azul de bromofenol, 25% glicerol). Los geles se corrieron en TAE a 5-10 V/cm a temperatura ambiente. Las bandas de ADN fueron visualizadas por fluorescencia al UV. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron ladder de 100 pb (Promega) y ladder de 1 Kb (Gibco y Promega). Los geles se documentaron utilizando un equipo Fotodyne y el programa Cricket Graph.

1.4. d. Aislamiento de los fragmentos de interés de geles de agarosa

Se utilizaron los métodos de GeneClean (Bio 101) y Prep-A-Gene (Bio-Rad), siguiendo las indicaciones del proveedor.

1.4. e. Ligación

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN fueron efectuadas con la enzima T4 ADN ligasa (NEB y Promega) con el buffer suministrado por el proveedor. Se agregó 1 unidad de T4 ADN ligasa a una mezcla que contenía por lo menos 50 ng de plásmido vector y 1 a 5 veces más (en molaridad) de fragmentos de ADN inserto. Para la ligación de extremos cohesivos, la incubación se realizó durante 16 horas a 4°C en un volumen final de 10 o 15 µl. Para la ligación de extremos romos, la incubación se realizó durante 16 horas a 18°C en igual volumen final.

1.4. g. Reacción en cadena de la polimerasa

Las amplificaciones se realizaron utilizando Taq Polimerasa (Promega) o Accu-Prime (Invitrogen) en presencia del buffer suministrado en condiciones estándar, en un volumen final de 50 µl. Los dNTPs se utilizaron a una concentración final de 0.2 mM y los oligonucleótidos a 20 pmol cada uno. El protocolo de amplificación fue: 5 minutos de desnaturalización a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto 94°C, 1 minuto a la temperatura de annealing de los oligonucleótidos dependiendo del par utilizado, y una elongación a 72°C de 1 minuto por Kb a amplificar, seguido de 10 minutos a 72°C de elongación final. Como templado se utilizaron 2 ng de ADN genómico de *Brucella abortus* cepa 2308.

1.5. Obtención de las proteínas livA, livA-N e livA-C

1.5. a. Clonado en los vectores de expresión para *E. coli*

El gen *livA* (ORF BAB_1543 de *Brucella abortus* cepa 2308) se amplificó en forma entera o parcial de manera de obtener los fragmentos nucleotídicos que codifican para *livA* (M1 a S106), *livA-N* (M1 a V48) o *livA-C* (R50 a K101) utilizando los siguientes pares de oligonucleótidos anotados en sentido 5' a 3': AAACCATGGAAACAAGGAAGAATG y TCTCGAGATTATCTTTGGATTTTGACGAAAC para *livA*, CCATGGCGATGACCAGCGGACAGAAC y CTCGAGCACAACGTCGAGCGTATTGAG para *livA-N* y CCATGGAGCGTGAGGATTTTGAAGC y CTCGAGTTTTTGACGAAACGGATGCCG para *livA-C*. Los amplicones fueron clonados en pGEM-T (Promega) y luego liberados con las enzimas NcoI y XhoI contenidas en la secuencia de los oligonucleótidos. Los fragmentos liberados fueron clonados en el vector de expresión para *E. coli* pET24D (Novagene) en marco con el promotor de T7 en el 5' y con una etiqueta de seis histidinas en el 3'. Las construcciones fueron chequeadas por secuenciación nucleotídica utilizando el servicio de secuenciación prestado por el INTA.

1.5. b. Expresión en E. coli y purificación de las proteínas recombinantes

Las construcciones en el vector pET24D conteniendo las secuencias codificantes para livA, livA-N e livA-C fueron transformadas en la cepa de E. coli BL21 (DE3) de manera de poder inducir la expresión proteica mediante el promotor T7. Se realizó una dilución 1/100 de las bacterias crecidas a saturación, se las puso a crecer a 37° con agitación hasta lograr un crecimiento en fase exponencial (densidad óptica a 600 nm de 0.5) y en este punto se indujo la expresión de las proteínas por agregado de 1 mM de isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) por 4 horas. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 3000 xg por 20 minutos y se procedió a purificar las proteínas por cromatografía de afinidad en forma nativa siguiendo el protocolo de Quiagen. El pellet conteniendo las bacterias se resuspendió en buffer de unión nativo (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM ClNa y 5 mM imiazol llevado a pH 7.9 con HCl), se lisó por sonicación hasta obtener una solución translúcida y se centrifugó a 12000 xg de manera de separar las proteínas solubles de bacterias no lisadas y restos celulares. Luego el lisado proteico se incubó con una resina de Ni-NTA (níquel-nitrilotriacetic acid, Quiagen) durante 1 hora a 4°C con agitación suave de manera de permitir la unión de la proteína a la resina. Posteriormente se pasó la solución a una columna donde se realizaron tres lavados con 10 ml de buffer de lavado (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM ClNa y 20 mM imisazol, llevado a pH 7.9 con HCl) para eliminar proteínas unidas inespecíficamente y se procedió a la elusión con el buffer de elusión (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM ClNa y 0.5 M imisazol, llevado a pH 7.9 con HCl) tomando alícuotas de 1 ml. La presencia de la proteína se evaluó en geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie Brilliant Blue R 250 (Pierce) y se confirmó la identidad de la misma por western blot utilizando un anticuerpo monoclonal Anti-Histidina (Amersham Biosciences). Las alícuotas conteniendo proteína se juntaron y se dializaron en buffer fosfato salino (PBS) durante 24 horas realizando 3 recambios del mismo.

1.5. c. Cuantificación de las proteínas

La concentración de proteína se estimó utilizando el kit de cuantificación de Pierce (Micro BCA Protein Assay) según las especificaciones del fabricante. Debido a que las curvas de BSA que se utilizan como estándar para este tipo de ensayo no resultaron ser apropiadas para livA y sus derivados y, a que livA no posee residuos aromáticos se utilizó como estándar para la cuantificación una proteína derivada de livA que posee un residuo de triptofano en el extremo C-terminal (se describe la construcción en el capítulo 2), que fue previamente cuantificada por absorción UV a 280 nm.

1.5. d. Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida

Se utilizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) usando tricina en el buffer de corrida lo cual permite la resolución de proteínas de bajo peso molecular a menor concentración de acrilamida que el sistema de PAGE-SDS con glicina. Para el gel resolutivo la concentración de acrilamida final fue de 16% y la de bisacrilamida fue de 0.495%. Para la parte del gel apilador (stacking) la concentración final de acrilamida fue de 3.88% y la de bisacrilamida fue de 0.12%. Se utilizaron minigeles (6 x 9 cm, Miniprotean II, Biorad), los que se corrieron a una corriente constante de 100 V en buffer conteniendo 0.1M Tris/HCl pH 8.9, 0.1 M Tricina, y 0.1% SDS para el cátodo y 0.2 M Tris/HCl pH 8.9 para el ánodo.

1.5. e. Tinción con azul de coomassie

Se incubaron los geles con una tinción de azul de coomassie 0.05% (Coomasie Brilliant Blue R 250 0.05%, metanol 50%, ácido acético 10%) por 1 a 2 horas con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se decoloró el exceso mediante incubación con solución de lavado (metanol 50%, ácido acético 10%) que se reemplazó periódicamente.

1.5. f. Identificación de proteínas mediante western-blot

Luego de efectuada la electroforesis los geles de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) en buffer Laemmli (25 mM Tris/HCl pH 8.8, 250 mM glicina) suplementado con 20% de metanol, aplicando una corriente constante de 200 mA por 1 hora. Para evaluar la efectividad de las transferencias las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau 0.1% (sigma) en ácido glacial 5%. Luego para la detección inmunológica de las proteínas las membranas se incubaron 1 hora con solución de bloqueo (5% de leche descremada en buffer TBS 1X), 1 hora con una dilución del anticuerpo primario en la solución de bloqueo (la dilución fue 1/3000 en el caso de anticuerpos monoclonales y 1/300 en el caso de sueros policlonales) y luego de un posterior lavado con TBS 1X se incubaron 1 hora más con el anticuerpo secundario específico conjugado a fosfatasa alcalina. Terminadas las incubaciones se lavó la membrana tres veces con TBS 1X y 1 vez con buffer BREFA (100 mM Tris/HCl pH 9.5, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂) y se agregaron 10 ml de solución de revelado (10 ml de buffer BREFA, 66 µl de Nitro blue tetrazolium (NBT) 50 mg/ml en dimetilformamida 70% y 33 µl de bromo-cloro-indoilo-fosfato (BCIP) 50 mg/ml en dimetilformamida 100% (Promega)). Se

incubó con agitación suave por 3 a 15 minutos con luz tenue hasta visualizar las bandas de interés y se detuvo la reacción mediante lavados con agua.

1.6. Ensayo de doble híbrido bacteriano

Para realizar las construcciones en los vectores de doble híbrido bacteriano, las zonas del gen *livA* conteniendo las regiones codificantes para *livA*, *livA-N* e *livA-C* fueron amplificadas por PCR con los siguientes oligonucleótidos que contienen los sitios de restricción *Xba*I en el extremo 5' y *Kpn*I en el 3' que permiten la fusión en marco con los fragmentos T18 o T25 de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertusis*: AATCTAGAGCGCCGTGAAGTGGAAA y AAGGTACCACGGATGCCGATTTTG para *livA*, AATCTAGAGATGACCAGCGGACAGAAC y TTGGTACCACAACGTCGAGCGTATTGAG para *livA-N* y AATCTAGAGCAGCGTGAGGATTTTGAAGC y TTGGTACCGATTTTGACGAAACGGATGCC para *livA-C*. Los productos de amplificación fueron clonados en pGEM-T, liberados con las enzimas de restricción *Xba*I y *Kpn*I y posteriormente clonados en los vectores pUT18c y pKT25 de manera de obtener las proteínas fusionadas en marco a la subunidad T18 o T25 de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertusis*, respectivamente. Las construcciones que expresaban las proteínas que se deseaban ensayar fueron co-trasformadas en la cepa de *E. coli* deficiente en adenilato ciclasa BTH101 y crecidas en medio LB a 30°C. Posteriormente se ensayó la actividad β -galactosidasa de cada cepa utilizando como control positivo de actividad dos construcciones que tienen fusionadas a T18 y T25 dos dominios de cierre de leucina (Zip) que interactúan entre si.

1.7. Ensayo de actividad β -galactosidasa

A 1 ml de cultivo de las cepas a ensayar se le midió la densidad óptica a 550 nm y luego se resuspendieron en 1 ml de buffer Z (0.1 M fosfato de sodio pH 7.0, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄ y 50 mM β -mercaptoetanol). Las células se lisaron por adición de 2 gotas de cloroformo, 1 gota de SDS y agitación por 10 segundos. Se agregaron 200 μ l de ONPG (O- nitrofenil β -D-galactopiranosido) 4 mg/ml en fosfato de sodio 0.1M pH 7.0. Se incubó a 28°C hasta observar coloración amarilla y se midió la absorbancia a 420 nm. La actividad específica de β -galactosidasa se calculó según: $Abs_{420nm} \times 1000 / \text{tiempo de reacción en minutos} \times Abs_{550 nm}$.

1.8. Cross-linking químico

A 20 μ l de proteína purificada y dializada en PBS se le adicionó el cross-linking etilen- glicol bis-(succinimidilsuccinato) (EGS) (Sigma) diluido en dimetilsulfóxido a concentraciones de 0.5, 1 y 5 mM. Se incubó a temperatura ambiente y luego de 30 minutos la reacción fue detenida por agregado de 50 mM de Tris/HCl pH 8.0. Los productos de cross-linking fueron analizados por SDS-PAGE y tinción con Coomassie Brilliant Blue R 250.

1.9. Determinación del peso molecular de proteínas por light scattering estático

El peso molecular de las proteínas fue determinando en un instrumento de Light scattering Precision Detector PD201 conectado en tandem a un sistema de cromatografía líquida de alta precisión y a un refractor diferencial LKB 2142. Las muestras fueron corridas en una columna Superdex 75 y eluidas en buffer PBS. Las señales de luz dispersada a 90° y de índice de refracción fueron monitoreadas y analizadas con el programa Discovery32, provisto con el equipo Precision Detertor, de manera de obtener el peso molecular de las muestras. El detector de luz dispersada a 90° fue calibrado usando seroalbumina bobina (66.5 KDa) como estándar.

1.10. Proteólisis limitada

livA purificada fue incubada a 28°C con 1 μ g/ml de tripsina (Sigma) y la reacción fue parada a distintos tiempos por adición de 1% de TFA (Trifluoro acético). Los productos de digestión fueron examinados en Tris-Tricina SDS-PAGE. Para detectar la identidad de los productos de proteólisis, se electro-transfirieron a una membrana de PVDF y se envió a secuenciar el N-terminal por el método de degradación de Edman. El C-terminal de los fragmentos fue mapeado en base a los pesos moleculares obtenidos por espectrometría de masa de las alícuotas de la proteólisis obtenidas a distintos tiempos. Los experimentos de espectrometría de masa y de degradación de Edman fueron realizados mediante el servicio provisto por el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO) (CONICET-UBA).

1.11 Espectroscopia de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (CD) en la región del UV lejano (250-200 nm) de las proteínas fueron medidos en un espectropolarimetro Jasco J-810 a diferentes condiciones experimentales, usando cubetas de cuarzo de 0.1 cm de longitud de paso. Las muestras fueron incubadas al menos 15 minutos en la condición experimental

requerida antes de tomar las medidas. Los espectros de CD fueron evaluados por el programa K2D para obtener el contenido de estructura secundaria porcentual. La estabilidad termodinámica fue evaluada por la medida de la elipticidad molar a 222 nm en función de la temperatura en un rango de 25 a 90°C.

1.12. Generación de suero policlonal dirigido contra livA

Para obtener suero policlonal dirigido contra livA se inmunizó un conejo con proteína purificada más adyuvante incompleto de Freund. La inmunización se realizó 3 veces por periodos de 1 semana y se extrajo periódicamente sangre de la vena de la oreja para probar la efectividad del suero.

1.13. Determinación de la localización subcelular de la proteína livA en *Brucella abortus*

Para determinar la localización subcelular de livA se utilizó un cultivo de *B. abortus* S2308 crecido a fase exponencial tardía. Las bacterias fueron lisadas por reiterados pasajes a través de prensa de French y el extracto proteico fue clarificado de restos celulares por centrifugación a 20.000 g por 30 minutos. Luego el extracto proteico fue sometido a ultracentrifugación a 100.000 g por 1 hr. para separar las proteínas asociadas a membrana (pellet) y las proteínas citoplasmáticas y periplásmicas (sobrenadante). Las fracciones fueron analizadas por Western blot utilizando un suero policlonal de conejo dirigido contra la proteína livA y contra la proteína BP26 (proteína periplásmica) y la proteína Omp19 (proteína de membrana) como controles del correcto fraccionamiento.

Resultados

1.1. Análisis bioinformático.

La proteína livA de *Brucella abortus* (UniProtKB Entry: Q2YLY4) posee 106 aminoácidos, una masa de 11.3 kDa y un punto isoeléctrico calculado de 8.1. Está anotada como una proteína hipotética de función desconocida en los genomas de *Brucella* spp. secuenciados hasta el momento (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* y *B. ovis*). Esta proteína pertenece a la familia de proteínas ortólogas: COG 2960 (DUF 526). En esta familia se han descrito 241 miembros (pFAM enero 2008) pertenecientes a distintos grupos de proteobacterias: 72 α -proteobacterias, 39 β -proteobacterias, 128 γ -proteobacterias y 2 bacterias de clase no definida. El porcentaje promedio de identidad de secuencia de todas las proteínas del COG 2960 es 37%. A pesar de que livA se encuentra presente en una gran variedad de bacterias, en ninguna de ellas fue caracterizada y en todos los genomas publicados esta anotada como una proteína hipotética de función desconocida.

Mediante el análisis bioinformático de la secuencia de livA se predice que está compuesta por aproximadamente un 68% de α -hélices (Figura 1.4 A). Dicho porcentaje de α -hélice está dividido en dos regiones, una en la mitad N-terminal de la proteína, que involucra desde los residuos R7 a N43, y otra en la mitad C-terminal entre los residuos R50 y E85. Además, se estimó por el programa Paircoil (<http://groups.csail.mit.edu/cb/paircoil/cgi-bin/paircoil>) que las regiones N- y C-terminal predichas como α -hélices tienen capacidad de formar estructuras coiled-coil con un puntaje de 0.6 para la región C-terminal y de 0.2 para la región N-terminal. De acuerdo a la predicción, la estructura α -hélice coiled-coil en la mitad C-terminal de livA está conservada en la mayoría de las proteínas pertenecientes al COG 2960, lo que argumenta a favor de la existencia de estas hélices e indicaría que esta estructura podría cumplir un rol importante en la función biológica de esta familia proteica (Figura 1.4 C). Por otro lado, la estructura coiled-coil en la mitad N-terminal de livA se predice sólo *Brucella* spp. Utilizando el programa Multicoil (<http://multicoil.lcs.mit.edu/cgi-bin/multicoil>), que además de analizar la probabilidad de formar coiled-coil predice el estado de oligomerización, se obtuvo que el C-terminal posee una probabilidad de 0.636 para la formación de dímeros y de 0.178 para la formación de trímeros. En el caso del N-terminal el programa predice una probabilidad de 0.2 para la formación de trímero y de 0.038 para la formación de dímero.

Mediante una representación helical wheel de las regiones de livA se observa que la región N-terminal es altamente anfipática, mientras que la hélice C-terminal, aunque es levemente anfipática, tiene una distribución de residuos polares y no polares más uniforme

(Figura 1.4 B). La capacidad de poder formar una hélice anfipática en la región N-terminal es conservada en miembros representativos del COG 2960 lo que sugiere que es importante para la función de la proteína.

Teniendo en cuenta el análisis bioinformática, se decidió realizar tres construcciones para el estudio estructural y funcional de livA: una construcción que expresa la proteína en su totalidad (desde M1 a S106), llamada livA; una que expresa la región N-terminal (desde M1 hasta V48), llamada livA-N; y una que expresa la zona C-terminal (desde R50 hasta K101), llamada livA-C. Dichas construcciones fueron realizadas en un vector de expresión para *E. coli* que introduce una “etiqueta” de seis histidinas. Luego estas construcciones fueron expresadas, y las proteínas purificadas en forma nativa por cromatografía de afinidad. Las proteínas purificadas fueron dializadas en buffer fosfato salino (PBS) y cuantificadas para su posterior uso.

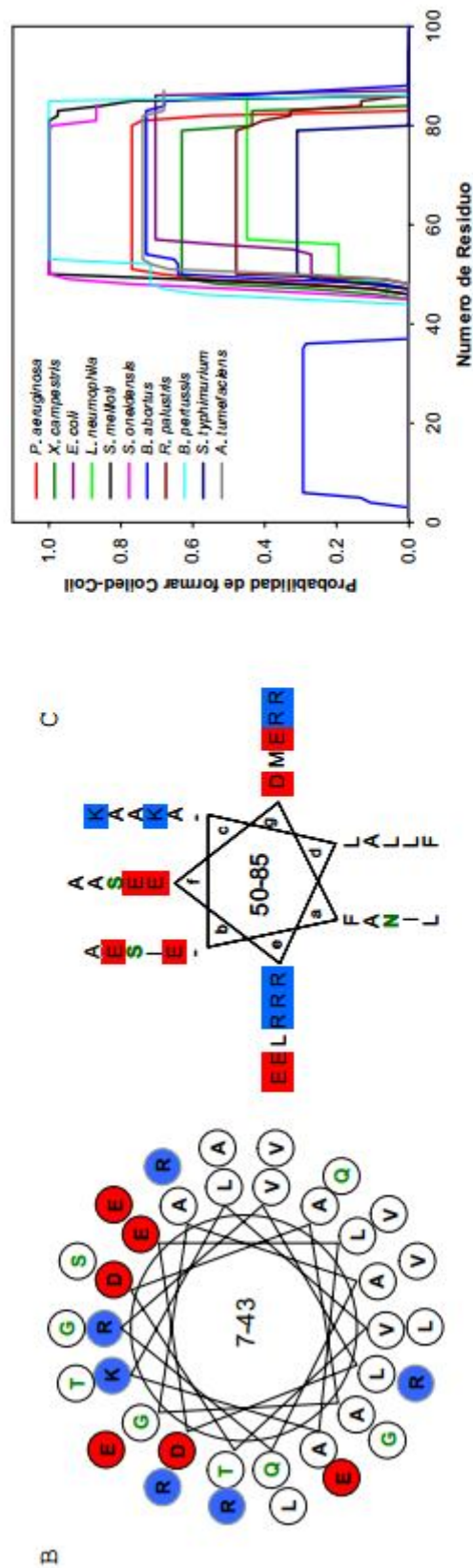
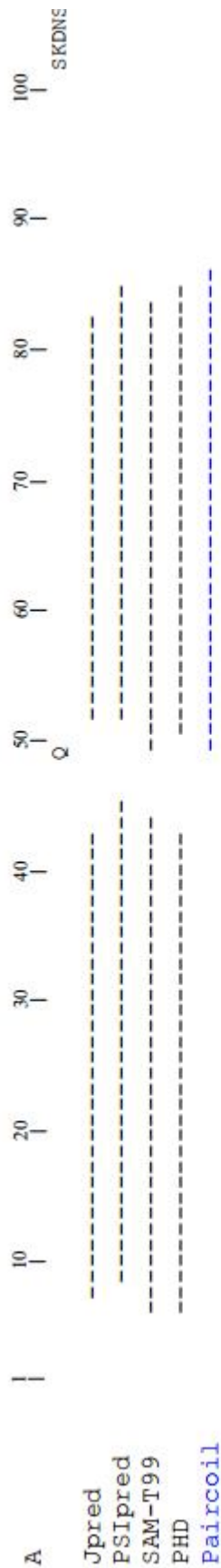


Figura 1.4. Análisis bioinformático de IivA: (A) Secuencia de IivA donde se indica en letras blancas sobre fondo negro las zonas de la proteína estudiadas, correspondiente a la mitad N-terminal y C-terminal (IivA-N y IivA-C, respectivamente). En líneas puntuadas negras se indican los aminoácidos predichos como α -hélice según los programas Jpred, PSIPred, SAM-T99 y PHD; y en líneas puntuadas azules los aminoácidos predichos como *coiled-coil* según el programa Paircoil. (B) Representación *helical wheel* de la α -hélice N-terminal (representado con periodicidad 18/5) y de la hélice *coiled-coil* C-terminal (representada con periodicidad 7/2). Los residuos hidrofóbicos son indicados con letras negras, los polares no cargados con letra verde, los cargados negativamente con fondo rojo y los cargados positivamente con fondo azul. (C) Probabilidad de forma *coiled-coil* de 11 miembros representativos del COG 2960 (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shewanella oneidensis*, *Legionella pneumophila*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Brucella abortus*, *Rhodospseudomonas palustris*).

1.2. Estudio de la interacción de livA consigo misma y del estado de oligomerización

Dado que una de las características principales de las proteínas con dominios coiled-coil es la capacidad de conformar homo- o hetero-oligómeros, se decidió estudiar si livA es capaz de interactuar consigo misma (Lupas and Gruber 2005).

Para analizar la interacción de livA consigo misma in vivo se utilizó el ensayo de doble híbrido bacteriano (BTH) descrito por Karimova (Karimova, Pidoux et al. 1998). En este experimento las proteínas a ensayar son fusionadas a los dos fragmentos de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertusis* (T18 y T25) por separado y co-transformadas en una cepa de *E. coli* deficiente en adenilato ciclasa (cepa BTH101). Los dos fragmentos de la adenilato ciclasa por separado son inactivos pero, cuando se los fusiona a proteínas que son capaces de interactuar, se produce el acercamiento espacial de los fragmentos y la recuperación de la actividad enzimática. Esta recuperación de actividad enzimática es medida por la activación de promotores específicos, como el promotor del gen lacZ, mediante el ensayo de β -galactosidasa.

Con este fin se construyeron fusiones de livA, livA-N y livA-C al fragmento T18 y T25 de la adenilato ciclasa, se co-transformaron en la cepa de *E. coli* BTH101 y se midió la actividad β -galactosidasa. Al co-transformar BTH101 con T18 y T25 fusionados a livA o livA-C se recuperó completamente la actividad β -galactosidasa llegando a niveles similares a los del control positivo (T18 y T25 fusionados a dos dominios de cierre de leucina: Zip). Por el contrario cuando los dominios de la adenilato ciclasa fueron fusionados ya sea, ambos a livA-N o, uno a livA-N y otro a livA-C no se observó recuperación de la actividad β -galactosidasa (Figura 1.5 A). Estos resultados indican que livA interactúa consigo misma in vivo por medio de su región C-terminal.

Por otro lado para investigar la estequiometría del complejo formado se utilizaron dos ensayos in vitro: cross-linking químico y Light scattering estático (SLS) acoplado a una columna de filtración molecular.

Cuando se expuso livA a concentraciones crecientes del cross-linking Etilen-glicol-bis (succidimil succinato) (EGS) y se sometió a corrida electroforética y tinción con Coomassie Brilliant Blue R 250, se pudo observar la formación de agregados con pesos moleculares vinculados a la formación de dímeros y trímeros. Al realizar el mismo ensayo con livA-C también se observó la formación de dímeros y trímeros. Por otro lado al realizar el ensayo con livA-N solo se observó la presencia del monómero (Figura 1.5 B).

La determinación del peso molecular mediante Light scattering estático de livA, livA-C e livA-N concuerda con lo previamente observado por cross-linking químico y arroja pesos de 40.6, 21 y 6.8 KDa respectivamente, lo que coincide con un estado trimérico para livA e livA-C y monomérico para livA-N. Además la forma de los cromatogramas indica que

Las proteínas poseen una distribución conformacional homogénea (Figura 1.5 C). La observación de especies de masa menor a la correspondiente para la formación de trímeros en el ensayo de cross-linking de livA e livA-C, probablemente se deba a que la cantidad del reactivo de crosslinker EGS utilizada se encuentra en defecto con respecto a la concentración de proteína utilizada y por lo tanto en algunas ocasiones no es suficiente para producir la unión covalente de tres cadenas polipeptídicas al mismo tiempo.

En conjunto los resultados presentados indicarían que livA es capaz de formar trímeros por medio de su dominio C-terminal.

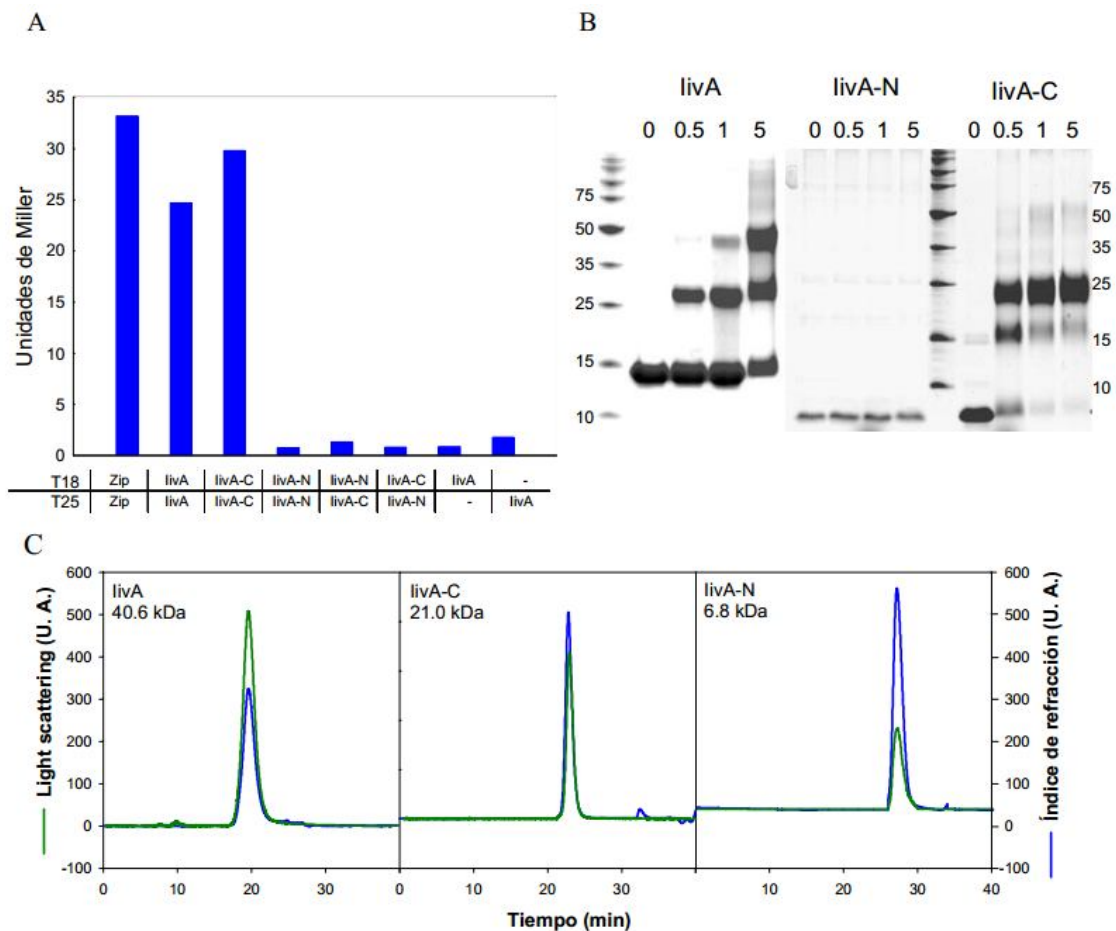


Figura 1.5. Análisis de la estructura cuaternaria de livA. (A) Análisis mediante doble híbrido bacteriano de la interacción de livA y sus dominios entre sí. Se muestra un experimento representativo de las medidas de actividad β -galactosidasa de cepas de *E. coli* BTH101 co-transformadas con livA, livA-N o livA-C fusionadas a los fragmentos T18 o T25 de la adenilato ciclasa. El experimento fue repetido 3 veces obteniéndose resultados similares. (B) *Cross-linking* químico de livA y sus dominios. Los productos de *cross-linking* fueron separados por SDS-PAGE y seguidos por tinción con Comassie Brilliant Blue R 250. Los pesos moleculares de los patrones se muestran al costado del gel. Los números sobre las calles indican la concentración del *crosslinker* EGS adicionada a cada reacción. (C) Cromatografía de filtración molecular en el que se mide la señal de índice de refracción o de *light scattering* estático (en unidades arbitrarias) de cada proteína en función del tiempo de elución. Se indica en el cromatograma la masa calculada para cada proteína.

1.3. Análisis de los dominios estructurales de livA por proteólisis limitada

Parámetros estructurales, tales como accesibilidad al solvente, dominios flexibles y zonas parcialmente desplegadas, son responsables de la susceptibilidad a la fragmentación por proteasas. Por tal motivo se realizaron experimentos de proteólisis limitada, con el objetivo de caracterizar el estado conformacional y discernir los dominios de livA (Mitra, Sinha et al. 2005).

Con tal fin se utilizó la enzima tripsina, la cual corta en el carboxilo terminal de residuos básicos (lisina y arginina). Estos residuos están distribuidos uniformemente a lo largo de la secuencia de livA. La proteólisis por tripsina se siguió a lo largo de dos horas, deteniendo la reacción periódicamente por adición de TFA. Los productos de la reacción se identificaron por medio de su peso molecular, determinado por espectrometría de masa, y por secuenciación del N-terminal, utilizando el método de degradación de Edman. Además, debido a la presencia de una "etiqueta" de seis histidinas en el C-terminal de la proteína, se pudo monitorear el acortamiento del mismo por western blot utilizando un anticuerpo anti-histidina. A tiempos de exposición a la proteasa cortos, se observa que el extremo C-terminal de livA permanece intacto, mientras que el N-terminal es rápidamente escindido. A tiempos de exposición a la proteasa prolongados (2 hs.) se puede observar la prevalencia de una zona resistente a la proteólisis entre los residuos V41 y K94. Esta zona resistente a la proteólisis contiene por completo la región C-terminal predicha como coiled-coil (Figura 1.6).

Es importante notar que aunque K91 no es predicha como parte del coiled-coil, la presencia de prolina del lado carboxílico de este residuo podría impedir la acción de la tripsina sobre el mismo. Del mismo modo, la presencia de E51 en el extremo carboxílico de R50 podría reducir la frecuencia de corte por tripsina de este residuo (Wilkinson 1986).

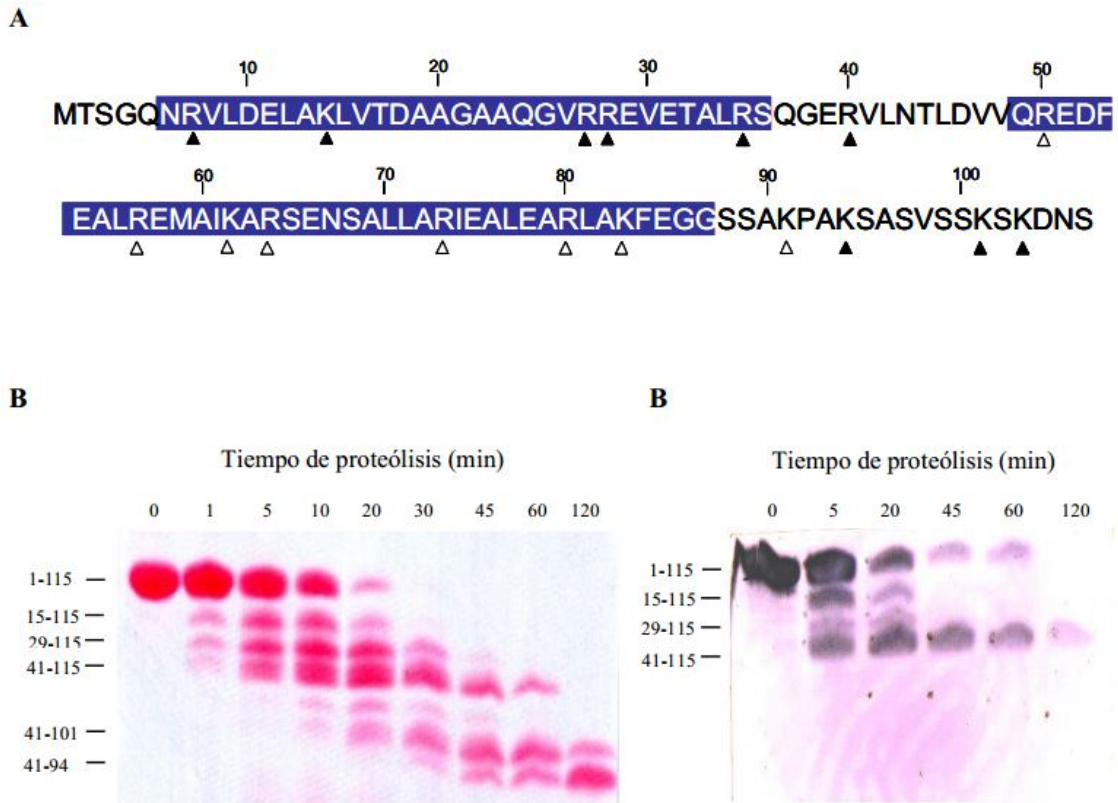


Figura 1.6. Proteólisis limitada de livA. (A) Secuencia de livA en donde se indican con triángulos los sitios de corte predichos para tripsina. En triángulos negros se muestran los sitios que fueron efectivamente reconocidos por tripsina y en blanco los resistentes a la proteólisis. (B) Membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau en donde se muestran los péptidos producidos por la digestión de livA con tripsina detenida a distintos tiempos. A la izquierda de la membrana se indican los rangos de la secuencia de los fragmentos peptídicos obtenidos. En la numeración de los péptidos se incluyen las seis histidinas y tres residuos adicionales que introduce el vector de expresión en el C-terminal de la proteína, por lo que la proteína posee 115 aminoácidos totales. (C) *Western blot*, revelado con un anticuerpo anti-histidina, de los productos de proteólisis, en donde se pueden identificar los fragmentos proteolíticos que conservan las histidinas C-terminal. Se indican los péptidos obtenidos de la misma manera que en (B).

1.4. Estructura secundaria de livA y sus dominios.

Con el objetivo de analizar el contenido de estructura secundaria de livA y sus dominios se realizaron experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular (CD). El espectro de CD de livA e livA-C medido en Tris/HCl pH 8.0 exhibe dos mínimos, uno a 208 nm y otro a 222 nm, lo cual es característico de proteínas en la que prevalecen estructuras α -hélices (Figura 1.7 A). El porcentaje de estructura secundaria en cada una de estas proteínas fue estimado por el programa K2D, obteniéndose un 30% de α -hélice para livA y un 70% para livA-C (Tabla 1.2). Dicho resultado concuerda con los porcentajes de α -hélice que se predicen para livA y livA-C mediante los programas de predicción de estructura secundaria, si se tiene en cuenta que solo se está formando la α -hélice coiled-coil de la

mitad C-terminal, los cuales son 34% y 70% respectivamente. Por otro lado, el espectro de livA-N es característico de proteínas con dominios pobremente estructurados (random coil). El espectro teórico de livA-N obtenido mediante el cálculo de la diferencia entre el espectro de livA y livA-C es prácticamente idéntico al obtenido experimentalmente, lo que indica que este dominio no es estabilizado por estar contiguo al dominio C-terminal o por encontrarse formando parte de una proteína trimérica, siendo por lo tanto un dominio intrínsecamente desordenado. Este resultado concuerda con el hecho de que el dominio N-terminal es más susceptible a la proteólisis por tripsina.

Con el fin de investigar la estabilidad de livA y sus dominios se realizaron experimentos de desnaturalización térmica mediante el monitoreo de la elipticidad molar a 222 nm en función de la temperatura. El punto medio de desnaturalización térmica o temperatura de melting (T_m) de livA fue 58.2°C y el de livA-C fue 59.6°C (Figura 1.7 B). La transición conformacional de ambas proteínas fue completamente reversible, dado que al disminuir nuevamente la temperatura las proteínas se repliegan totalmente. La T_m de livA-N no pudo ser obtenida bajo las condiciones ensayadas debido a que la proteína no presenta estructura secundaria definida.

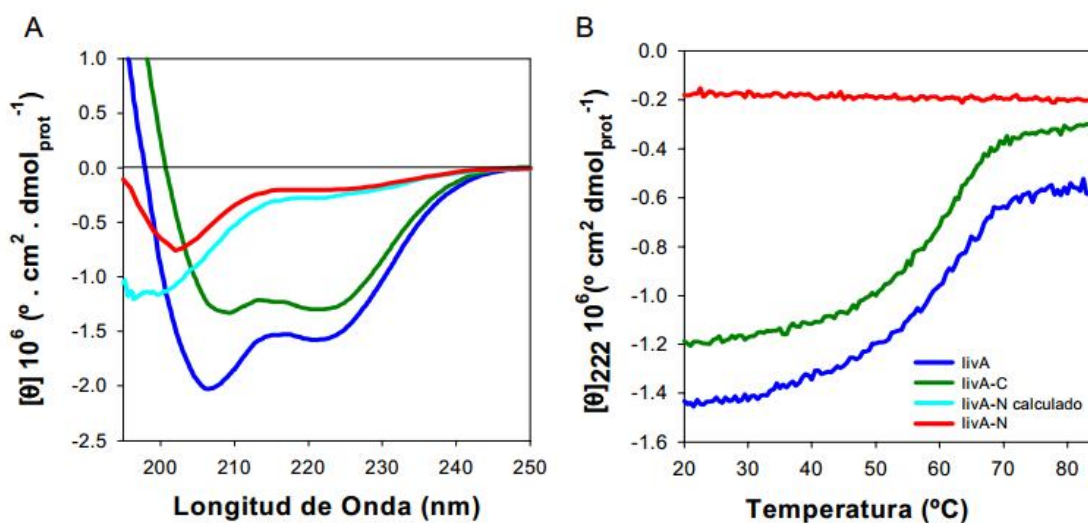


Figura 1.7. Estructura secundaria y estabilidad térmica de livA y sus dominios. (A) Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de livA, livA-N, livA-C e livA-N calculado por la resta entre el espectro de livA y el de livA-C. (B) Curvas de desnaturalización térmica obtenidas por la medida de la elipticidad molar a 222 nm en función de la temperatura. La temperaturas de melting obtenidas para livA e livA-C fueron 58.2°C y 59.6°C, respectivamente. Todas las medidas fueron realizadas en 50 mM de buffer Tris/HCl pH 8.0 y 150 mM de NaCl.

Tabla 1.2. Porcentaje de estructura secundaria de livA, livA-N e livA-C obtenidas a partir del análisis de los espectros de CD con el programa K2D.

	<i>α-hélice</i>	<i>Hoja β</i>	<i>Random coil</i>
livA	30	16	54
livA-N	8	45	47
livA-C	70	3	26

1.5. Inducción de estructura secundaria en diferentes condiciones

Se ha observado que las proteínas que poseen dominios intrínsecamente desordenados se encuentran involucradas en una gran variedad de funciones y que frecuentemente sufren transiciones conformacionales en donde los dominios desestructurados adquieren una estructura específica al encontrarse con su ligando natural o ante cambios en el entorno (Romero, Obradovic et al. 1997; Uversky 2002). Acorde a los resultados obtenidos previamente se decidió investigar los probables cambios conformacionales que puedan ocurrir en livA, livA-C e livA-N ante la presencia de diferentes aditivos y condiciones en el entorno, mediante la técnica de dicroísmo circular. En la tabla 1.3 se muestra un resumen de los resultados en las condiciones ensayadas y a continuación se detalla cada experimento.

1.5. a. Efecto del pH:

En primer lugar se estudió el comportamiento de livA con la variación del pH, para ello se incubó la proteína en buffers cuyos pH variaron desde 2 hasta 10 y se midió el espectro de CD en cada condición. El pH en el que observó el mayor aumento de la elipticidad molar a 222 nm, lo que indica un aumento en el porcentaje de estructura α -hélice en la proteína, fue pH 4. En esta condición de pH de máxima inducción de estructura también se midió el espectro de livA-C e livA-N. En la figura 1.8 se puede observar que si bien la elipticidad de livA aumenta considerablemente a pH 4 comparada con el espectro de referencia en Tris/HCl pH 8.0, el espectro de los dominios por separado, livA-N e livA-C, no aumenta significativamente. Esto probablemente se deba a

que para que ocurra la inducción de estructura, sea necesario que los dos dominios actúen en forma cooperativa o que para que se forme la α -hélice predicha en el N-terminal sea necesario que la proteína se encuentre en forma trimérica.

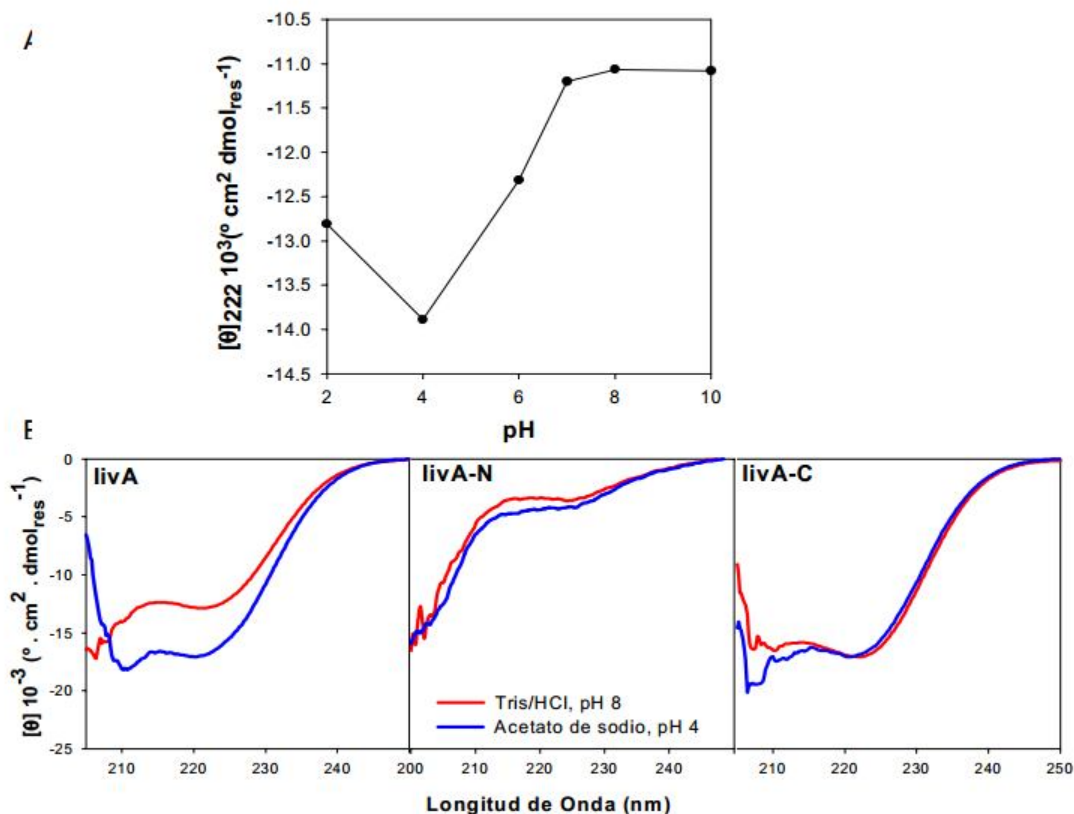


Figura 1.8. Efecto del pH sobre la estructura secundaria de livA y sus dominios. (A) Elipticidad molar a 222 nm medida en función del pH. livA se incubó en los siguientes buffers durante 15 minutos antes de medir el espectro de CD: 50 mM glicina pH 2.0, 50 mM acetato de sodio pH 4.0, 50 mM fosfato de sodio pH 6.0, 50 mM fosfato de sodio pH 7.0, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM Tris/HCl pH 10.0. (B) Espectro de CD en el UV lejano de livA, livA-N e livA-C en presencia de 50 mM Tris/HCl pH 8.0 o 50 mM acetato de sodio pH 4.0.

1.5. b. Efecto de diferentes sales:

El efecto de la fuerza iónica sobre livA fue testado utilizando sales de sodio de tres iones diferente: cloruro, sulfato y fosfato. En la figura 1.9 A se puede observar la medida de la elipticidad molar a 222 nm de livA expuesta a las tres sales con fuerzas iónicas comparables y crecientes. Los tres iones utilizados producen un incremento de estructura de livA con respecto a la proteína en Tris/HCl pH 8.0, siendo el fosfato el que produce el máximo efecto a fuerzas iónicas comparables. Posteriormente se realizaron espectros de CD de livA, livA-C y livA-N en fosfato, sulfato y cloruro a fuerzas iónicas comparables, en la que se observó la máxima inducción de estructura (fuerza iónica 1.2 M) (Figura 1.9 B).

La presencia de fosfato de sodio produce un incremento de estructura significativo tanto en livA (43%) como en livA-N (117%). Por el contrario, sulfato y cloruro producen un incremento de la señal dicroica en livA pero no afectan la estructura de livA-N. livA-C permanece invariable en todas las condiciones. Es interesante notar que, mediante la medida de las curvas de desnaturalización termal de las proteínas, se observó que tanto livA como livA-C incrementan su T_m en presencia de fosfato y sulfato, siendo más evidente el efecto producido por fosfato. Cloruro no produce efecto sobre la estabilidad proteica ante la temperatura (Tabla 1.3). La T_m de livA-N no pudo ser medida debido a que se produce una curva no cooperativa de desnaturalización típica de proteínas pobremente estructuradas. Los resultados indican que en presencia de los iones ensayados se produce un reordenamiento de livA en la que se incrementa el contenido de α -hélice. En presencia de fosfato donde la transición es más marcada es evidente que la reestructuración ocurre en el dominio N-terminal de la proteína, mientras que aumenta la estabilidad de la región C-terminal. En el caso de sulfato y cloruro no es tan evidente dónde ocurre la transición dado que livA cambia pero sus dominios por separado no. Esto puede ser debido a que estos iones producen un menor efecto en la estructura de la proteína y que para que ocurra la transición conformacional sea necesario que los dominios actúen en forma cooperativa en la proteína trimérica.

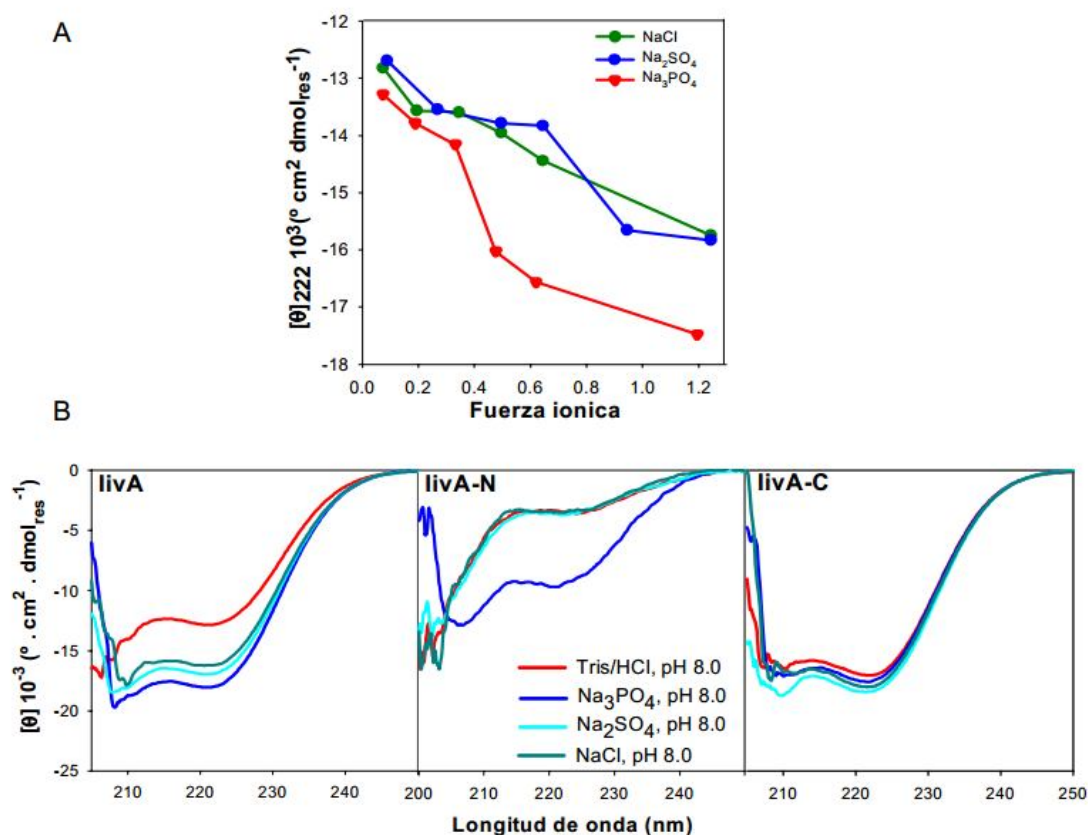


Figura 1.9. Efecto de diferentes sales en la estructura secundaria de livA y sus dominios. (A) Elipticidad molar a 222 nm medida en función de la fuerza iónica aportada por los iones de sodio: cloruro, sulfato o fosfato. livA fue incubada en distintas concentraciones de las tres sales durante 15 minutos, antes de medir el espectro de CD. (B) Espectro de CD en el UV lejano de livA, livA-N e livA-C en presencia de 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 400 mM sulfato de sodio pH 8.0, 400 mM fosfato de sodio pH 8.0 o 1.2 M cloruro de sodio pH 8.0. La fuerza iónica de cada una de las sales a la concentración indicada corresponde a 1.2M.

1.5. c. Efecto del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS):

Por último se midió el efecto del detergente iónico dodecil sulfato de sodio (SDS) sobre la estructura de livA y sus dominios. SDS es un surfactante que provee a las proteínas de un medio hidrofóbico. A concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica (CMC) 2-4 mM, el SDS se encuentra en estado monomérico y se ha descrito como un componente que mimetiza el interior de las proteínas. A concentraciones por encima de la CMC, o sea superior a 4 mM, el SDS se encuentra formando micelas y es usado para mimetizar bicapas lipídicas cargadas negativamente (Blondelle, Lohner et al. 1999).

En presencia de SDS se observa un incremento significativo en la elipticidad molar a 222 nm de livA aun a concentraciones muy pequeñas (Figura 1.10 A). Al medir el espectro de CD de livA, livA-N e livA-C en presencia de 5 mM de SDS se puede observar un incremento significativo en la elipticidad molar a 222 nm de livA e livA-N (19.3% y 310% respectivamente) mientras que livA-C permanece invariable (Figura 1.10 B). Estos resultados indicarían que se produce una transición estructural de random coil a α -hélice en el dominio N-terminal de livA en presencia de SDS. La T_m en presencia de SDS no pudo ser medida debido a la producción de una curva no cooperativa (Tabla 1.3).

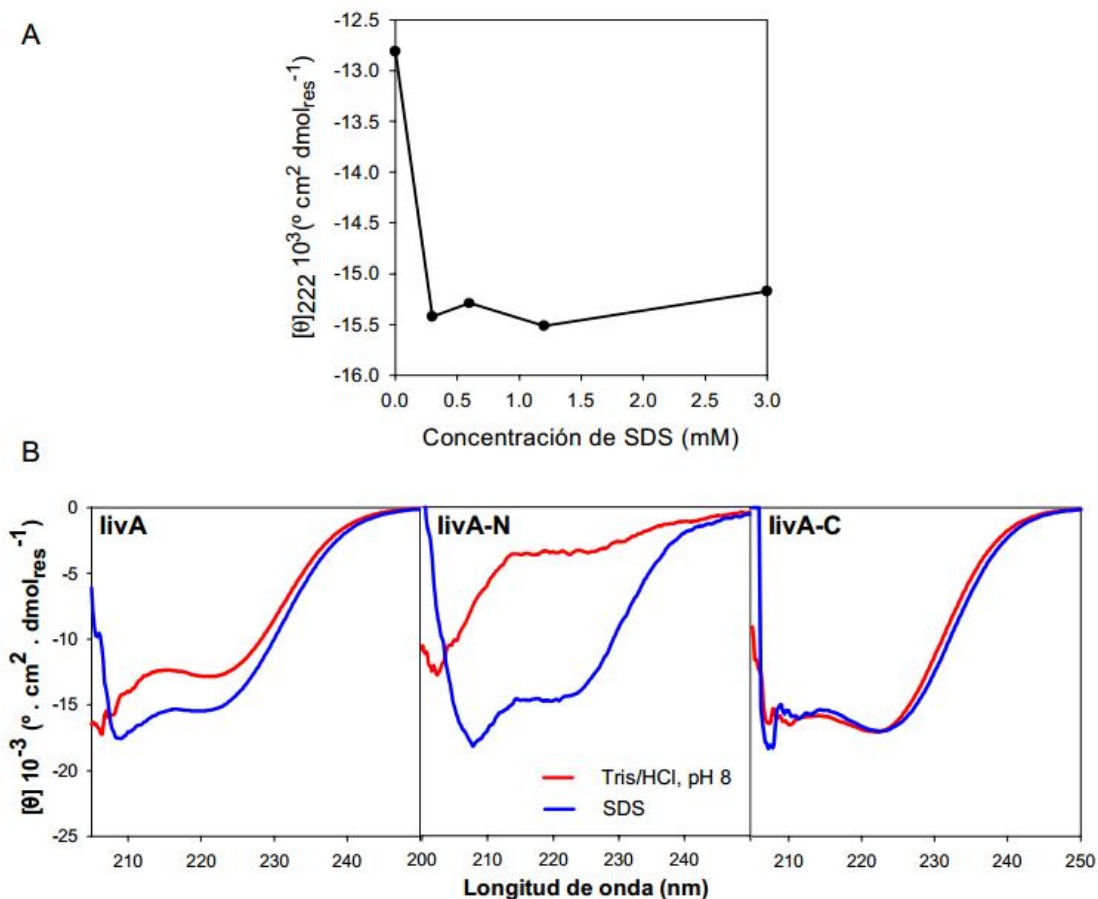


Figura 1.10. Efecto del detergente SDS sobre la estructura secundaria de livA y sus dominios. (A) Elipticidad molar a 222 nm medida en función de la concentración de SDS. livA se incubó en distintas concentraciones de SDS durante 15 minutos antes de medir el espectro de CD. (B) Espectro de CD en el UV lejano de livA, livA-N e livA-C en presencia de 50 mM Tris/HCl pH 8.0 y 5 mM de SDS.

Tabla 1.3. Incremento de la señal de CD a 222 nm de livA, livA-N y livA-C en las distintas condiciones ensayadas con respecto a la señal de cada proteína medida en 50 mM Tris/HCl pH 8.8 y temperatura de melting en cada condición. Comparar las Tm presentadas con la Tm de livA e livA-C obtenidas en presencia de 50 mM Tris/HCl pH 8.0, las cuales fueron 58.2 y 59.6°C, respectivamente. nd indica que la Tm no pudo ser calculada.

	Incremento de elipticidad molar a 222 nm (%)			Temperatura de melting (°C)	
	IivA	IivA-N	IivA-C	IivA	IivA-C
0.4 M fosfato de sodio, pH 8.0	40.3	171.7	3	69.7	75.3
0.4 M sulfato de sodio, pH 8.0	31.8	6.6	7.6	62.6	66.1
1.2 M cloruro de sodio, pH 8.0	26.4	0.8	5.4	56.6	57.2
50 mM acetato de sodio, pH 4.0	31.3	20	0	nd	nd
5 mM SDS, pH 8.0	19.3	310.8	0	nd	nd

1.6. Determinación de la localización subcelular de la proteína livA en *Brucella abortus*

El conocimiento de la localización subcelular de una proteína puede dar indicios de la función que esta cumple en la bacteria, dado que por ejemplo proteínas que interactúen tempranamente con el hospedador deberían localizarse principalmente en la membrana externa de la bacteria o ser secretadas. Por lo tanto, se realizaron experimentos para determinar la localización subcelular de livA en *Brucella abortus*.

Para determinar la localización subcelular de livA se utilizó un cultivo de *B. abortus* S2308 crecido a fase exponencial tardía. El cultivo bacteriano fue centrifugado, el pellet obtenido fue resuspendido en buffer fosfato salino y lisado, de manera de obtener un extracto proteico. El lisado proteico fue separado de restos celulares y sometido a ultracentrifugación a 100.000 xg. Este tipo de fraccionamiento permite detectar las proteínas totales en dos fracciones: el sobrenadante en el que se localizan las proteínas citoplasmáticas y periplásmicas solubles y el pellet en el que se localizan las proteínas de membrana insolubles. En la figura 1.11 A se muestra un western blot revelado con un anticuerpo policlonal anti-livA, de las fracciones obtenidas después de la ultracentrifugación. Se puede observar que livA localiza principalmente junto con las proteínas solubles, aunque una porción de la proteína fracciona junto con las proteínas de membrana. Para determinar si el fraccionamiento fue realizado correctamente, las fracciones fueron sometidas a western blot con dos anticuerpos dirigidos contra proteínas de localización subcelular conocida: Bp26, una proteína periplásmica soluble; y Omp19, una proteína de membrana (Tibor, Wansard et al. 2002; Kumar, Tuteja et al. 2007).

Mediante estos controles se corroboró que la fracción de membrana no se encuentra contaminada con proteínas citoplasmáticas y periplásmicas, dado que Bp26 se localiza exclusivamente en la fracción soluble. Omp19 se localiza en la fracción de membrana, si bien una pequeña cantidad localiza con las proteínas solubles. Esto no es extraño si se tiene en cuenta que la pre-proteína que dará lugar a Omp19 es sintetizada en el citoplasma y transportada a través del periplasma antes de llegar a su localización final en la membrana bacteriana (Figura 1.11 B y C).

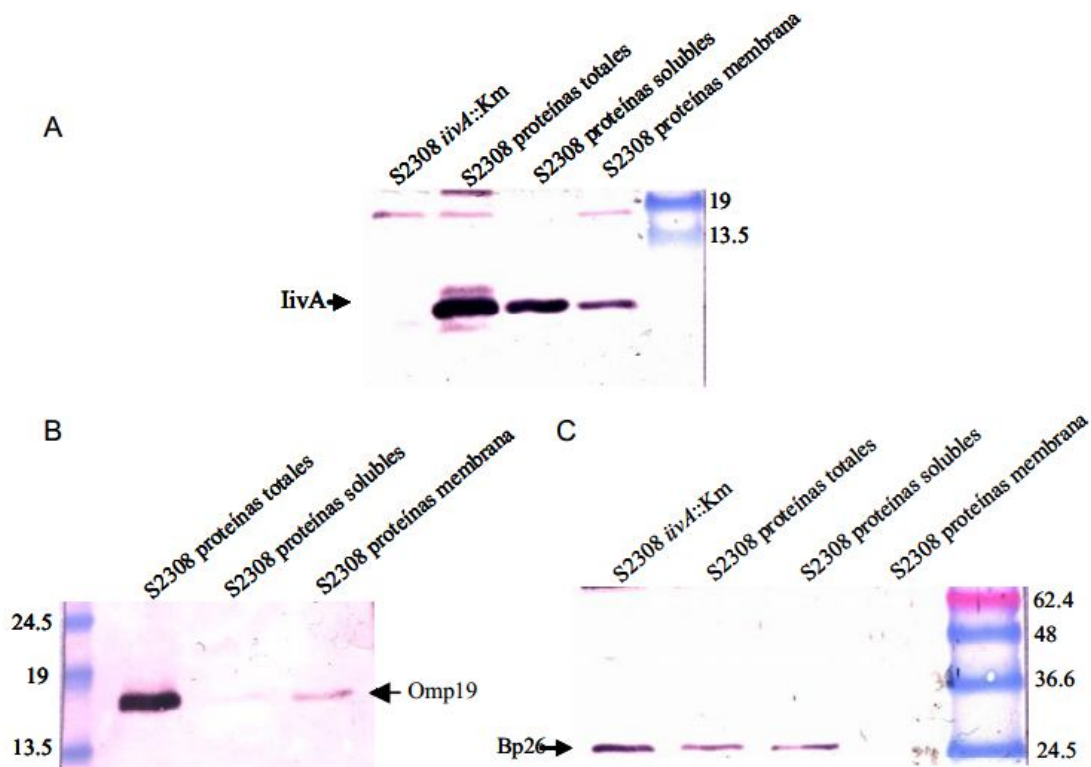


Figura 1.11. Western blot del fraccionamiento subcelular revelados con anticuerpos dirigidos contra (A) *livA*, (B) Omp19 y (C) Bp26. Los fraccionamientos fueron realizados con lisados proteicos obtenidos a partir de *Brucella abortus* cepa 2308 y en algunos geles también se muestra un lisado de la cepa de *B. abortus* 2308 mutante en el gen *iivA*. Al costado de los geles se muestra el peso molecular en KDa.

Discusión

Los resultados presentados en este capítulo evidencian que livA es una proteína trimérica que posee dos dominios estructurales: un dominio C-terminal coiled-coil por el cual homo-oligomeriza y un dominio N-terminal que puede ser clasificado como intrínsecamente desordenado en condiciones fisiológicas.

Las predicciones de livA de formar una α -hélice coiled-coil en el C-terminal y una α -hélice anfipática en el N-terminal, están conservadas en la mayoría de las proteínas pertenecientes al COG2960. Esto manifiesta la importancia de los motivos mencionados para la estructura y función biológica de dichas proteínas y sugiere que las propiedades descritas aquí para livA de *Brucella abortus* pueden ser compartidas entre los miembros del COG 2960.

El dominio C-terminal de livA posee las repeticiones heptaméricas clásicas de los motivos coiled-coil, como aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones a y d y aminoácidos polares en el resto de las posiciones. Si bien se ha demostrado experimentalmente que livA trimeriza, el análisis de su secuencia con el programa Multicoil predice una alta probabilidad de formación de dímeros. Este programa se basa en la comparación con bases de datos, donde está registrada la abundancia de residuos encontrados en proteínas coiled-coil dimericas o triméricas y presta particular importancia a los residuos ubicados en las posiciones a y d. Sin embargo, para establecer el estado de oligomerización de un coiled-coil, son importantes también las posiciones e y g (Alberti, Oehler et al. 1993; Beck, Gambee et al. 1997; Kammerer, Schulthess et al. 1998). En el caso livA la discrepancia observada entre la predicción y el resultado experimental se puede explicar por la ocurrencia de aminoácidos anómalos en las posiciones a y d, que no están bien representados en las bases de datos. Es interesante notar la presencia de fenilalanina en la posición a (F53) y en la posición d (F84) del coiled-coil de livA, lo cual no es observado comúnmente en las proteínas con dominios coiled-coil. Sin embargo, se ha observado por estudios de mutagénesis sitio dirigida que es posible introducir fenilalanina en las posiciones a y d de coiled-coils triméricos y obtener una proteína bien plegada y estable (Tripet, Wagschal et al. 2000).

Previamente se ha observado que muchas proteínas coiled-coil cortas predichas como dimericas son en realidad triméricas, como ocurre con la proteína asociada a actina Coronina 1. En una publicación reciente se propuso que las regiones coiled-coil triméricas pequeñas tienen un motivo de trimerización conservado. Este motivo está constituido de arginina en la posición 1, glutámico en la posición 6, residuos hidrofóbicos en las posiciones 2 y 5 y cualquier aminoácido en las posiciones 3 y 4 (R1-h2-X3-X4-h5-E6). En la región C-terminal de livA, este motivo está presente dos veces: una entre los aminoácidos R73-E78 y otra entre los aminoácidos R80-E85 (Kammerer, Kostrewa et al. 2005).

Otra particularidad de esta región es la asparagina N67. Este tipo de residuos es tres veces más frecuentemente encontrado en coiled-coil de dos cadenas que en los de tres cadenas (Woolfson and Alber 1995). La presencia de residuos polares en el core hidrofóbico de regiones coiled-coil, le imparten a las proteínas especificidad en cuanto a su plegamiento a expensas de perder estabilidad (Eckert, Malashkevich et al. 1998). Se ha reportado que cuando se muta una asparagina que se encuentra en el core hidrofóbico del coiled-coil dimérico del regulador transcripcional de levaduras GCN4, se produce una inespecificidad del estado de oligomerización, produciéndose una mezcla de estructuras diméricas y triméricas. La especificidad estructural que imparte la asparagina mencionada de la proteína GCN4, se atribuye a que en el coiled-coil trimérico no están optimizados los enlaces de hidrógeno entre las asparaginas de las hélices enfrentadas, mientras que en la conformación dimérica sí (Gonzalez, Plecs et al. 1996; Gonzalez, Woolfson et al. 1996). En el caso de livA, es posible que la presencia de alanina en las capas a y d precedentes a N67 (A60 y A63) pueda facilitar el acercamiento de las hélices en el eje axial del coiled-coil, optimizando los enlaces de hidrógeno de las asparaginas internas. Además, se ha visto que la presencia de residuos polares en el interior hidrofóbico de coiled-coils triméricos, puede estar involucrada en la unión a aniones (Eckert, Malashkevich et al. 1998), por lo que sería interesante investigar si N67 está involucrada en la estabilización del C-terminal de livA producida por fosfato, observado experimentalmente.

No se disponen de evidencias experimentales para discernir si la orientación del coiled-coil trimérico de livA es paralelo o antiparalelo, si bien la orientación paralela es la más abundante en las proteínas conocidas. Sin embargo, la presencia de asparagina en el interior del coiled-coil favorece la orientación paralela de las hélices, dado que de este modo las asparaginas estarían enfrentadas en el interior del core hidrofóbico, pudiendo establecer enlaces de hidrógeno, mientras que si las hélices estuvieran en orientación antiparalela no se podrían establecer estas interacciones. En base a esto se construyó un modelo de la estructura de la región C-terminal coil-coil de livA presentado, en la figura 1.12. En este modelo se puede observar que, además de la estabilización de las tres hélices por interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno en las capas a y d internas, se pueden establecer tres interacciones electrostáticas (puentes salinos) entre los residuos cargados de las posiciones e y g que son: D52 y R57, R73 y E78 y R80 y E85.

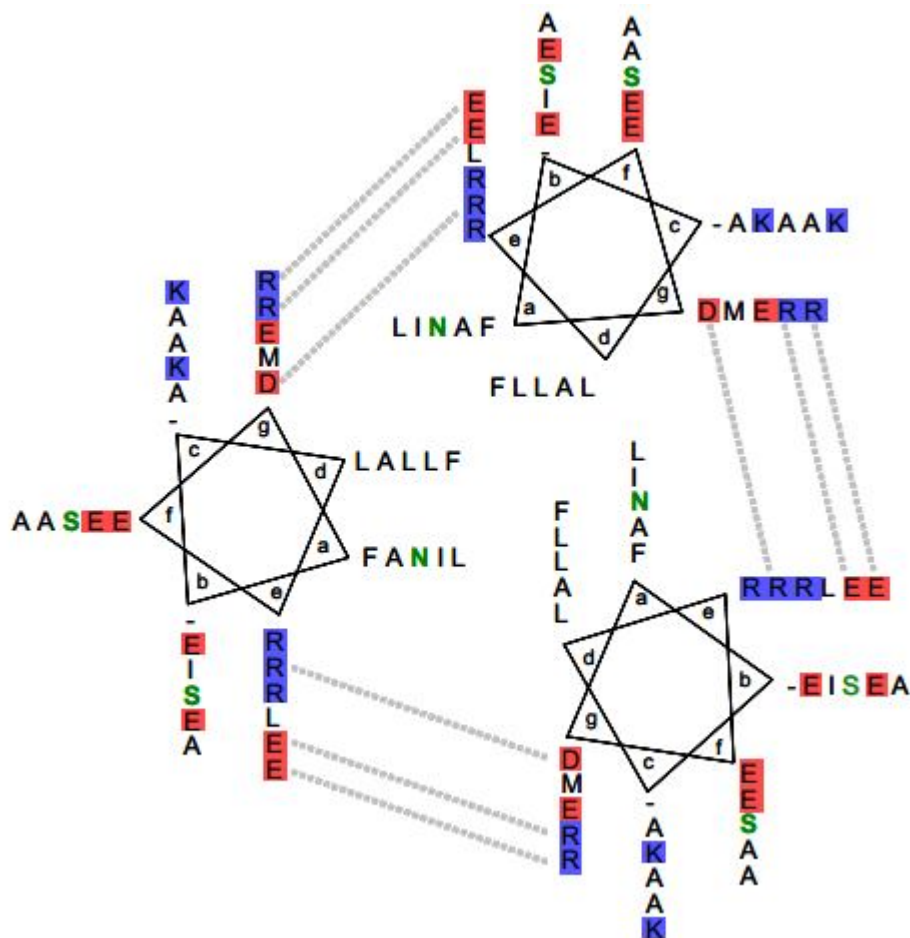


Figura 1.12. Modelo para el coiled-coil C-terminal trimérico de livA. Se muestran los residuos hidrofóbicos en letras negras, los polares sin carga en letras verdes, los cargados positivamente en fondo azul y los cargados negativamente en fondo rojo. Con líneas punteadas grises se muestran los pares de residuos de las posiciones g y e que pueden tener interacciones electrostáticas.

El dominio N-terminal de livA es un dominio intrínsecamente desordenado y al igual que lo que ocurre con muchas proteínas que tienen dominios de esta naturaleza, transcurren en él cambios conformacionales que producen estructuras ordenadas en diferentes condiciones. En las proteínas intrínsecamente desordenadas estos restructuramientos ocurren cuando se encuentran con sus ligandos naturales o en medios que mimetizan condiciones en los que estas proteínas son activas o donde necesitan cambiar su conformación para ejercer alguna función biológica (Wright and Dyson 1999). El cambio estructural más evidente observado en el N-terminal de livA es producido por fosfato de sodio y por el detergente iónico SDS. Además, aunque no se ha observado un efecto evidente en la estructura de livA-N (sí se vio en livA) con los iones sulfato, cloruro y el pH ácido, probablemente ellos también produzcan el reordenamiento del N-terminal. La

transición conformacional observada es de random coil a α -hélice y probablemente, como es predicho en el modelo helical wheel presentado anteriormente, esta hélice tenga propiedades anfipáticas.

Un ejemplo similar al del dominio N-terminal de livA, ocurre con el dominio de activación transcripcional inducible por quinasa de CREB, llamado KID. El polipéptido KID es intrínsecamente desordenado, ya sea en forma aislada o formando parte de CREB. Cuando KID se encuentra con su ligando, CBP, ocurre un cambio conformacional que conlleva a la formación de una hélice anfipática (Campbell and Lumb 2002; Vendel, McBryant et al. 2003).

Otro ejemplo está dado por algunos péptidos antimicrobianos, como melitina, alameticina y cecropin A. Estos péptidos existen como estructuras desordenadas en soluciones acuosas y se pliegan como estructuras α -hélices en presencia de solventes hidrofóbicos o membranas lipídicas. Los péptidos antimicrobianos α -hélice frecuentemente son anfipáticos, lo que permiten que se absorban o se inserten en la membrana blanco, formando un grupo de α -hélices que conlleva al efecto citolítico que permite la destrucción de la célula (Blondelle, Lohner et al. 1999).

La caracterización estructural de livA realizada hasta el momento permite inferir el modelo presentado en la figura 1.13. Este modelo abarca la estructura trimérica del C-terminal y los posibles cambios conformacionales que se producirían en el N-terminal. livA tiene una zona aproximadamente en el medio de la secuencia aminoacídica de la proteína, después de la α -hélice N-terminal y antes del coiled-coil C-terminal, que no se predice como parte de ningún tipo de estructura, esta zona en el modelo presentado se propone que actúa como un segmento flexible que une los dos dominios.

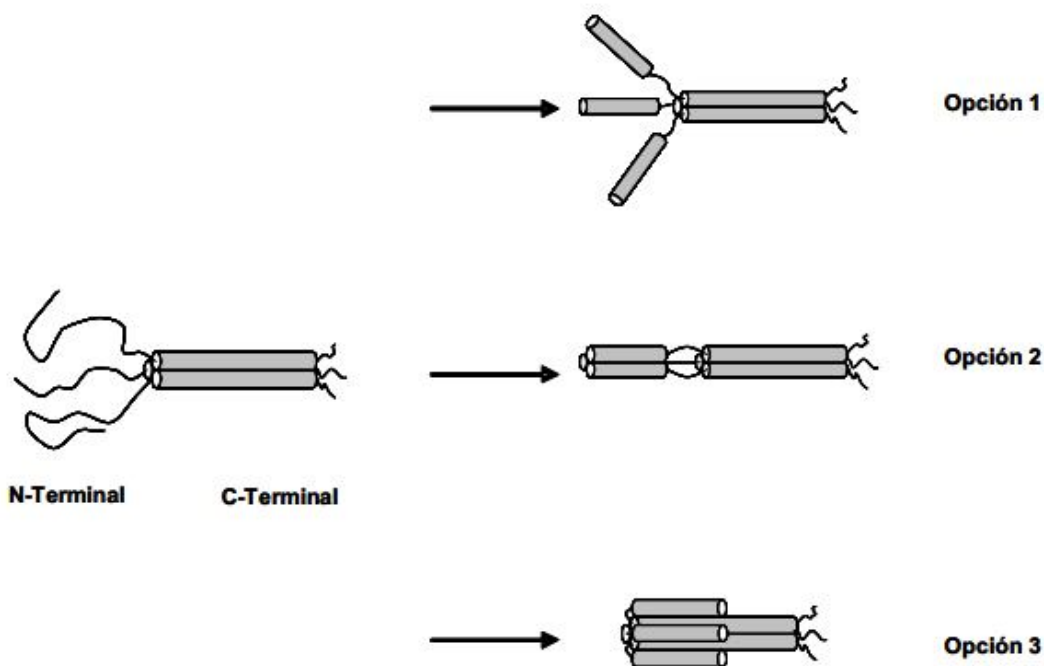


Figura 1.13. Modelo que representa la conformación hipotética de livA en condiciones fisiológicas (izquierda) y las posibles conformaciones que podría adquirir al formarse la α -hélice N-terminal en presencia de fosfato y SDS.

Bibliografía

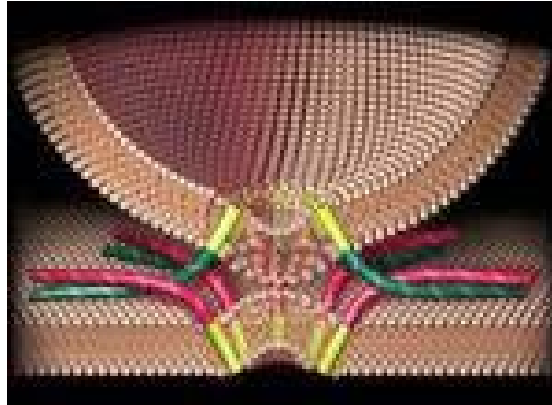
- Alberti, S., S. Oehler, et al. (1993). "Genetic analysis of the leucine heptad repeats of Lac repressor: evidence for a 4-helical bundle." *Embo J* **12**(8): 3227-36.
- Beck, K., J. E. Gambee, et al. (1997). "A single amino acid can switch the oligomerization state of the alpha-helical coiled-coil domain of cartilage matrix protein." *Embo J* **16**(13): 3767-77.
- Berger, B., D. B. Wilson, et al. (1995). "Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(18): 8259-63.
- Bjelic, S., A. Karshikoff, et al. (2006). "Stability and folding/unfolding kinetics of the homotrimeric coiled coil Lpp-56." *Biochemistry* **45**(29): 8931-9.
- Blondelle, S. E., K. Lohner, et al. (1999). "Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity." *Biochim Biophys Acta* **1462**(1-2): 89-108.
- Campbell, K. M. and K. J. Lumb (2002). "Structurally distinct modes of recognition of the KIX domain of CBP by Jun and CREB." *Biochemistry* **41**(47): 13956-64.
- Crick, F. H. (1952). "Is alpha-keratin a coiled coil?" *Nature* **170**(4334): 882-3.
- Delahay, R. M. and G. Frankel (2002). "Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited." *Mol Microbiol* **45**(4): 905-16.
- Dosztanyi, Z., V. Csizmok, et al. (2005). "The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins." *J Mol Biol* **347**(4): 827-39.
- Dutch, R. E., T. S. Jardetzky, et al. (2000). "Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis." *Biosci Rep* **20**(6): 597-612.
- Dyson, H. J. and P. E. Wright (2005). "Intrinsically unstructured proteins and their functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(3): 197-208.
- Eckert, D. M., V. N. Malashkevich, et al. (1998). "Crystal structure of GCN4-pIQI, a trimeric coiled coil with buried polar residues." *J Mol Biol* **284**(4): 859-65.
- Frank, S., A. Lustig, et al. (2000). "A distinct seven-residue trigger sequence is indispensable for proper coiled-coil formation of the human macrophage scavenger receptor oligomerization domain." *J Biol Chem* **275**(16): 11672-7.
- Gatfield, J., I. Albrecht, et al. (2005). "Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules." *Mol Biol Cell* **16**(6): 2786-98.
- Gonzalez, L., Jr., J. J. Plecs, et al. (1996). "An engineered allosteric switch in leucine-zipper oligomerization." *Nat Struct Biol* **3**(6): 510-5.

- Gonzalez, L., Jr., D. N. Woolfson, et al. (1996). "Buried polar residues and structural specificity in the GCN4 leucine zipper." *Nat Struct Biol* **3**(12): 1011-8.
- Gruber, M. and A. N. Lupas (2003). "Historical review: another 50th anniversary--new periodicities in coiled coils." *Trends Biochem Sci* **28**(12): 679-85.
- Hakansson, K., N. K. Lim, et al. (1999). "Crystal structure of the trimeric alpha-helical coiled-coil and the three lectin domains of human lung surfactant protein D." *Structure* **7**(3): 255-64.
- Harbury, P. B., P. S. Kim, et al. (1994). "Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer." *Nature* **371**(6492): 80-3.
- Hayward, R. D., E. J. McGhie, et al. (2000). "Membrane fusion activity of purified SipB, a Salmonella surface protein essential for mammalian cell invasion." *Mol Microbiol* **37**(4): 727-39.
- Hume, P. J., E. J. McGhie, et al. (2003). "The purified Shigella IpaB and Salmonella SipB translocators share biochemical properties and membrane topology." *Mol Microbiol* **49**(2): 425-39.
- Iakoucheva, L. M. and A. K. Dunker (2003). "Order, disorder, and flexibility: prediction from protein sequence." *Structure* **11**(11): 1316-7.
- Kammerer, R. A., D. Kostrewa, et al. (2005). "A conserved trimerization motif controls the topology of short coiled coils." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39): 13891-6.
- Kammerer, R. A., T. Schulthess, et al. (1998). "Tenascin-C hexamer assembly is a sequential two-step process initiated by coiled-coil alpha-helices." *J Biol Chem* **273**(17): 10602-8.
- Karimova, G., J. Pidoux, et al. (1998). "A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10): 5752-6.
- Kodama, T., M. Freeman, et al. (1990). "Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils." *Nature* **343**(6258): 531-5.
- Kumar, S., U. Tuteja, et al. (2007). "Generation and characterization of murine monoclonal antibodies to recombinant 26-kDa periplasmic protein of *Brucella abortus*." *Hybridoma (Larchmt)* **26**(5): 322-7.
- Lindblom, A., N. Quadt, et al. (1999). "The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is assembled into trimers via a coiled-coil alpha-helix." *J Biol Chem* **274**(10): 6374-80.
- Lupas, A. (1996). "Coiled coils: new structures and new functions." *Trends Biochem Sci* **21**(10): 375-82.
- Lupas, A., M. Van Dyke, et al. (1991). "Predicting coiled coils from protein sequences." *Science* **252**(5010): 1162-4.

- Lupas, A. N. and M. Gruber (2005). "The structure of alpha-helical coiled coils." *Adv Protein Chem* **70**: 37-78.
- Mason, J. M. and K. M. Arndt (2004). "Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications." *ChemBiochem* **5**(2): 170-6.
- Mitra, N., S. Sinha, et al. (2005). "Analysis of the peanut agglutinin molten globule-like intermediate by limited proteolysis." *Biochim Biophys Acta* **1725**(3): 283-9.
- Pan, O. H. and K. Beck (1998). "The C-terminal domain of matrilin-2 assembles into a three-stranded alpha-helical coiled coil." *J Biol Chem* **273**(23): 14205-9.
- Park, Y. C., V. Burkitt, et al. (1999). "Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2." *Nature* **398**(6727): 533-8.
- Pauling, L. and R. B. Corey (1953). "Compound helical configurations of polypeptide chains: structure of proteins of the alpha-keratin type." *Nature* **171**(4341): 59-61.
- Prilusky, J., C. E. Felder, et al. (2005). "FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded." *Bioinformatics* **21**(16): 3435-8.
- Romero, Obradovic, et al. (1997). "Sequence Data Analysis for Long Disordered Regions Prediction in the Calcineurin Family." *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* **8**: 110-124.
- Shu, W., J. Liu, et al. (2000). "Core structure of the outer membrane lipoprotein from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution." *J Mol Biol* **299**(4): 1101-12.
- Tai, L. J., S. M. McFall, et al. (2002). "Structure-function analysis of the heat shock factor-binding protein reveals a protein composed solely of a highly conserved and dynamic coiled-coil trimerization domain." *J Biol Chem* **277**(1): 735-45.
- Tibor, A., V. Wansard, et al. (2002). "Effect of omp10 or omp19 deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice." *Infect Immun* **70**(10): 5540-6.
- Tripet, B., K. Wagschal, et al. (2000). "Effects of side-chain characteristics on stability and oligomerization state of a de novo-designed model coiled-coil: 20 amino acid substitutions in position "d"." *J Mol Biol* **300**(2): 377-402.
- Uversky, V. N. (2002). "What does it mean to be natively unfolded?" *Eur J Biochem* **269**(1): 2-12.
- Vendel, A. C., S. J. McBryant, et al. (2003). "KIX-mediated assembly of the CBP-CREB-HTLV-1 tax coactivator-activator complex." *Biochemistry* **42**(43): 12481-7.
- Weis, W. I. and K. Drickamer (1994). "Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein." *Structure* **2**(12): 1227-40.
- Westwood, J. T. and C. Wu (1993). "Activation of *Drosophila* heat shock factor: conformational change associated with a monomer-to-trimer transition." *Mol Cell Biol* **13**(6): 3481-6.
- Wilkinson, J. M. (1986). *Fragmentation of Polypeptides by*

Enzimatic Methods. New York.

- Wolf, E., P. S. Kim, et al. (1997). "MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils." *Protein Sci* **6**(6): 1179-89.
- Woolfson, D. N. and T. Alber (1995). "Predicting oligomerization states of coiled coils." *Protein Sci* **4**(8): 1596-607.
- Wright, P. E. and H. J. Dyson (1999). "Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm." *J Mol Biol* **293**(2): 321-31.
- Yu, Y. B. (2002). "Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential." *Adv Drug DelivRev* **54**(8): 1113-29.
- Zuo, J., R. Baler, et al. (1994). "Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure." *Mol Cell Biol* **14**(11): 7557-68.



CAPÍTULO II

Interacción y capacidad fusogénica de livA con membranas fosfolipídicas

Introducción

2.1. Membranas biológicas

El modelo vigente para describir las bicapas lipídicas es el de mosaico fluido, introducido en 1972 por Singer y Nicholson. Este modelo muestra a la bicapa lipídica como un ambiente dinámico y de aspecto líquido, que permite el paso de moléculas a través de su estructura.

Las membranas biológicas están compuestas básicamente de lípidos (los más abundantes son los fosfolípidos) y proteínas. Los fosfolípidos poseen una estructura anfifílica, ya que su molécula consiste en una cabeza polar con un grupo fosfato y una región no polar hidrocarbonada, lo cual le atribuye la capacidad de formar bicapas espontáneamente cuando son dispersados en agua. Esto es debido a que en contacto con el agua se produce un efecto hidrofóbico, generándose agregados de lípidos con las cabezas polares en contacto con el agua y las colas hidrocarbonadas en el interior, en el cual la estructura más favorable es la bicapa lipídica.

Si bien las membranas de todos los organismos son similares en el ordenamiento de la bicapa lipídica, existen algunas diferencias. Los fosfolípidos mayoritarios de las membranas bacterianas son fosfatidilglicerol (Friedman, McIver et al.) y fosfatidiletanolamina (PE), lo cual le confiere a las mismas una carga neta negativa. Además, la superficie de las bacterias Gram negativa posee lipopolisacáridos (LPS) y la de

las Gram positiva contiene polisacáridos ácidos (ácido teicoico), lo cual incrementa la carga neta negativa. En contraste, la distribución de fosfolípidos en las células de mamíferos es asimétrica, la cara externa está compuesta principalmente por los fosfolípidos zwitteriónico fosfatidilcolina y esfingomielina, mientras que la cara interna está compuesta principalmente del fosfolípido cargado negativamente fosfatidilserina (PS). Además las membranas de los eucariotas poseen colesterol que aporta rigidez. También poseen un gran número de carbohidratos, como el ácido salicílico que está cargado negativamente, formando parte de glicoproteínas y glicoesfingolípidos que constituyen una estructura celular llamada glucocalis.

2.2 Membranas modelos

Las membranas biológicas son muy complejas, por lo que para estudiar la interacción de proteínas u otras moléculas con bicapas lipídicas se utilizan sistemas simplificados o modelos de membranas. La principal ventaja de estos sistemas es que se puede variar su composición, permitiendo determinar qué componentes son más importantes en las interacciones entre los fosfolípidos y las moléculas en estudio (Nir and Nieva 2000; Smit, Waarts et al. 2003). Los modelos de membranas más utilizados son los siguientes:

Monocapas o capas monomoleculares: la utilización de capas monomoleculares es un método sencillo pero a su vez altamente versátil. Los fosfolípidos se distribuyen formando una capa cuando son dispersados en la interfase aire-agua, situándose la parte polar hacia el agua y la parte apolar hacia el aire (Maget-Dana 1999).

Micelas: Consisten en un núcleo formado por los grupos hidrofóbicos de los lípidos, conteniendo una pequeña cantidad de agua, y rodeado de una corteza constituida por los grupos hidrófilos que se extienden en el medio acuoso.

Bicapas lipídicas: los liposomas o vesículas son los modelos de membrana más utilizados ya que la estructura en forma de bicapa lipídica de ellos es similar a la porción lipídica de las membranas celulares. Los liposomas son estructuras vesiculares submicroscópicas compuestas por moléculas anfífilas, típicamente fosfolípidos. Al ser dispersados en agua, los fosfolípidos forman bicapas donde las cadenas hidrocarbonadas se organizan de modo que se encuentran protegidas del agua, y así el sistema es termodinámicamente favorable. Las bicapas se unen de manera que dejan en su interior el contenido acuoso (New 1990). Dependiendo del número de bicapas y del tamaño del liposoma se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Liposomas multilamelares (multilamellar vesicles, MLVs): están formados por varias láminas concéntricas (entre 7 y 10) y su tamaño es muy diverso (de 100 a 1000 nm).

- Liposomas unilamelares grandes (large unilamellar vesicles, LUVs): su tamaño oscila entre 100 y 500 nm. Estos liposomas se caracterizan por tener una tensión superficial similar a la de las membranas biológicas. Los liposomas unilamelares son los modelos de membrana más utilizados para estudiar las propiedades físicas, químicas y mecánicas de las membranas biológicas.
- Liposomas unilamelares pequeños (small unilamellar vesicles, SUVs): Son liposomas de tamaño pequeño, entre 15-100 nm. Estos liposomas tienen una mayor curvatura que los LUVs, lo que les confiere una menor estabilidad. Producen poca dispersión de la luz por lo que se los puede utilizar en técnicas espectrofluorimétricas.

2.3. Proteínas que interaccionan con membrana

Aproximadamente 25-30 % de los marcos de lectura abiertos codifican para proteínas de membrana (Boyd, Schierle et al. 1998; Wallin and von Heijne 1998). Las proteínas de membrana pueden asociarse con la misma de diferente manera y según el tipo de interacción se las clasifica en dos grandes grupos: proteínas integrales de membrana (o intrínsecas) y proteínas periféricas (o extrínsecas). Las proteínas integrales de membrana tienen uno o más segmentos que penetran la bicapa fosfolipídica y tienen un alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos que interactúan con los grupos acilo de los fosfolípidos. La mayoría de las proteínas integrales de membrana atraviesan la bicapa lipídica una o varias veces y son llamadas proteínas transmembrana y a menudo tienen grandes dominios en el medio acuoso. Los dominios que atraviesan la membrana generalmente son α -hélices o múltiples hojas β . Otras proteínas integrales de membrana se unen covalentemente a ácidos grasos embebidos en la bicapa lipídica.

El otro grupo de proteínas de membranas son las periféricas, cuyo core hidrofóbico no penetra la membrana lipídica, sino que se encuentran asociadas a la superficie de la membrana por interacción con las bicapa lipídica o por interacción con proteínas integrales de membrana. Las proteínas periféricas de membranas se pueden dividir en tres clases: (1) Las proteínas tipo S que son las más superficiales y se encuentran interactuando por fuera de la región interfacial formada por los grupos fosfatos de los fosfolípidos, (2) las proteínas tipo I que penetran significativamente en la región interfacial, es decir, están al mismo nivel que los grupos fosfato de los fosfolípidos, y (3) las proteínas tipo H que llegan a la región del core de hidrocarburos de los fosfolípidos e interactúan tanto con los grupos fosfatos como con el core hidrofóbico de la membrana. Muchos polipéptidos o proteínas con regiones anfipáticas pertenecen a este último grupo (Bechinger 2000).

Existe otro grupo de proteínas, llamadas proteínas anfitrópicas (Burn 1988), que se

localizan tanto en el citosol como en la membrana. La asociación a membrana puede ser directamente a la bicapa lipídica o a través de proteínas de membrana. Esta asociación es reversible y la afinidad de unión está sujeta a regulación por cambios conformacionales producidos por fosforilación, unión a ligando o aparición transiente de un sitio de unión a membrana. Ejemplo de proteínas anfitrópicas son la fosfolipasa C, proteína quinasa C y vinculina (Johnson and Cornell 1999).

2.3.1. Toxinas formadoras de poros bacteriales

Muchas bacterias secretan polipéptidos al exterior que reconocen membranas celulares específicas y forman poros en ellas produciendo un efecto tóxico, son las llamadas toxinas formadoras de poros (PFT). Estos polipéptidos pueden existir como monómeros solubles en agua y, después de la inserción en la bicapa lipídica, formando proteínas integrales de membrana multiméricas.

Las PFT se clasifican como α -PFT o β -PFT según si forman poros transmembrana por inserción de α -hélices anfipáticas, como colicina y la toxina diftérica (DT), o si forman poros por inserción de β -hairpins anfipáticos para crear barriles β transmembrana, como la α -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, streptolisina O, antígeno protector de ántrax y aerolisina (Gouaux 1997; Gouaux 1998; Lacy and Stevens 1998; Heuck, Tweten et al. 2001).

A los fines de este capítulo se describirán las α -PFT, que poseen gran contenido de α -hélices y cuyo miembro típico es la colicina (Parker and Pattus 1993). El dominio formador de poros de esta proteína consiste de un par de α -hélices hidrofóbicas rodeadas por una cubierta externa de α -hélices anfipáticas. Cuando la toxina interactúa con la membrana, las hélices hidrofóbicas espontáneamente penetran la membrana y las hélices anfipáticas yacen paralelas a la misma con el lado hidrofóbico en dirección al core hidrofóbico de la bicapa (Lahey and Slatin 2001). Se propuso recientemente que un grupo de PFT secretadas por anémonas de mar, las actinoporinas, crean un poro transmembrana por inserción de α -hélices anfipáticas (Malovrh, Viero et al. 2003). Sin embargo en contraste a las α -PFT relacionadas con colicina, esta proteína comparte características mixtas entre las α -PFT y β -PFT. Son necesarias múltiples copias de las α -PFT semejantes a colicina para formar un poro. En el primer paso de formación del poro, la toxina reconoce a un receptor en la célula blanco, luego penetra la membrana como se describió anteriormente. Se ha propuesto que en el paso de reconocimiento de la membrana puede existir un intermediario parcialmente desplegado (molten globule), que permite que la zona hidrofóbica del polipéptido esté más expuesta a la membrana. Durante la inserción en la membrana se produce un cambio conformacional que permite que varias

hélices se unan constituyendo un manojo de hélices que dan lugar a la formación del poro (Zakharov and Cramer 2002).

2.3.2. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son un grupo de péptidos solubles en agua y en membranas, que son utilizados como protección contra microorganismos ofensivos. Estos péptidos pueden ser tóxicos solo para los microorganismos, como cecropina, magainina, dermaseptina y catelicidina, o para el microorganismo y la célula eucariota como melitina, pardaxina y LL-37 semejante a cecopina. Estos péptidos, que varían en su tamaño entre 9 a 100 aminoácidos tienen características comunes: todos están compuestos de más de 50% de aminoácidos hidrofóbicos, tienen carga neta positiva y sufren un cambio conformacional al interactuar con la membrana en donde constituyen una estructura anfipática (Boman 1991; Blondelle, Lohner et al. 1999; Lehrer and Ganz 1999). Si bien los péptidos antimicrobianos pueden interactuar con la membrana de una manera dependiente o no del receptor, el paso por el cual producen la muerte de la célula blanco siempre involucra la disrupción y aumento de la permeabilidad de la membrana de la misma. Se sugiere que estos péptidos interactúan con la pared celular o la membrana citoplasmática de las bacterias que está cargada negativamente (a diferencia de la membrana citoplasmática exterior de las células eucariota que es neutra) por medio de su carga neta positiva. Para poder interactuar con la membrana blanco deben sufrir cambios conformacionales, dado que cuando están solubles deben exponer la menor cantidad de residuos hidrofóbicos al medio y viceversa cuando están en la membrana. Para sobrellevar esto, los péptidos en su forma soluble, o están como random coils o formando oligómeros, en donde la parte hidrofóbica queda en el interior. Se han propuesto dos mecanismos para la acción de los péptidos antimicrobianos. El primero es el modelo "barrel-stave" en donde los monómeros se pliegan en la superficie de la membrana y oligomerizan, luego de que el manojo de hélices está formado, se inserta en la membrana y produce el reclutamiento de otros monómeros de manera de formar un poro transmembrana. El segundo modelo propuesto es el llamado "carpet model" en el que los péptidos llegan a la superficie de la membrana como monómeros y luego de alcanzar una determinada concentración atraviesan la membrana formando un poro que puede ser desordenado o no (Shai 1999; Devine and Hancock 2002).

2.4. Fusión de membranas

La fusión de membranas es un paso esencial de eventos tan diversos como

endocitosis, exocitosis, fertilización, entrada de virus a la célula huésped y trancositosis en células epiteliales polarizadas (White 1992; Pecheur, Sainte-Marie et al. 1999). A pesar de la diversidad funcional, todas las reacciones de fusión tienen procesos elementales en común que incluyen el contacto de las dos membranas, la unificación de las bicapas lipídicas y la apertura de un poro de fusión acuoso que luego desemboca en el mezclado del contenido acuoso de los dos compartimientos.

Se pueden distinguir al menos tres tipos de fusión: (1) la fusión extracelular e intracelular de patógenos con células hospedadoras (la más caracterizada es la fusión de virus envueltos con células), (2) la fusión extracelular de las células eucariotas (como la del espermatozoide con el oocito o la formación del sincicio de las células musculares) y (3) la fusión intracelular de organelas (que es mediada por complejos moleculares de familias proteicas conservadas).

El modelo que está actualmente vigente para explicar la fusión de las membranas lipídicas es el "stalk model" (Figura 2.1). Acorde con este modelo, el primer paso es el establecimiento de un contacto cercano entre las dos bicapas a fusionarse, para esto se deben vencer las fuerzas de hidratación repulsivas resultantes del agua asociada a las cabezas polares de los lípidos. Luego se produce una perturbación de los lípidos, que permite que una pequeña área de las monocapas proximales se curve produciendo una estructura en forma de tallo o "stalk" entre las monocapas externas de membranas opuestas. A continuación de la formación del "stalk", se postula que se forma un intermediario de hemifusión, que se define como el estado en que se produce el mezclado de las membranas lipídicas sin producirse mezclado del contenido acuoso de los compartimientos. Posteriormente se produce la dilatación del diafragma de hemifusión y la apertura de un poro de fusión acuoso. Este poro permite la difusión de pequeños solutos, como iones, a través de él. Luego el poro se expande completando la fusión de las dos membranas lipídicas. El poro de fusión puede formarse en microsegundos y expandirse totalmente en 10-20 milisegundos (Jahn, Lang et al. 2003).

Debido al gran gasto energético que conlleva la formación de los estados intermediarios en la fusión de membranas, generalmente estos no ocurren espontáneamente en membranas lipídicas libres de proteínas y son necesarias las proteínas fusogénicas.

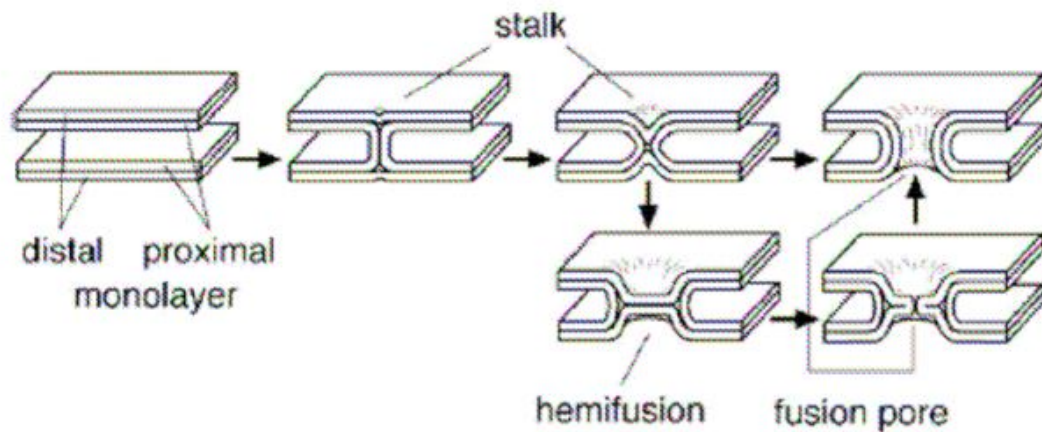


Figura 2.1. Estados de transición en la fusión de membranas según el modelo “stalk” (Reinhard Jahn et al., 2003).

2.4.1. Proteínas fusogénicas celulares

La fusión de membranas intracelulares es coordinada y específica y requiere la acción de complejos proteicos. Cada evento de fusión requiere tres componentes básicos: Rab-GTPasas que organizan el sitio de fusión; las proteínas SNARE (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor) que actúan durante la fusión; y las proteínas NSF (ethylmaleimide-sensitive factor) junto con su cofactor α -SNAP, que son requeridas para el reciclado o activación de la maquinaria de fusión. Mientras que las proteínas Rab-GTPasas median el contacto inicial de las membranas, las proteínas SNAREs son las que catalizan el proceso de fusión (Ungermann and Langosch 2005).

Las proteínas SNAREs comprenden una superfamilia proteica que tiene 24 miembros en *Saccharomyces cerevisiae* y 35 miembros en mamíferos (Bock, Matern et al. 2001; Uemura, Ueda et al. 2004). El peso molecular de estas proteínas es 10-35 KDa, con algunas excepciones, y todas conservan una región de 60-70 aminoácidos con repeticiones heptaméricas coiled-coil, llamado el motivo SNARE. La mayoría de las SNAREs tienen un dominio transmembrana, cerca del extremo C-terminal, que está conectado al dominio coiled-coil por una región corta. Hay algunas SNAREs que no tienen dominio transmembrana, algunas de las cuales tienen sitios de unión a lípidos para anclarse a la membrana y otras son proteínas solubles. Los motivos SNARE monoméricos son no estructurados en solución, pero cuando interactúan con la proteína SNARE apropiada se pliegan formando un manojito de α -hélices coiled-coil muy estable. Este manojito de α -hélices coiled-coil generalmente está formado por 4 SNAREs diferentes y dentro del core hidrofóbico del mismo se localiza un aminoácido hidrofílico conservado por

cada motivo SNARE. El aminoácido hidrofílico puede ser arginina (R) o glutamina (Q) y teniendo en cuenta esto se ha clasificado a las proteínas SNAREs como R-SNARE o Q-SNARE, respectivamente. A su vez las Q-SNARE se subdividen en Qa, Qb o Qc y cada complejo SNARE está compuesto por 3 Q-SNARE (una de cada subtipo) y un R-SNARE. A continuación del dominio SNARE hay un dominio N-terminal que es muy variable.

El mecanismo propuesto por el cual las proteínas SNARE median la fusión de membranas se basa en la interacción de SNAREs de distintos compartimientos, que permite el acercamiento de las membranas. Para ejemplificar se describirá el modelo de la exocitosis sináptica, que es el mejor caracterizado. La exocitosis sináptica involucra a las Q-SNARE Syntaxin1a y SNAP-25 (que posee dos dominios SNARE) que están ancladas a la membrana plasmática, pero sin formar un complejo. Se postula que la proteína Munc18 se une a Syntaxin1a y la mantiene en una conformación cerrada inactiva (Syntaxin1a solo es capaz de unirse a SNAP-25 en conformación abierta). Antes de unirse las tres SNAREs, los motivos SNARE de cada una de ellas están desestructurados. En el momento adecuado las tres Q-SNAREs comienzan a interactuar por su N-terminal. Subsecuentemente la R-SNARE Sinaptobrevina, que está unida a la vesícula sináptica por un dominio transmembrana, se puede unir al intermediario Q-SNARE. Durante este proceso de ensamblado, el complejo SNARE es colocado en forma paralela a las membranas produciendo el acercamiento de las dos bicapas y posteriormente la fusión de las mismas (Figura 2.2). Si hacen falta factores adicionales para este último paso aún no se conocen (Fasshauer 2003).

La fusión de membranas por proteínas SNAREs está altamente regulada, ya sea en forma negativa o positiva. Se ha visto que SNARE está regulada por la composición de lípidos de la membrana, por modificaciones postraduccionales como fosforilación y por su propio dominio N-terminal. Un ejemplo de este último caso es el dominio N-terminal de algunas Q-SNARE que forma un manojo de α -hélices antiparalelas sobre el motivo SNARE manteniendo a la proteína en una conformación cerrada que impide que se forme el complejo con otras SNAREs.

Por otro lado, existe la regulación por otras proteínas, como las proteínas SM (de la familia sec1/munc18) que regulan negativamente a las proteínas SNARE por interacción con ellas manteniéndolas en una conformación cerrada y las proteínas “tethering” que comprenden a Rab- GTPases y sus efectores que se unen a las membranas que se van a fusionar antes de que SNARE ejerza su función.

Es interesante notar la regulación producida por otras proteínas que tienen dominios coiled-coil similares a los de SNARE pero que perdieron los dominios de anclaje a membrana. Estas proteínas solubles mimetizan a proteínas SNAREs y se unen a ellas desplazando la formación del complejo SNARE endógeno. Ejemplo de estas proteínas son

tomosina y amisina que se unen a proteínas R-SNARE (Scales, Hesser et al. 2002; Hatsuzawa, Lang et al. 2003).

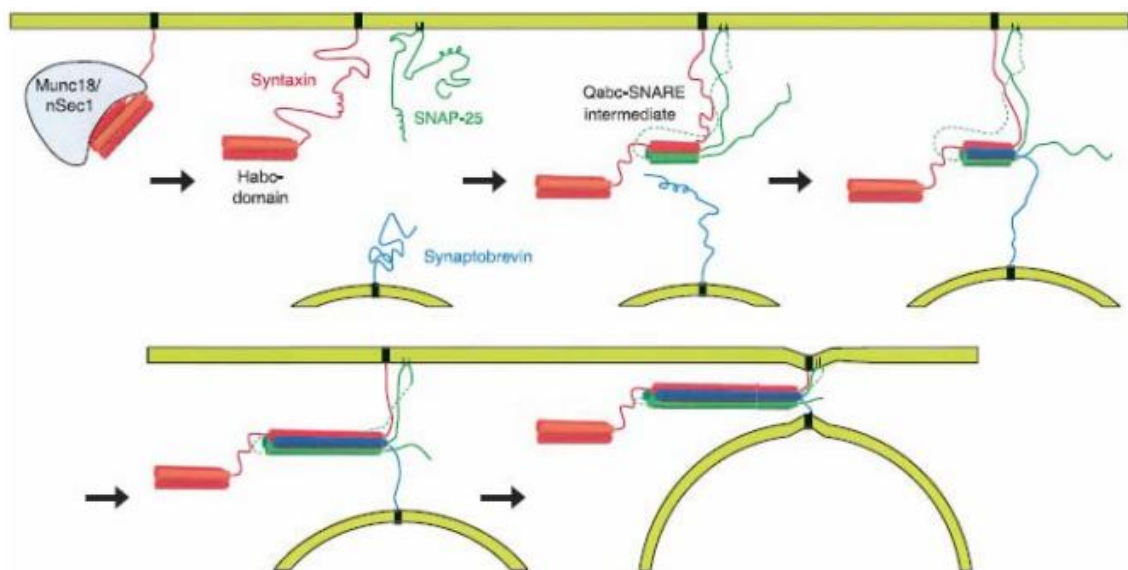


Figura 2.2. Mecanismo de yuxtaposición de membranas mediado por proteínas SNAREs, involucradas en la exocitosis sináptica, que es descrito en el texto (Fasshauer et al., 2003).

2.4.2. Proteínas Fusogénicas virales

Las proteínas fusogénicas de origen viral fueron las primeras en ser descubiertas y es donde mejor se conoce el mecanismo de fusión de membranas. En los virus envueltos el material genético está recubierto de una bicapa lipídica derivada de la célula hospedadora. Durante el proceso de infección y tras la unión a un receptor del hospedador, la membrana viral se fusiona con la membrana celular o endosomal permitiendo la entrada de la nucleocápside al citoplasma (Lentz, Malinin et al. 2000; Skehel and Wiley 2000). Este proceso de fusión es llevado a cabo por una única proteína viral, llamada la proteína de fusión. Existen dos tipos de proteínas de fusión, tipo I y tipo II. La primera esta constituida principalmente por estructuras α -hélices y la segunda por estructuras lamina β , aunque ambos tipos de proteínas de fusión actúan por mecanismos similares. Las proteínas fusogénicas más estudiadas son las glicoproteínas tipo I (Skehel and Wiley 2000; Eckert and Kim 2001).

Las proteínas de fusión de una amplia variedad de virus, como la proteína F de paramixovirus, gp160 de HIV y SIV, Env de retrovirus, Gp de ébola y la hemaglutinina de influenza, tienen características estructurales comunes. Todas contienen múltiples sitios de

glicosilación, son triméricas, tienen regiones transmembrana y sufren clivaje proteolítico y cambios conformacionales para ser fusogénicamente activas. Subsiguiente al clivaje proteolítico, se genera una región extremadamente hidrofóbica, llamada el péptido de fusión. Además, las proteínas de fusión poseen dos regiones de 3 o 4 repeticiones heptaméricas, una cerca del péptido de fusión y la otra cerca de la región transmembrana. En la estructura cristalográfica de hemaglutinina (HA) a pH ácido se observó que las repeticiones heptaméricas N-terminal forman un coiled-coil trimérico paralelo y las regiones C-terminal se apoyan sobre el coiled-coil trimérico de manera antiparalela (Bullough, Hughson et al. 1994; Chen, Skehel et al. 1999). En otras proteínas de fusión virales se observaron estructuras similares. En el caso de la hemaglutinina (HA) de influenza, se conoce la estructura de la proteína de fusión tanto en el estado fusogénicamente inactivo (a pH neutro) como en el estado fusogénicamente activo (a pH ácido). Mediante el análisis de dichas estructuras se construyó un modelo para explicar la fusión de membranas por HA (Figura 2.3 A). Cuando HA se encuentra en el endosoma celular ácido se produce un cambio conformacional que la convierte en fusogénicamente activa, en donde el péptido de fusión que estaba oculto se expone y penetra en la membrana de la célula huésped. Además los residuos 106-112, que a pH neutro eran helicoidales, a pH ácido pasan a formar una zona flexible que permite que HA se doble sobre si misma de forma de permitir que las α -hélices N-terminal se apoyen sobre las α -hélices coiled-coil C-terminal de forma antiparalela. Esta reorientación coloca al péptido de fusión y a la región transmembrana en el mismo extremo de la molécula y permite el acercamiento de las dos bicapas lipídicas (Bullough, Hughson et al. 1994). No está claro si la fusión de las membranas ocurre durante o después de este cambio conformacional (Skehel and Wiley 1998; Skehel and Wiley 2000). La proteína de fusión de HIV actúa a pH neutro, pero se propone que el proceso de fusión es similar al de HA. Para la proteína de fusión de paramixovirus, se a propuesto un mecanismo similar al de HA y la proteína de fusión de HIV, pero se sugiere por la estructura cristalográfica que el acercamiento de las dos bicapas por el dominio flexible de la proteínas de fusión no es necesario. En lugar de esto actuaría una región de 250 aminoácidos que está entre el dominio N- y C-terminal de la proteína y directamente la energía liberada por el cambio conformacional sería la que produce la fusión de las membranas (Figura 2.3 B) (Dutch, Jardetzky et al. 2000).

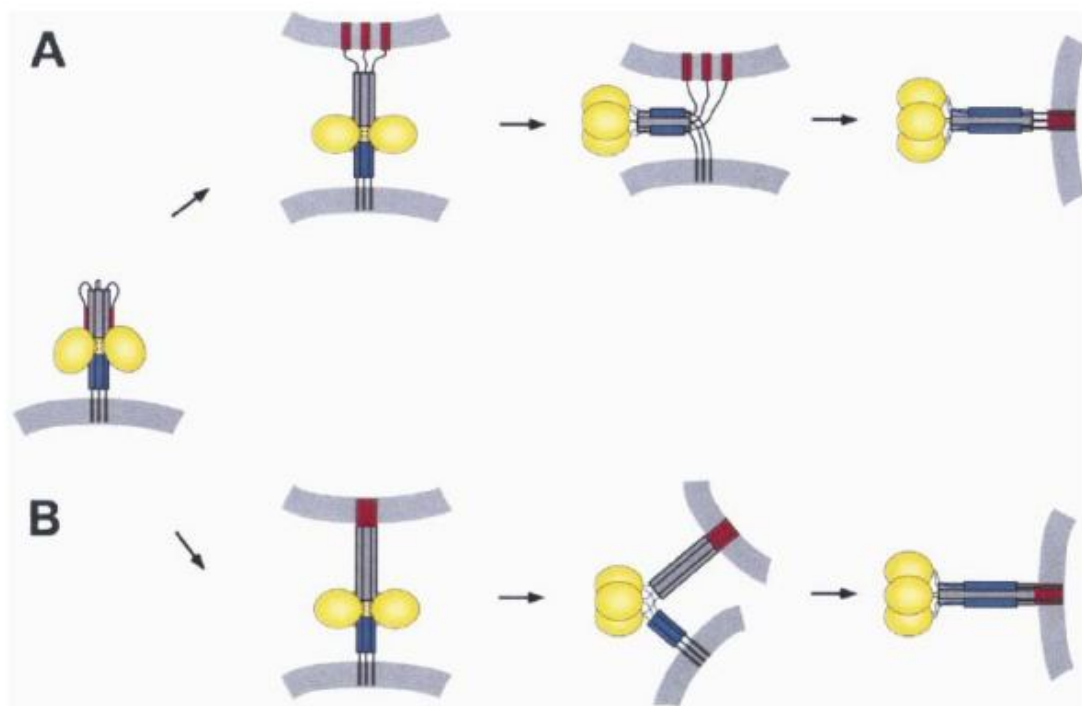


Figura 2.3. Modelos de fusión de membranas mediada por virus. (A) Modelo basado en la estructura cristalográfica de hemaglutinina de influenza y gp41 de HIV. (B) Modelo propuesto para la fusión de membranas mediada por paramixovirus (Dutch R E et al., 2000).

2.4.3. Proteínas fusogénicas bacterianas

La primera proteína procariota que se ha visto que tiene actividad fusogénica de membranas es SipB de *Salmonella* spp (Hayward, McGhie et al. 2000). SipB es una proteína de superficie esencial para la invasión de las células de mamífero y forma parte del sistema de secreción tipo III bacteriano. El sistema de secreción tipo III está presente en muchas bacterias Gram negativas patógenas y actúa como una jeringa que coloca proteínas efectoras directamente en el citoplasma del huésped. SipB es una de las proteínas efectoras de *Salmonella* spp que penetra en el citoplasma del hospedador, produciendo rearrreglos en el citoesqueleto de actina que dan comienzo a los fenómenos de la patogénesis bacteriana. En una publicación de Hayward RD et al. 2000, se realizó la caracterización estructural y se analizó la capacidad de fusionar membranas de la proteína SipB purificada. Se observó que SipB tiene un extremo N-terminal resistente a la proteólisis capaz de formar coiled-coil triméricos similares a los de las proteínas fusogénicas virales. SipB se integra tanto en la membrana celular de mamíferos como en las vesículas fosfolipídicas, sin perturbar la integridad de la membrana, e induce la fusión liposomal que es óptima a pH neutro y dependiente de la composición lipídica. Posteriormente a este trabajo, se observó que la proteína IpaB de *Shigella* spp, homóloga

a SipB, posee las mismas características estructurales y capacidad de fusionar liposomas que SipB (Hume, McGhie et al. 2003). No está clara la relación entre la actividad fusogénica de membranas y la patogenia conferida por el sistema de secreción tipo III de *Salmonella* y *Shigella*. Se cree que la actividad fusogénica descrita pueda deberse más a propiedades fisiológicas de la membrana y de la proteína purificada que puedan modular la fusión, que a lo que ocurre biológicamente durante la infección.

2.4.4. Péptidos fusogénicos sintéticos

Los polipéptidos se han utilizado ampliamente para elucidar los mecanismos de fusión de membranas, dado que son fáciles de obtener a alta concentración y mayor pureza que las proteínas fusogénicas naturales. Se ha reportado que polipéptidos sintéticos, tanto diseñados de novo como diseñados a partir de la secuencia de péptidos fusogénicos virales, son capaces de fusionar membranas lipídicas. Los polipéptidos catiónicos, como polilisina y polihistidina, son capaces de producir la fusión de liposomas cargados negativamente a pH ácido (Wang and Huang 1984; Gad, Bental et al. 1985; Walter, Steer et al. 1986). Estas polimerizaciones aminoacídicas podrían actuar mediante el establecimiento de interacciones electrostáticas con las cabezas cargadas negativamente de los fosfolípidos, lo cual produciría la desestabilización de la membrana y conllevaría a la fusión de las mismas (Erand and Lim 1995).

También, se observó la fusión de liposomas por péptidos α -hélice anfipáticos, como GALA y WAE11 (Parente, Nir et al. 1988; Pecheur, Hoekstra et al. 1997). GALA, llamado así por estar formado por motivos repetitivos de Glu, Ala, Leu y Ale, es un péptido de 30 aminoácidos que cuando está soluble a pH neutro se encuentra como random coil y cuando está a pH ácido e interaccionando con membranas forma una α -hélice anfipática. Este péptido es capaz de fusionar vesículas unilaminares pequeñas con carga negativa a pH ácido (pH 5). Por otro lado, WAE11 es un péptido anfipático de 11 aminoácidos con carga negativa, que promueve la fusión de membranas pero independientemente del pH. Si bien este péptido puede producir el mezclado de las bicapas lipídicas y del contenido interno, falla en producir el primer paso para la fusión, que es la agregación (o acercamiento) de las vesículas. Para que se produzca la fusión, se le incorpora a las vesículas lípidos acoplados a lisina. Con estos liposomas con carga positiva se puede producir la agregación y posterior fusión ante el agregado del péptido WAE11.

Materiales y métodos

2.1. Construcción de las mutantes de livA con residuos de triptófano

Las mutantes de livA con residuos de triptófano, livA-L12W e livA-S106W, fueron construidas de manera de generar proteínas de fusión a histidina idénticas a livA, salvo por el residuo de triptófano, y fueron expresadas y purificadas de igual manera a lo descrito para livA en el capítulo 1. Para generar livA-L12W se amplificó por PCR a partir de la secuencia de iivA clonada en pGemT con el primer livA-ff y con el primer livA-L12W-rev que contiene la mutación para Trp y un sitio de reconocimiento para HinDIII. El amplicon fue clonado en pGemT y posteriormente digerido con NcoI y HinDIII de manera de poder insertarlo en un plásmido pET24D que contiene a iivA digerido con NcoI y HinDIII (HinDIII se encuentra naturalmente en iivA en la posición 40 pb). Para generar livA-S106W, que tiene un residuo de triptófano en el C-terminal inmediatamente antes de la etiqueta de seis histidinas, se amplificó por PCR a partir de la secuencia de iivA clonada en pGemT con los oligonucleótidos livA-ff e livA-S106W-rev, el amplicon fue digerido con las enzimas NcoI y XhoI e insertado en pET24D previamente digerido con las mismas enzimas.

Tabla 2.1

Oligonucleótido	Secuencia	Enzima de Restricción
livA-ff	AAACCATGGAAACAAGGAAGAATG	<i>NcoI</i>
livA-rev	TCTCGAGATTATCTTTGGATTTTGACGAAAC	<i>XhoI</i>
livA-L12W-rev	TCACAAGCTTGGCCATTCATCAA	<i>HinDIII</i>
livA-S106W-rev	TGCTCGAGCCAGGAATTATCTTTGGATTTG	<i>XhoI</i>

2.2. Preparación de las vesículas

El fosfolípido L- α -di-palmitoil fosfatidil colina (DPPC) fue adquirido de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA) y L- α -di-palmitoil ácido fosfatídico (DPPA) fue adquirido de Sigma. Los lípidos DPPC y DPPA fueron co-solubilizados en las proporciones deseadas en cloroformo, luego el solvente fue evaporado en un evaporador rotatorio bajo vacío, el solvente remanente fue eliminado con nitrógeno y las películas formadas fueron resuspendidos en el buffer correspondiente (50 mM Tris/HCl pH 8 o 50 mM acetato de sodio pH 4). Para obtener vesículas unilamlares pequeñas (SUV) la solución previamente obtenida fue sonicada en un sonicador de punta tres veces durante 30 segundos a 3 de

potencia. Para obtener vesículas unilaminales grandes (LUV) la solución fue pasada 15 veces a través de un filtro de policarbonato (Nucleopore) de tamaño de poro de 0.1 μm .

2.3. Fluorescencia intrínseca del triptófano

La fluorescencia del triptófano fue medida en un espectrofluorímetro Molecular Devices SpectroMAX GeminiEM usando placas de 96 pocillos opacas. La longitud de onda de excitación fue 295 nm y el espectro de emisión fue recuperado entre 300 y 400 nm.

2.4. Cromatografía de filtración molecular

Se utilizó una columna Superdex200 previamente equilibrada con el buffer de corrida (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl) y un detector de UV a 280 nm. La concentración de proteína utilizada fue 45 μM y la de las SUV fue 250 μM en un volumen final de 500 μl . Antes de la cromatografía se incubó la proteína al menos 15 minutos con las vesículas.

2.5. Proteólisis limitada en presencia de vesículas

Las condiciones de proteólisis con tripsina fueron las mismas que las descritas en el capítulo 1. Se preincubó al menos 15 minutos antes de la proteólisis a la proteína con las vesículas. La proporción lípido/proteína utilizada fue 50:1.

2.6. Producción de livA sin fusión a histidina

Para producir livA sin fusión a la etiqueta de histidinas, se amplificó iivA por PCR a partir de un molde que contiene a iivA clonada en pGemT con los oligonucleótidos livA-ff y livA-Trom-rev (CTCGAGGGATCCACGCGGAACCAGGGAATTATCTTTGGATTTTGACG) que contiene la secuencia que codifica para la región de reconocimiento a trombina. El producto amplificado fue insertado en pET24D en los sitios NcoI y XhoI. La proteína fue expresada y purificada de igual manera que lo descrito en el capítulo 1 para livA. Para eliminar la etiqueta de histidinas la proteína fue incubada con 10 unidades de trombina de plasma bovino (Sigma) por cada mg de proteína a 16°C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción por adición de 1 mM final de PMSF. Luego de corroborar el corte de las histidinas, realizando un ensayo de Western blot, en el cual se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-histidina, la proteína fue separada a través de una resina de NTA-Ni. La disociación de la proteína no clivada (la cual conserva las histidinas por lo que queda retenida en la columna) de la correctamente clivada, fue realizada utilizando buffer PBS.

2.7. Ensayos de turbidez

La turbidez de la solución de liposomas después del agregado de proteína fue monitoreada por medio de la absorbancia de la solución a 400 nm en un espectrofotómetro Multiskan Spectrum double beam Termo Electro Corporation. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz. La concentración de SUV utilizada fue 250 μM y la proporción lípido/proteína se mantuvo en 50/1.

2.8. Medidas del diámetro de liposomas por Light scattering dinámico

Las medidas del diámetro de las vesículas por Light scattering dinámico (DLS) fueron tomadas en un aparato Malvern ZetaSizer Nano-S. Se utilizaron vesículas unilamelares pequeñas realizadas en buffer 50 mM Tris/HCl pH 8 o 50 mM acetato de sodio pH 4. La concentración de SUV utilizada fue 250 μM y la de proteína fue 1 μM . Antes de realizar las medidas sin o con agregado de proteína, las vesículas fueron filtradas utilizando un filtro de 0.2 μm de tamaño de poro.

2.9. Ensayos de fusión de liposomas

2.9.1. Ensayo de mezclado de la bicapa lipídica

Este ensayo de fusión de liposomas se basa en el análisis del mezclado de la membrana lipídica de vesículas marcadas con N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) fosfatidiletanolamina (NBD-PE) y N-(lissamine rhodamine B sulphonyl) fosfatidiletanolamina (Rho-PE) con vesículas no marcadas en una proporción 1:4. La utilidad del método radica en que las moléculas de NBD (donor) pueden transferir la energía de resonancia a las moléculas de Rho (aceptor de energía) (Pecheur, Hoekstra et al. 1997). Al construir las membranas marcadas en una proporción molar de 0.6:0.6:100 de NBD-PE, Rho-PE y lípido no marcado, se produce una transferencia de energía eficiente, por lo que no se observa la fluorescencia del donador en esta condición. Después de que se produce el mezclado de las membranas lipídicas de las vesículas marcadas y las no marcadas, los fluoróforos donores y aceptores de energía se separan en el espacio y se produce una disminución de la eficiencia de transferencia de la energía de resonancia (Figura 2.4). El mezclado de lípidos es seguido en el tiempo por el incremento de la fluorescencia del donador (NBD-PE) utilizando una longitud de onda de excitación y de emisión de 465 y 530 nm, respectivamente. El 100% de mezclado de lípidos es obtenido

por la medida de fluorescencia después del agregado de 0.2% (v/v) de Triton X100.

El porcentaje de mezclado de lípidos en cada condición es obtenido utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de mezclado de lípidos} = [(F_t - F_0) / (F_{\text{max}} - F_0)] * 100$$

Donde F_0 es el valor inicial de fluorescencia de las vesículas marcadas más las no marcadas sin el agregado de proteína, F_t es el valor de fluorescencia después de t minutos de incubación con la proteína ensayada y F_{max} es el valor de fluorescencia medido después del agregado de 0.2% de Triton X-100 que permite dispersar al máximo las sondas.

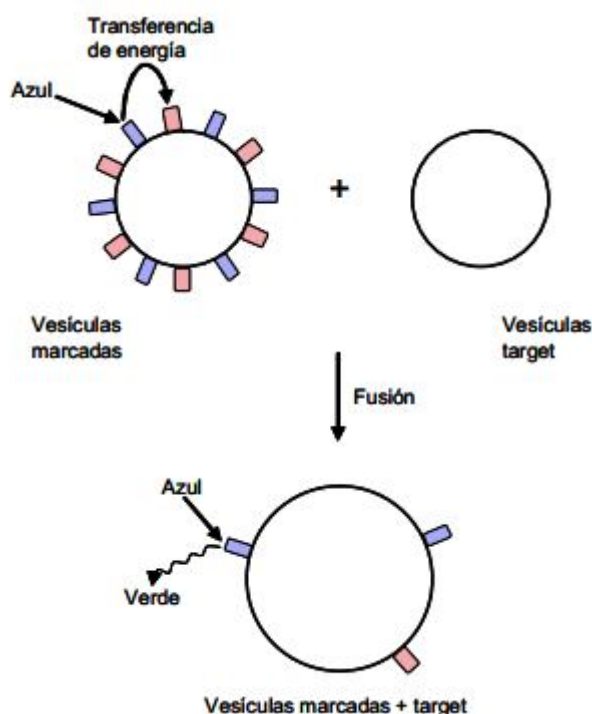


Figura 2.4. Representación esquemática del ensayo de fusión de liposomas por mezclado de las membranas lipídicas.

2.9.2. Ensayo de mezclado del contenido acuoso de liposomas

Este ensayo se basa en la producción de dos poblaciones de liposomas que tienen encapsulado en su interior acuoso cloruro de terbio ($TbCl_3$) o dipicolinato de sodio (DPA). Estas dos poblaciones de liposomas no producen fluorescencia significativa por separado pero cuando se mezclan en proporciones iguales y se produce fusión se forma un complejo fluorescente entre el $TbCl_3$ y el DPA (Figura 2.5) (Duzgunes and Wilschut

1993). Los liposomas fueron preparados conteniendo 5 mM de cloruro de terbium, 50 mM citrato de sodio, 10 mM Tris/HCl pH 7.4, o 50 mM DPA, 10 mM Tris/HCl pH 7.4. En ambos casos el material no encapsulado fue removido por filtración en gel de los liposomas utilizando una columna Sephadex G-25 (Pharmacia) equilibrada con una solución isomolar (50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7.4). El EDTA se adiciona al medio exterior de los liposomas con el objetivo de inhibir la fluorescencia del complejo Tb/DPA que pueda formarse por lisis de los liposomas en lugar de formarse por fusión. En el caso de querer preparar los liposomas a pH ácido el buffer Tris/HCl pH 7.4 fue reemplazado por 10 mM de acetato de sodio pH 4. La emisión de fluorescencia fue recuperada a 545 nm y la longitud de onda de excitación fue 276 nm.

El porcentaje de mezclado del contenido acuoso de los liposomas en cada condición es obtenido utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de mezclado de contenido acuoso} = [(F_t - F_0) / (F_{\text{max}} - F_0)] * 100$$

Donde F_t es la fluorescencia a un tiempo t después de la adición de proteína, F_0 es la fluorescencia intrínseca de los liposomas sin agregado de proteína y F_{max} es la fluorescencia después del agregado de 0.2% del detergente colato de sodio a las vesículas sin el agregado de EDTA.

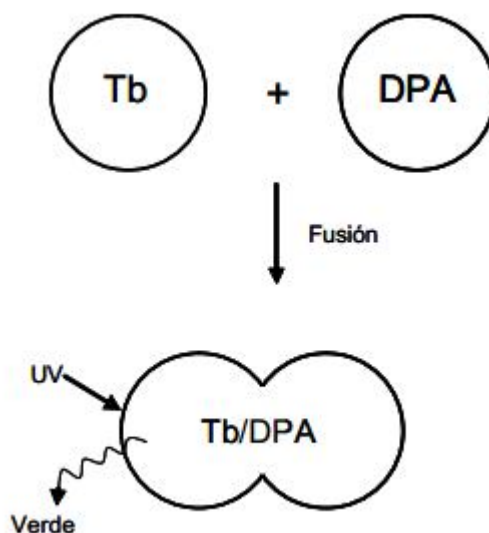


Figura 2.5. Representación esquemática del ensayo de fusión de liposomas por mezclado del contenido acuoso.

Resultados

2.1. Estudio de la interacción de livA con membranas

Teniendo en cuenta las características estructurales de livA mencionadas en el capítulo anterior, la inducción de estructura en presencia de fosfato y micelas de SDS y que se ha reportado que varias proteínas con motivos coiled-coil y con α -hélices anfipáticas se asocian con membranas lipídicas, se decidió determinar si livA puede interactuar con membranas fosfolipídicas. Para llevar a cabo este objetivo, se realizaron medidas de la emisión de fluorescencia del triptófano (Trp) de livA, lo que permite discriminar la polaridad del entorno en que se encuentran dichos residuos. Cuando los residuos de Trp se encuentran en un medio más hidrofóbico, como el proporcionado por las bicapas lipídicas o el core hidrofóbico de las proteínas, el máximo de emisión de fluorescencia cambia hacia menores longitudes de onda (cambio hacia el azul del espectro UV). Dado que livA no posee residuos aromáticos, se construyeron dos mutantes puntuales de livA con residuos de Trp colocados en dos regiones diferentes y claves de la proteína. A una mutante, llamada livA-L12W, se le introdujo un residuo de Trp en el lugar de la leucina ubicada en la posición 12 de la cara hidrofóbica de la α -hélice anfipática predicha en el N-terminal, y a la otra mutante, llamada livA-S106W, se le introdujo un residuo de Trp en el lugar de un residuo de serina ubicado en el extremo C-terminal de livA posterior a la región predicha como coiled-coil. La interacción con lípidos se ensayó por medio de la medida de los cambios del espectro de triptófano de las proteínas mencionadas en presencia de bicapas lipídicas provistas por vesículas unilamlares pequeñas compuestas o enteramente del fosfolípido zwitterionico L- α -di-palmitoil fosfatidil colina (DPPC), referidas como SUV-PC, o de vesículas cargadas negativamente compuestas de 75% de DPPC y 25% del fosfolípido con carga negativa L- α -di palmitoil ácido fosfatídico, referidas como SUV-PA:PC. Al medir el espectro de emisión del Trp de livA-L12W e livA-S106W en presencia de Tris/HCl pH 8 se observó que la longitud de onda máxima de emisión es 355 nm, para ambas proteínas, lo cual es típico de residuos de Trp completamente expuestos al solvente. Ante el agregado de SUV, ya sean cargadas negativamente o neutras, el espectro de emisión de livA-S106W permanece invariable. Por otro lado, el espectro de emisión de livA-L12W muestra un cambio significativo de la longitud de onda de emisión máxima (λ_{max}) hacia menores longitudes de onda ante el agregado de SUV, lo que indica que el residuo de Trp se reubica en un entorno más hidrofóbico (Figura 2.6 A). Este resultado sugiere que la región N-terminal de livA, la cual se predice que forma una α -hélice anfipática y donde está localizado el Trp12, estaría

interactuando con la membrana lipídica de los liposomas. Utilizando la misma proporción lípido/proteína (50/1, equivalente a 250 μ M de fosfolípidos), las vesículas cargadas negativamente (SUV-PA:PC) producen un cambio más significativo del máximo de emisión del espectro (λ_{max} 340 nm) que el de las vesículas neutras (λ_{max} 346 nm). Sin embargo, al aumentar la concentración de SUV-PC utilizada, el λ_{max} de emisión disminuye hasta llegar a longitudes de onda similares a las que se alcanzan utilizando SUV-PA:PC (Figura 2.6 B). Este resultado indica que la interacción proteína- vesícula es más eficiente con vesículas cargadas negativamente que con vesículas neutras, dado que es necesaria una mayor concentración de SUV-PC para producir el mismo efecto que SUV-PA:PC.

Con el objetivo de confirmar la interacción de livA con vesículas fosfolipídicas se realizaron experimentos de interacción lípido-proteína por otros dos métodos: por cromatografía de exclusión molecular y por ensayos de la protección conferida por vesículas ante la degradación proteolítica de livA.

En los ensayos de cromatografía líquida por filtración molecular se utilizó la variante de livA que posee Trp en el extremo C-terminal, livA-S106W, de manera de poder monitorear la corrida por la fluorescencia del triptófano a 280 nm. Se observó que la proteína eluye a un tiempo de retención de aproximadamente 28 minutos. Sin embargo, cuando la proteína fue previamente incubada con SUV- PA:PC, se observaron dos picos en el cromatograma: uno a 28 minutos de retención correspondiente a la proteína sola y otro a menor tiempo de retención (23 minutos) probablemente correspondiente a la proteína asociada a las vesículas (Figura 2.7). Como control de este experimento se realizó la cromatografía de las vesículas sin proteína de manera de confirmar que las mismas no absorben en el ultravioleta en el tiempo de retención correspondiente a la asociación vesícula-proteína propuesto.

Por otro lado, se realizaron experimentos de proteólisis limitadas de livA incubada previamente con SUV-PA:PC y se comparó el patrón de proteólisis con el previamente obtenido para la proteína sin el agregado de vesículas. Como se puede observar en los geles de Tricina-SDS-PAGE presentados en la figura 2.8, la presencia de vesículas protege considerablemente a livA de la degradación proteolítica. Mediante ensayos de western blot de los fragmentos proteolíticos utilizando un anticuerpo anti-histidina que permite monitorear la integridad del extremo C-terminal de la proteína, se observó que la zona de livA mayormente protegida de la degradación proteolítica es la C- terminal.

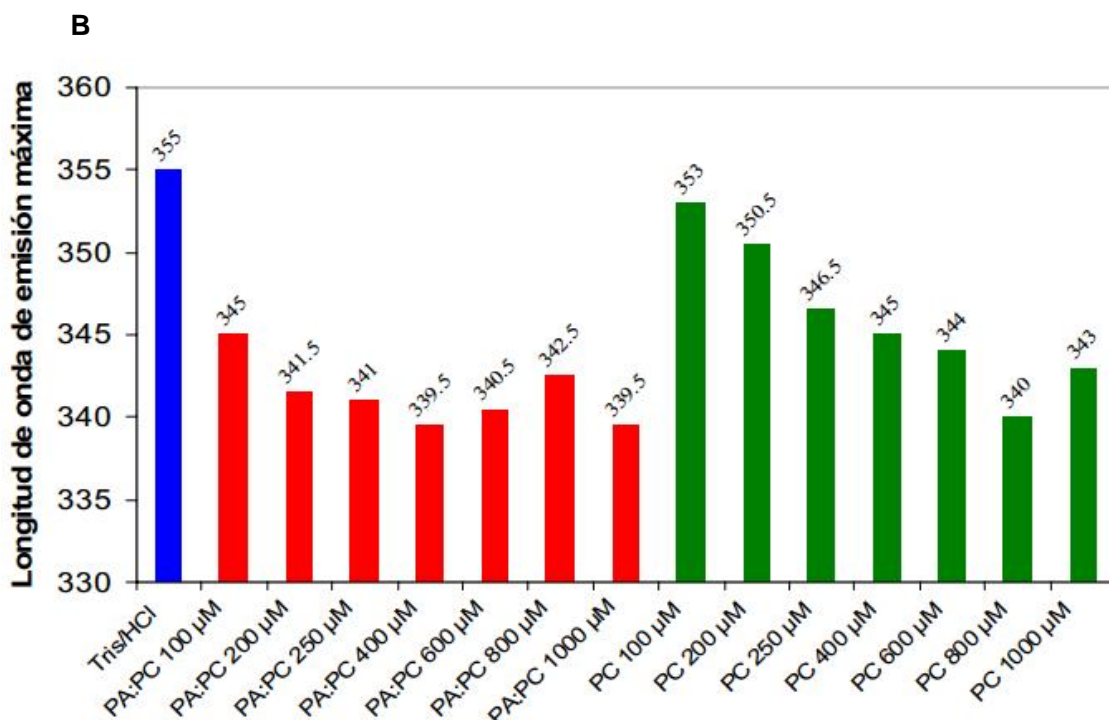
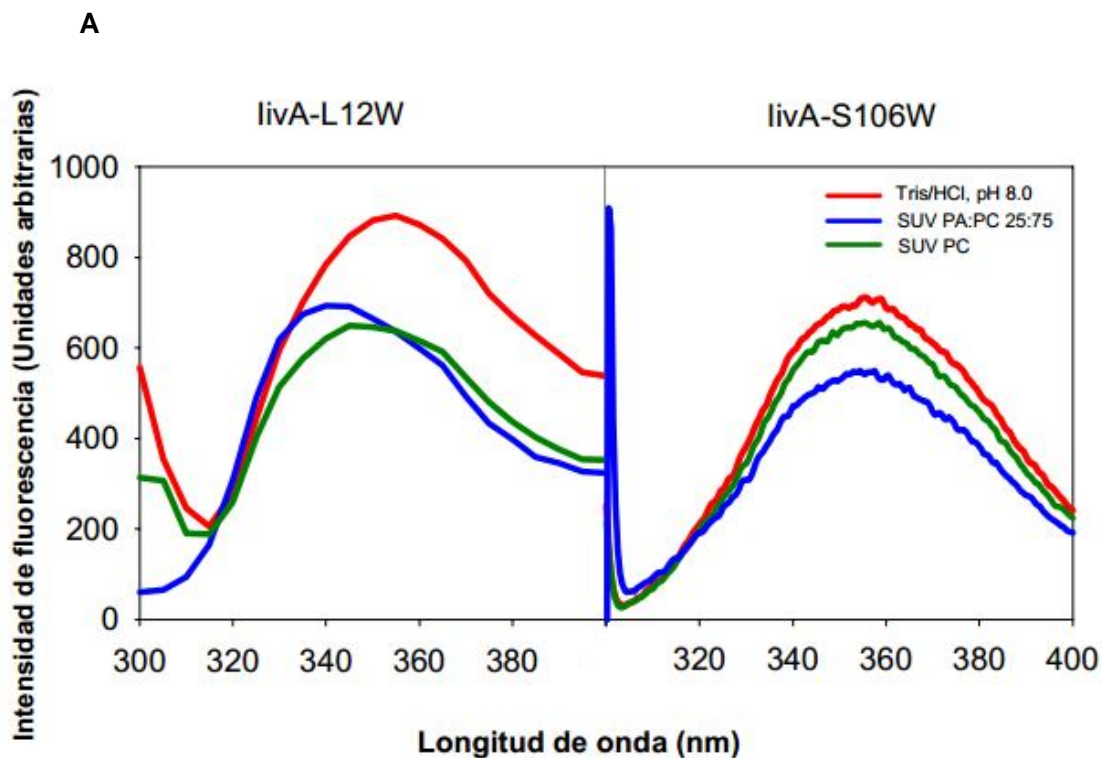


Figura 2.6. Fluorescencia intrínseca del triptófano. (A) Espectros de emisión del triptófano entre 300 y 400 nm de livA-L12W e livA-S106W en 50 mM de buffer Tris/HCl, pH 8.0 o en presencia de vesículas unilaminares pequeñas (SUV) compuestas de 100% de DPPC o de 75% de DPPC y 25% de DPPA preparadas en 50 mM de Tris/HCl pH 8.0. La concentración de lípidos utilizada fue 250 μ M, lo que equivale a una proporción lípido/proteína de 50:1. (B) Longitud de

onda de emisión máxima del triptófano de livA-L12W en función de la concentración de vesículas neutras o cargadas negativamente. En todos los casos la concentración de las proteínas fue 5 μM y la longitud de onda de excitación fue 295 nm.

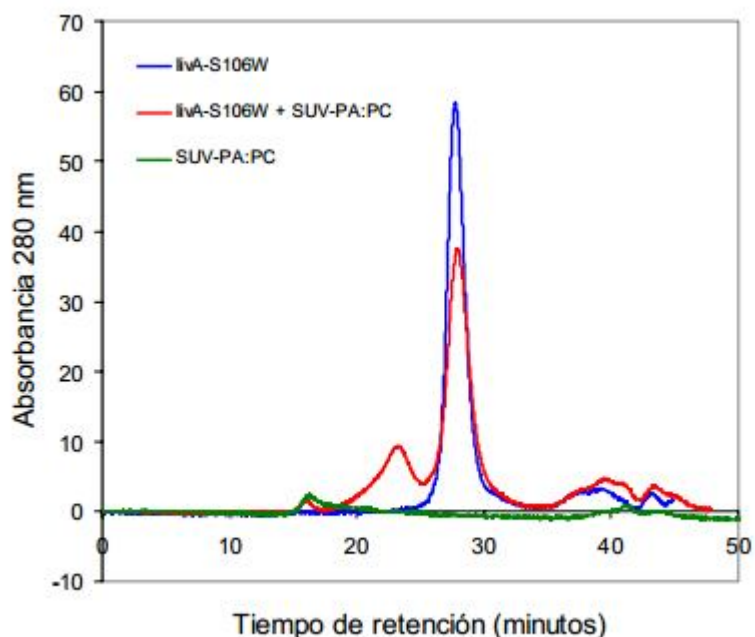


Figura 2.7. Cromatografía de filtración molecular, utilizando una columna Superdex 200, de livA-S106W en buffer Tris/HCl pH 8.0, livA-S106W preincubada con SUV-PA:PC en el mismo buffer y SUV-PA:PC. El buffer de elusión fue 50 mM Tris/HCl pH 8.0 y 150 mM NaCl. La concentración de proteína utilizada fue 45 μM y la de SUV fue 250 μM en un volumen final de 500 μl .

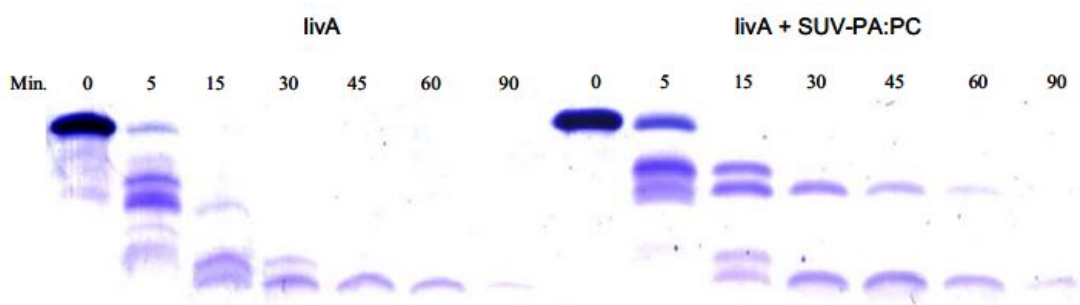


Figura 2.8. Tricina-SDS-PAGE teñido con Comassie Brilliant Blue R250, que muestra el patrón de proteólisis limitada con tripsina de livA en buffer Tris/HCl pH 8.0 (izquierda) o en presencia de SUV-PA:PC preparadas en el mismo buffer (derecha). La proporción lípido/proteína utilizada fue 50:1. Se indica el tiempo de proteólisis de livA en minutos.

2.2. Inducción de estructura secundaria de livA ante la presencia de membranas lipídicas

Con el objetivo de analizar posibles cambios conformacionales inducidos en livA y sus dominios ante la presencia de membranas lipídicas se utilizó la técnica de dicroísmo circular. Se obtuvo el espectro de CD de las proteínas en ausencia y presencia de SUV compuestas de diferentes proporciones de L- α -di-palmitoil ácido fosfatídico y de L- α -di-palmitoil fosfatidil colina. En todas las condiciones se observó un aumento significativo de la señal dicróica a 222 nm, produciéndose el máximo efecto (72% de aumento de la señal a 222 nm con respecto a la proteína en Tris/HCl pH 8.0) con SUV compuestas de 75 % de DPPC y 25% de DPPA (Figura 2.9 A).

La inducción de estructura estuvo circunscripta a la mitad N-terminal de la proteína, dado que en livA-N las SUV incrementan significativamente la señal dicróica a 222 nm (381% con SUV PA:PC 25:75) y producen un cambio cualitativo de la forma del espectro, mientras que en livA-C no se producen cambios (Figura 2.9 C). El radio lípido/proteína que produce el máximo incremento de la señal de CD a 222 nm fue 60 para livA y 260 para livA-N (Figura 2.9 B). Esta diferencia probablemente es debida a un efecto de la avidéz, que incrementa la unión a las SUV en el N-terminal trimérico de livA con respecto al estado monomérico de livA-N aislado. En resumen, los resultados sugieren que en presencia de SUV transcurre un cambio conformacional en el dominio N-terminal de livA, el cual pasa de random coil a α -hélice.

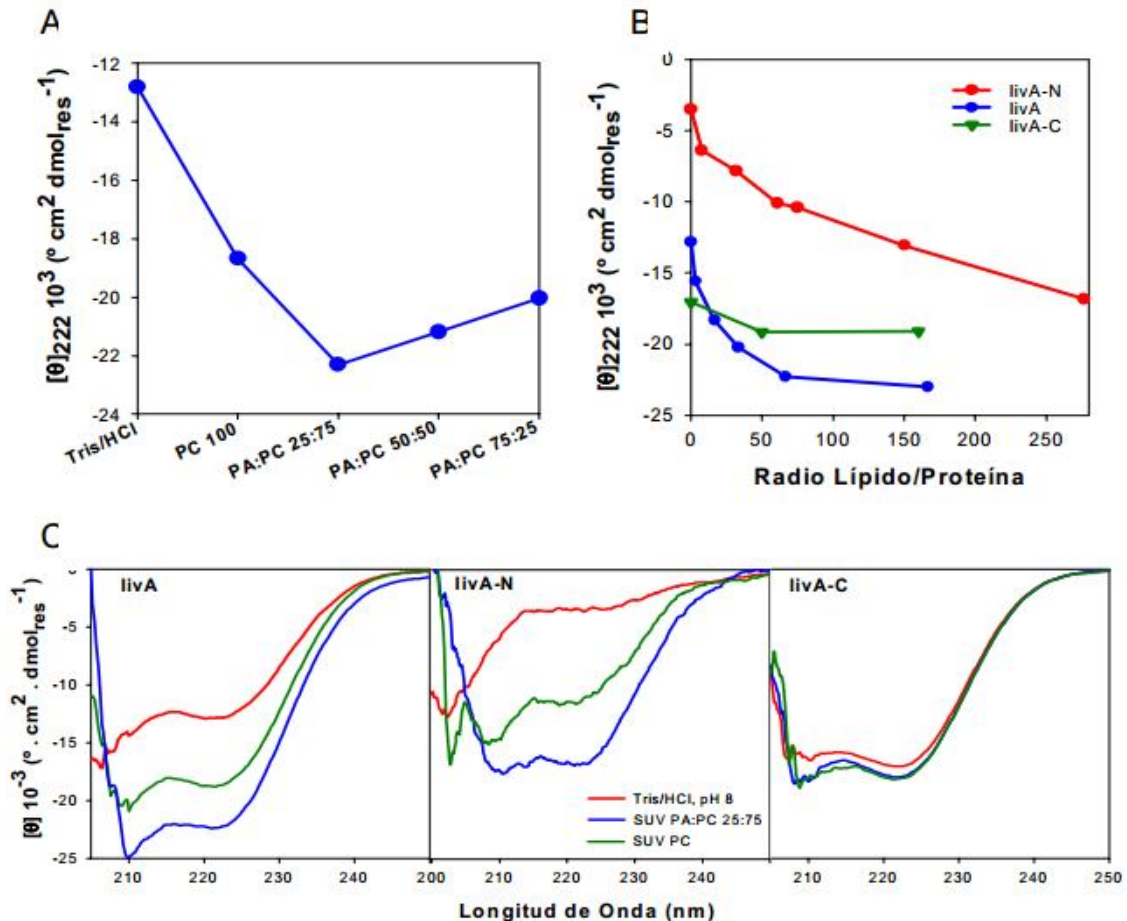


Figura 2.9. Inducción de estructura secundaria en presencia de vesículas lipídicas. (A) Señal a 222 nm de livA en función de la composición de las vesículas. La composición de las vesículas fue 100% de DPPC, 75% de DPPC y 25% de DPPA, 50% de DPPC y 50% de DPPA o 75% de DPPA y 25% de DPPC. La relación lípido/proteína utilizada fue 50:1. (B) Señal de CD a 222 nm de livA, livA-N e livA-C en función de la relación lípido/proteína utilizando SUV compuestas de 75% de DPPC y 25% de DPPA. La concentración de proteína fue mantenida constante, mientras que la concentración de SUV fue incrementada gradualmente. (C) Espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano de livA, livA-N e livA-C en buffer Tris/HCl pH 8.0 o en presencia de SUV compuestas de 100% de DPPC o 75% de DPPC y 25% de DPPA realizadas en el mismo buffer. La relación lípido/proteína para livA e livA-C fue 50:1, mientras que la de livA-N fue 160:1.

2.3 Estudio de la capacidad fusogénica de livA

Teniendo en cuenta la ocurrencia de dominios coiled-coil triméricos, similares a los hallados en livA, en proteínas fusogénicas, se decidió estudiar si livA y sus dominios aislados son capaces de fusionar membranas lipídicas. Para llevar a cabo este objetivo se utilizaron ensayos in vitro, con liposomas como membranas modelos, ampliamente reportados para el estudio de la fusión de membranas por proteínas fusogénicas virales y celulares.

En primer lugar, se evaluó el aumento en la turbidez y diámetro promedio de las vesículas después de la adición de proteína. La turbidez fue monitoreada por la absorbancia a 400 nm y el diámetro promedio por la técnica de dispersión de luz dinámica (dynamic light scattering (DLS)). Estos ensayos fueron llevados a cabo con vesículas unilamillares pequeñas compuestas de PA:PC 25:75 a pH ácido o cercano al neutro, según se indique. Las proteínas fueron adicionadas a una proporción lípido/proteína de 100/1 y este momento fue considerado como el tiempo cero de reacción. A pH 8.0 livA produce incremento tanto de la turbidez como del tamaño promedio de las vesículas. livA-C e livA-N no incrementan la turbidez a pH 8.0 mientras que si producen un ligero aumento del diámetro promedio de las vesículas. A pH ácido aumenta tanto de la turbidez como el diámetro promedio de las vesículas ante el agregado de livA y de sus dominios aislados, livA-N e livA-C, aunque en los dos últimos casos el incremento es menos significativo (Figura 2.10 y Tabla 2.2).

Debido a que el aumento de la turbidez y del diámetro promedio de las vesículas puede ser causado tanto por agregación como por fusión de las vesículas, se evaluó el poder fusogénico de livA y sus dominios, por dos ensayos fluorométricos diferentes que permiten discriminar los eventos de agregación de los de fusión. Uno de los ensayos utilizados permite medir el mezclado de las bicapas lipídicas y el otro el mezclado del contenido acuoso de los liposomas. El mezclado de las bicapas lipídicas de los liposomas fue medido por FRET (transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia) utilizando liposomas marcados con NBD-PE y Rho-PE. El mezclado del contenido acuoso fue monitoreado por la fluorescencia del complejo Tb/DPA producido después de la fusión

de liposomas conteniendo TbCl₃ o DPA encapsulado en su fase acuosa interior. livA produce mezclado de la bicapa lipídica y del contenido acuoso de los liposomas tanto a pH 8.0 como a pH 4.0. También livA-N produce mezclado de la bicapa lipídica y del contenido acuoso de los liposomas a ambos pHs, aunque en menor proporción que la proteína entera. Por otro lado livA-C no produce fusión significativa de los liposomas por ninguno de los dos ensayos utilizados (Figura 2.11 A y B).

En ocasiones algunos polipéptidos producen fusión de SUV y no de liposomas unilaminares grandes (LUV), debido a que los primeros poseen una mayor curvatura y su membrana es más fácilmente perturbada. Teniendo en cuenta esto, el ensayo de mezclado de lípidos en presencia de livA fue realizado con ambos tipos de liposomas, observándose el mismo resultado.

Se ha reportado en la bibliografía que polipéptidos básicos tales como poli-histidina o poli-lisina pueden producir la fusión de liposomas (Wang and Huang 1984; Gad, Bental et al. 1985), lo que ha hecho replantear si la etiqueta de seis histidinas en el C-terminal de livA, que se ha introducido con el fin de poder purificar la misma, puede llevar a interpretaciones erróneas de los resultados. Por este motivo se construyó una variante de livA con un sitio de reconocimiento para trombina, inmediatamente antes de la etiqueta de histidinas, de manera de poder obtener livA sin fusión a histidina. Al realizar los experimentos de turbidez, de medida del diámetro y de mezclado de la bicapa lipídica y del contenido acuoso de los liposomas, en las mismas condiciones utilizadas anteriormente, con esta variante de livA se obtuvieron resultados idénticos a los descritos anteriormente, lo que descarta que los efectos observados sean un artefacto producido por las histidinas C-terminales.

Es importante notar que el ligero incremento del tamaño de las vesículas producido por livA-C descrito anteriormente podría deberse a la agregación de las vesículas producida por la interacción de las mismas con la región C-terminal rica en residuos cargados positivamente contigua al dominio coiled-coil de livA. El mezclado de las bicapas lipídicas y del contenido acuoso de los liposomas ante el agregado de livA transcurre en la misma escala de tiempo, lo que sugiere que el proceso involucra una rápida progresión de hemifusión (cuando se mezclan los lípidos) a fusión completa (cuando se mezcla el contenido acuoso). Cuando se agregan los dominios de livA aislados no se induce fusión de las vesículas o el proceso es mucho menos eficiente, lo que indica que para que exista una actividad fusogénica completa es necesaria la proteína en su totalidad.

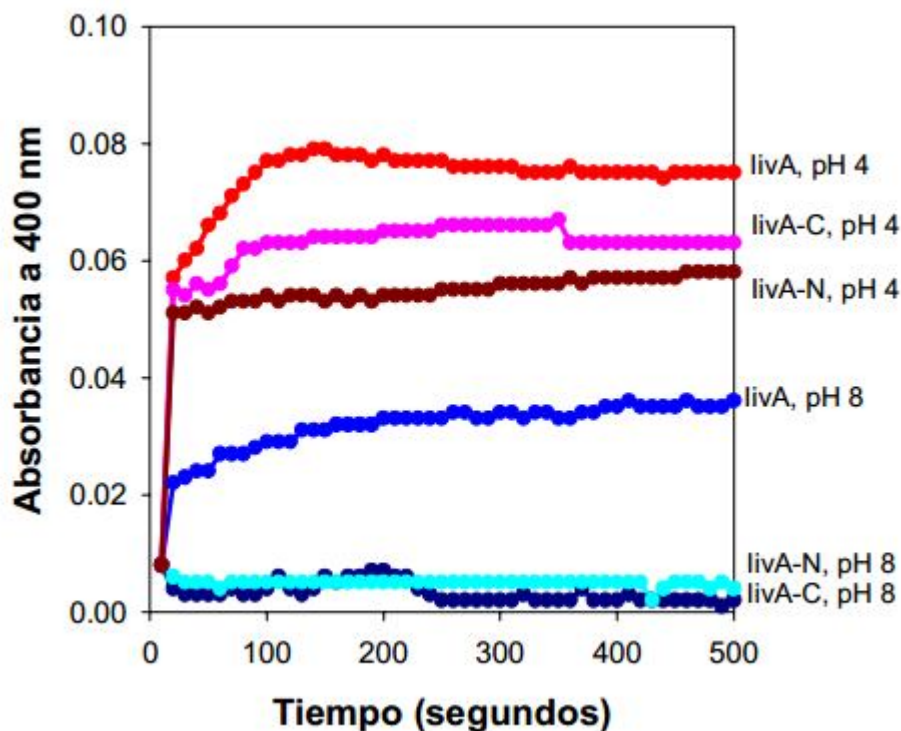


Figura 2.10. Medidas de la turbidez de liposomas compuestos de 75% de DPPC y 25% de DPPA ante el agregado de livA, livA-N o livA-C en función del tiempo. A la derecha del gráfico se indica el nombre de la proteína que fue agregada a los liposomas y el pH en el que están los mismos. pH 8.0 corresponde a 50 mM de Tris/HCl pH 8.0 y pH 4.0 a 50 mM de acetato de sodio pH 4.0. La proporción lípido/proteína utilizada fue 100/1. El experimento fue realizado por duplicado y repetido al menos tres veces obteniéndose resultados similares.

Tabla 2.2. Diámetro de las vesículas (en nanómetros) a pH 4.0 o a pH 8.0, antes y 15 minutos después del agregado de proteína, medido por DLS. La proporción lípido/proteína utilizada fue 100/1 y el experimento se realizó por triplicado.

	Diámetro (nm)	
	pH 8.0	pH 4.0
DPPC:DPPA	83	38
DPPC:DPPA/livA	1826	716
DPPC:DPPA/livA-N	97	268
DPPC:DPPA/livA-C	92	243

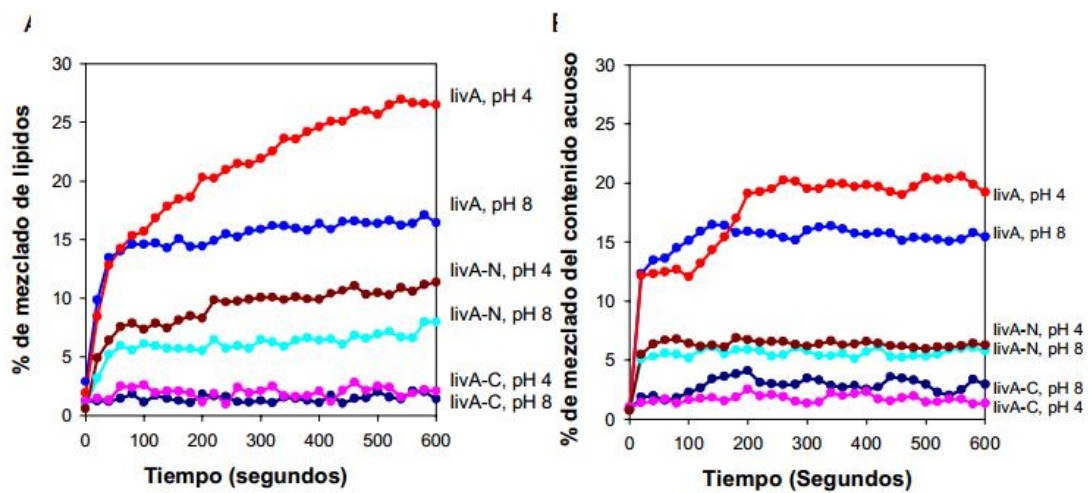


Figura 2.11. Fusión de liposomas a pH 4.0 o pH 8.0 ante el agregado de livA, livA-N o livA-C en función del tiempo, medidos por (A) mezclado de la bicapa lipídica o (B) mezclado del contenido acuoso de los liposomas. A la derecha de los gráficos se indica el nombre de la proteína que fue agregada a los liposomas y el pH en el que están los mismos. pH 8 corresponde a 50 mM de Tris/HCl pH 8 y pH 4 a 50 mM de acetato de sodio pH 4. La proporción lípido/proteína utilizada fue 100/1. El experimento fue realizado por duplicado y repetido al menos tres veces obteniéndose resultados similares.

Discusión

En este capítulo se describió la interacción de livA con membranas lipídicas. Esta interacción es llevada a cabo por medio del dominio N-terminal de livA, el cual sufre una transición conformacional de random coil a α -hélice al interactuar con membranas o inmediatamente antes de hacerlo, en la cercanía de las mismas. Dicha interacción es más eficiente en membranas con carga neta negativa. Este hallazgo concuerda con el cambio conformacional descrito anteriormente para livA ante la presencia de alta fuerza iónica, pH ácido y micelas de SDS, dado que estas son condiciones que mimetizan la cercanía de las membranas fosfolipídicas. El entorno próximo a las membranas lipídicas con carga negativa presenta un aumento local de la fuerza iónica y disminución del pH debido al aumento de la concentración de iones y de protones que son atraídos por los grupos de las cabezas polares de los fosfolípidos (McLaughlin 1989). Presumiblemente, la α -hélice formada al interactuar con la membrana lipídica sea anfipática, como es predicho por el modelo helical wheel presentado en el capítulo I.

Se ha reportado previamente en la bibliografía la interacción de α -hélices anfipáticas con membranas. Este tipo de estructuras forman interacciones periféricas en la bicapa lipídica en donde la α -hélice anfipática se ordena en forma paralela a la membrana de manera que la cara hidrofóbica de la misma se ubica en el core hidrofóbico de la membrana y es estabilizada por interacciones hidrofóbicas. La región hidrofílica de la hélice, que generalmente posee un alto contenido de residuos cargados positivamente, es estabilizada por interacciones electrostáticas con los fosfatos de las cabezas polares de los fosfolípidos en la cara externa de la membrana (Bechinger 2000).

Existen numerosos ejemplos de proteínas o polipéptidos naturales que interactúan con la membrana lipídica por medio de α -hélices anfipáticas, como las toxinas bacterianas formadoras de poros y los péptidos antimicrobianos. Las toxinas bacterianas formadoras de poros de clase α (por ejemplo colicina) están constituidas por hélices hidrofóbicas y anfipáticas, de manera que cuando se encuentran con la membrana blanca, las hélices hidrofóbicas se insertan en la bicapa lipídica y las anfipáticas yacen sobre la superficie de la membrana. Luego de que se juntan varios monómeros de la toxina en la membrana blanca, estos multimerizan y forman un poro (White, Musse et al. 2006). Otro ejemplo interesante de hélices anfipáticas que interactúan con membranas lipídicas son los péptidos antimicrobianos (Blondelle, Lohner et al. 1999). Estos péptidos están constituidos de α -hélices anfipáticas con carga neta positiva y son tanto solubles en medios acuosos como en membranas lipídicas. Cuando los péptidos están solubles en el medio acuoso se encuentran como estructuras desordenadas o random coil (ejemplo es el péptido melitina) exponiendo la menor cantidad de residuos hidrofóbicos a la superficie. Cuando

interaccionan con la membrana lipídica blanco (que generalmente posee carga negativa) se pliegan en forma de α -hélice anfipática sobre la superficie (Raghuraman and Chattopadhyay 2006). Se postula que el mecanismo por el cual estos péptidos ejercen su función, es decir, la desestabilización y permeabilización de la membrana para producir la muerte del microorganismo blanco, es a través de la unión de varias α -hélices sobre la superficie. Dichas α -hélices se asocian de modo de poder penetrar en la membrana formando un poro, que deja la parte hidrofílica de las hélices hacia el interior y la hidrofóbica interactúa con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos que están en el interior de la bicapa.

Los datos experimentales indican que livA es capaz de fusionar liposomas con carga negativa tanto a pH neutro como ácido, siendo más eficiente la fusión a pH ácido. Si bien los dominios separados de livA pueden producir un mínimo efecto en la fusión de liposomas, sobre todo el dominio N-terminal, es necesaria la proteína completa para que la fusión de membranas sea eficiente.

Se ha descrito en la bibliografía que algunos péptidos anfipáticos, como GALA y WEA11, pueden fusionar liposomas debido a que producen el acercamiento de las membranas y ayudan a vencer las fuerzas de repulsión que existen debido a las cargas de las cabezas polares de los fosfolípidos en las membranas, lo cual es uno de los pasos que involucra mayor gasto energético durante el proceso de fusión (Epanand and Lim 1995).

Por otro lado, es interesante notar las similitudes de livA con las proteínas fusogénicas virales. Según lo observado por cristalografía, las proteínas fusogénicas virales de tipo I, como hemaglutinina de influenza, gp41 de HIV y SIV, GP2 de Ebola, etc. (Wilson, Skehel et al. 1981; Chan, Fass et al. 1997; Malashkevich, Chan et al. 1998; Malashkevich, Schneider et al. 1999), presentan estructuras coiled-coil triméricas paralelas, similar a lo sugerido para livA. Además las proteínas fusogénicas virales, al igual que livA, sufren cambios conformacionales cuando se encuentran en el medio adecuado que las convierten en fusogénicamente activas. A pesar de estas similitudes, es importante destacar que las proteínas fusogénicas virales poseen dos dominios de interacción a membranas, un dominio transmembrana por el cual se anclan a la envoltura viral, y el péptido fusogénico por el que interactúan con la membrana eucariota, mientras que en livA hay un solo dominio de interacción a membrana propuesto, que es la α -hélice anfipática N-terminal. La región C-terminal continúa al dominio coiled-coil trimérico de livA, que tiene un alto porcentaje de residuos cargados positivamente, podría estar involucrada en la interacción con la membrana. Los resultados experimentales que avalan esta hipótesis son la protección conferida ante la proteólisis por proteasas en presencia de liposomas y el hecho de que el dominio C-terminal aislado de livA, aunque no fusiona liposomas sí provoca la agregación de los mismos. Basados en los resultados experimentales, se

propuso un modelo para la interacción de livA con liposomas y los cambios conformacionales que provocaría la posterior fusión de los mismos, el que se presenta en la figura 2.12.

La similitud estructural con proteínas fusogénicas virales fue previamente descrita para las proteínas bacterianas efectoras del sistema de secreción tipo III: SipB e IpaB de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. (Hayward, McGhie et al. 2000; Hume, McGhie et al. 2003). Estas proteínas homólogas entre sí, son inyectadas directamente al interior del citoplasma eucariota por el sistema de secreción tipo III, en donde producen cambios en las cascadas de señalización y reordenamientos del citoesqueleto de actina que favorecen al patógeno. Se ha observado que SipB e IpaB poseen la capacidad de fusionar liposomas, sin embargo, es controversial el rol de esta actividad fusogénica de membranas en la patogénesis de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. Si bien SipB e IpaB deben traspasar la membrana bacteriana y la eucariota para llegar a su lugar de acción, se cree que este proceso no involucra la fusión de membranas.

Como se ha mencionado anteriormente, livA no posee homología significativa con ninguna proteína de función conocida, lo cual dificulta el análisis de la función de la misma. Debido a esto, se han tomado en cuenta homologías sutiles con proteínas de función conocida. De este modo, mediante comparación de secuencias con el banco de datos pFAM (<http://sanger.ac.uk/Software/pfam/>), se encontró que el dominio N-terminal de livA posee una leve homología con proteínas Q-SNARE. Es interesante notar que estas proteínas están involucradas en la modulación del transporte intravesicular en las células eucariotas permitiendo la fusión de membranas lipídicas de distintos compartimientos (Fasshauer 2003). Las proteínas SNAREs forman estructuras coiled-coil tetraméricas, mediante la interacción de 3 motivos coiled-coil Q-SNARE en la membrana de un compartimiento y 1 motivo coiled-coil R-SNARE en la membrana del otro compartimiento a ser fusionado. Un mecanismo de regulación de la fusión de membranas por proteínas SNAREs es mediante la competición de las interacciones entre Q y R-SNAREs, en donde proteínas solubles con motivos coiled-coil similares a los de SNARE se unen a ellas de manera promiscua evitando la formación del complejo tetramérico indispensable para la actividad fusogénica (Scales, Hesser et al. 2002; Hatsuzawa, Lang et al. 2003). Se podría especular que livA es capaz de perturbar el tránsito vesicular dentro de las células eucariotas infectadas con *Brucella* spp. por interacción promiscua a proteínas R-SNARE, lo cual impediría la fusión de membranas que debería ocurrir normalmente en células no infectadas.

Se demostró que livA está involucrada en la virulencia de *Brucella* spp. y que el principal mecanismo que dicha bacteria utiliza para ejercer su patogenia es la subversión del tráfico intracelular de la célula hospedadora, evitando la fusión de los compartimientos

que contienen Brucella con el lisosoma. Se podría hipotetizar que la actividad fusogénica de livA está relacionada con el proceso de evasión de Brucella durante la infección, especialmente teniendo en cuenta que la actividad fusogénica de livA es máxima a pH ácido. El descenso del pH en las vacuolas que contienen Brucella, durante el proceso de infección, es una condición indispensable para la expresión de factores de virulencia y el establecimiento del nicho replicativo de este patógeno. Sin embargo, no existen evidencias directas que relacionen la actividad fusogénica in vitro de livA con lo que sucede durante el proceso de infección y la hipótesis mencionada amerita futuras investigaciones.

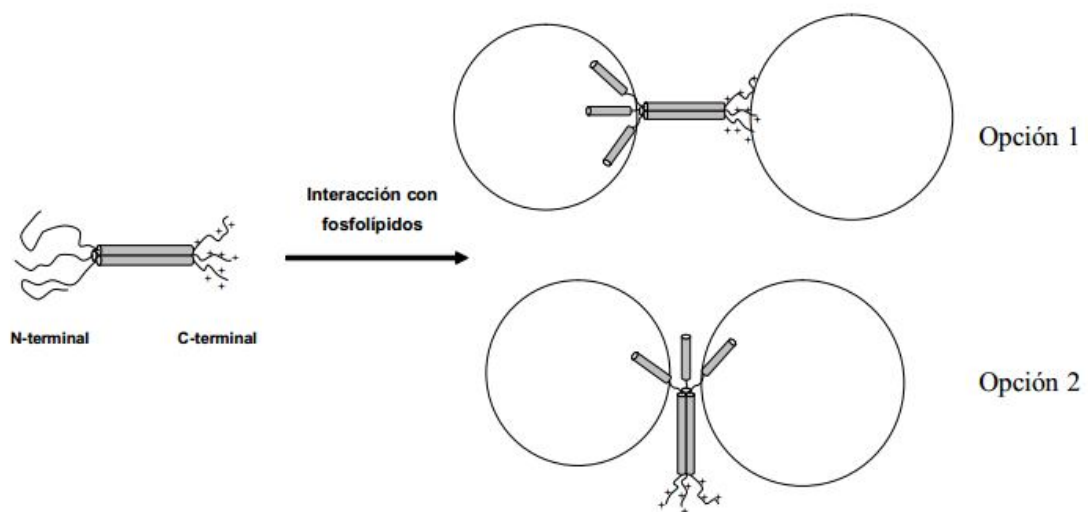


Figura 2.12. Modelo hipotético de la interacción de livA con vesículas fosfolípicas.

Bibliografía

- Bechinger, B. (2000). "Understanding peptide interactions with the lipid bilayer: a guide to membrane protein engineering." *Curr Opin Chem Biol* **4**(6): 639-44.
- Blondelle, S. E., K. Lohner, et al. (1999). "Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity." *Biochim Biophys Acta* **1462**(1-2): 89-108.
- Bock, J. B., H. T. Matern, et al. (2001). "A genomic perspective on membrane compartment organization." *Nature* **409**(6822): 839-41.
- Boman, H. G. (1991). "Antibacterial peptides: key components needed in immunity." *Cell* **65**(2): 205-7.
- Boyd, D., C. Schierle, et al. (1998). "How many membrane proteins are there?" *Protein Sci* **7**(1): 201-5.
- Bullough, P. A., F. M. Hughson, et al. (1994). "Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion." *Nature* **371**(6492): 37-43.
- Bullough, P. A., F. M. Hughson, et al. (1994). "Crystals of a fragment of influenza haemagglutinin in the low pH induced conformation." *J Mol Biol* **236**(4): 1262-5.
- Burn, P. (1988). "Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins." *Trends Biochem Sci* **13**(3): 79-83.
- Chan, D. C., D. Fass, et al. (1997). "Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein." *Cell* **89**(2): 263-73.
- Chen, J., J. J. Skehel, et al. (1999). "N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 8967-72.
- Devine, D. A. and R. E. Hancock (2002). "Cationic peptides: distribution and mechanisms of resistance." *Curr Pharm Des* **8**(9): 703-14.
- Dutch, R. E., T. S. Jardetzky, et al. (2000). "Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis." *Biosci Rep* **20**(6): 597-612.
- Duzgunes, N. and J. Wilschut (1993). "Fusion assays monitoring intermixing of aqueous contents." *Methods Enzymol* **220**: 3-14.
- Eckert, D. M. and P. S. Kim (2001). "Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition." *Annu Rev Biochem* **70**: 777-810.
- Epand, R. M. and W. Lim (1995). "Mechanism of liposome destabilization by polycationic amino acids." *Biosci Rep* **15**(3): 151-60.
- Fasshauer, D. (2003). "Structural insights into the SNARE mechanism." *Biochim Biophys Acta* **1641**(2-3): 87-97.
- Friedman, J. A., J. I. McIver, et al. (2003). "Development of a pontine cyst after

- endovascular coil occlusion of a basilar artery trunk aneurysm: case report." *Neurosurgery* **52**(3): 694-9; discussion 698-9.
- Gad, A. E., M. Bental, et al. (1985). "Promotion and inhibition of vesicle fusion by polylysine." *Biochemistry* **24**(22): 6277-82.
- Gouaux, E. (1997). "Channel-forming toxins: tales of transformation." *Curr Opin Struct Biol* **7**(4): 566-73.
- Gouaux, E. (1998). "alpha-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins." *J Struct Biol* **121**(2): 110-22.
- Hatsuzawa, K., T. Lang, et al. (2003). "The R-SNARE motif of tomosyn forms SNARE core complexes with syntaxin 1 and SNAP-25 and down-regulates exocytosis." *J Biol Chem* **278**(33): 31159-66.
- Hayward, R. D., E. J. McGhie, et al. (2000). "Membrane fusion activity of purified SipB, a *Salmonella* surface protein essential for mammalian cell invasion." *Mol Microbiol* **37**(4): 727-39. Heuck, A. P., R. K. Tweten, et al. (2001). "Beta-barrel pore-forming toxins: intriguing dimorphic proteins." *Biochemistry* **40**(31): 9065-73.
- Hume, P. J., E. J. McGhie, et al. (2003). "The purified *Shigella* IpaB and *Salmonella* SipB translocators share biochemical properties and membrane topology." *Mol Microbiol* **49**(2): 425-39.
- Jahn, R., T. Lang, et al. (2003). "Membrane fusion." *Cell* **112**(4): 519-33.
- Johnson, J. E. and R. B. Cornell (1999). "Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (review)." *Mol Membr Biol* **16**(3): 217-35.
- Lacy, D. B. and R. C. Stevens (1998). "Unraveling the structures and modes of action of bacterial toxins." *Curr Opin Struct Biol* **8**(6): 778-84.
- Lakey, J. H. and S. L. Slatin (2001). "Pore-forming colicins and their relatives." *Curr Top Microbiol Immunol* **257**: 131-61.
- Lehrer, R. I. and T. Ganz (1999). "Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence." *Curr Opin Immunol* **11**(1): 23-7.
- Lentz, B. R., V. Malinin, et al. (2000). "Protein machines and lipid assemblies: current views of cell membrane fusion." *Curr Opin Struct Biol* **10**(5): 607-15.
- Maget-Dana, R. (1999). "The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes." *Biochim Biophys Acta* **1462**(1-2): 109-40.
- Malashkevich, V. N., D. C. Chan, et al. (1998). "Crystal structure of the simian immunodeficiency virus (SIV) gp41 core: conserved helical interactions underlie the broad inhibitory activity of gp41 peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9134-9.
- Malashkevich, V. N., B. J. Schneider, et al. (1999). "Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-A resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A*

96(6): 2662-7.

- Malovrh, P., G. Viero, et al. (2003). "A novel mechanism of pore formation: membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of equinatoxin." *J Biol Chem* **278(25)**: 22678-85. McLaughlin, S. (1989). "The electrostatic properties of membranes." *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 18: 113-36.
- New, R. C. (1990). *Liposomes*. New York.
- Nir, S. and J. L. Nieva (2000). "Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion." *Prog Lipid Res* **39(2)**: 181-206.
- Parente, R. A., S. Nir, et al. (1988). "pH-dependent fusion of phosphatidylcholine small vesicles. Induction by a synthetic amphipathic peptide." *J Biol Chem* **263(10)**: 4724-30.
- Parker, M. W. and F. Pattus (1993). "Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins." *Trends Biochem Sci* 18(10): 391-5.
- Pecheur, E. I., D. Hoekstra, et al. (1997). "Membrane anchorage brings about fusogenic properties in a short synthetic peptide." *Biochemistry* **36(13)**: 3773-81.
- Pecheur, E. I., J. Sainte-Marie, et al. (1999). "Peptides and membrane fusion: towards an understanding of the molecular mechanism of protein-induced fusion." *J Membr Biol* **167(1)**: 1-17.
- Raghuraman, H. and A. Chattopadhyay (2006). "Effect of ionic strength on folding and aggregation of the hemolytic peptide melittin in solution." *Biopolymers* **83(2)**: 111-21.
- Scales, S. J., B. A. Hesser, et al. (2002). "Amisyn, a novel syntaxin-binding protein that may regulate SNARE complex assembly." *J Biol Chem* **277(31)**: 28271-9.
- Shai, Y. (1999). "Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides." *Biochim Biophys Acta* 1462(1-2): 55-70.
- Skehel, J. J. and D. C. Wiley (1998). "Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion." *Cell* **95(7)**: 871-4.
- Skehel, J. J. and D. C. Wiley (2000). "Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin." *Annu Rev Biochem* 69: 531-69.
- Smit, J. M., B. L. Waarts, et al. (2003). "Liposomes as target membranes in the study of virus receptor interaction and membrane fusion." *Methods Enzymol* 372: 374-92.
- Uemura, T., T. Ueda, et al. (2004). "Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells." *Cell Struct Funct* **29(2)**: 49-65.
- Ungermann, C. and D. Langosch (2005). "Functions of SNAREs in intracellular

- membrane fusion and lipid bilayer mixing." *J Cell Sci* 118(Pt 17): 3819-28.
- Wallin, E. and G. von Heijne (1998). "Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms." *Protein Sci* 7(4): 1029-38.
- Walter, A., C. J. Steer, et al. (1986). "Polylysine induces pH-dependent fusion of acidic phospholipid vesicles: a model for polycation-induced fusion." *Biochim Biophys Acta* 861(2): 319-30.
- Wang, C. Y. and L. Huang (1984). "Polyhistidine mediates an acid-dependent fusion of negatively charged liposomes." *Biochemistry* 23(19): 4409-16.
- White, D., A. A. Musse, et al. (2006). "Toward elucidating the membrane topology of helix two of the colicin E1 channel domain." *J Biol Chem* 281(43): 32375-84.
- White, J. M. (1992). "Membrane fusion." *Science* 258(5084): 917-24.
- Wilson, I. A., J. J. Skehel, et al. (1981). "Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution." *Nature* 289(5796): 366-73.
- Zakharov, S. D. and W. A. Cramer (2002). "Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes." *Biochim Biophys Acta* 1565(2): 333-46.



CAPÍTULO 3.

Identificación de los aminoácidos esenciales para la estructura y función de livA

Introducción

La mutagénesis sitio dirigida y la mutagénesis por delección son herramientas ampliamente utilizadas para caracterizar aminoácidos importantes para la función y estructura de una proteína. La sustitución de residuos puntuales por alanina (alanine-scanning mutagenesis) es uno de los métodos más utilizado para la identificación de epítopes funcionales en proteínas (Morrison and Weiss 2001; Sidhu and Kossiakoff 2007). El poder de dicha técnica para discernir aminoácidos biológicamente importantes ha sido ampliamente demostrado en la bibliografía. Algunos ejemplos que demuestran la utilidad de la técnica son el descubrimiento del sitio de unión de la hormona de crecimiento humano a hGHbp (Cunningham and Wells 1989), del sitio de unión de CD4 a gp-120 del virus HIV (Liovic, Stojan et al. 2001), de los residuos implicados en la actividad enzimática de quinasas (Blaber, Baase et al. 1995), de los residuos implicados en la estabilidad de lisosima (Gregoret and Sauer 1993), etc.

En un trabajo previo, realizado por Cravero et al. (no publicado), se realizaron mutaciones puntuales por delección en fase de tres regiones aminoacídicas de la proteína livA elegidas mediante análisis bioinformático. Las regiones elegidas fueron A19A20G21A22A23Q24, A75L76E77A78R79L80 y Q49R50E51D52F53, al producto de dichas mutaciones se lo llamó livA- Δ N, livA- Δ C y livA- Δ M, debido a que las mutaciones están ubicadas en la zona N-terminal, C-terminal y media de la proteína, respectivamente (Figura 3.1). El criterio utilizado para elegir estas zonas fue la conservación de los aminoácidos entre las proteínas ortólogas del grupo de las α -proteobacterias (en el caso

de livA-ΔN, livA-ΔC) o dentro de los miembros del GOG 2960 (livA-ΔM) (Figura 3.2). Las mutaciones por delección en livA fueron realizadas en un vector replicativo para *Brucella* spp. de manera de poder transformar las construcciones en la cepa de *B. abortus* deficiente en livA (*Brucella abortus* iivA::Km) y analizar la complementación del fenotipo avirulento de dicha cepa. Los experimentos de supervivencia in vivo, en ratones BALB/c, demostraron que la complementación en trans con las construcciones que contienen livA-ΔN y livA-ΔC restauran completamente la virulencia de *Brucella abortus* iivA::Km, mientras que la complementación con livA-ΔM no restaura dicho fenotipo. Este resultado demostró que los residuos Q49R50E51D52F53 de livA son indispensables para la infección y replicación in vivo de *Brucella abortus*. Por otro lado, se evaluó la expresión de livA-ΔM y se observaron los mismo parámetros de expresión que en la cepa de *B. abortus* iivA::Km complementada con iivA salvaje, lo que indica que la mutación no interfiere en la estabilidad de la proteína.

Teniendo en cuenta los datos experimentales mencionados y que la deficiencia en la restauración del fenotipo salvaje por livA-ΔM puede ser debido tanto a la importancia de los residuos en la función biológica de la bacteria como a cambios en la estructura de la proteína, en este capítulo se abordaran dos objetivos. El primer objetivo es analizar las características estructurales de la proteína que contiene la delección ΔM y la conservación de la función in vitro previamente descrita para livA (fusión de membranas) y el segundo objetivo es discernir por mutagénesis puntual sitio dirigida cuales son los aminoácidos esenciales de dicha zona de la proteína.

<i>E. coli</i>	I--DP K-	Q A QVHESMPKGIREFGE V KKI QTLQAQ TR	S	VQTQ	57
<i>S. typhimurium</i>	I--DP K-	Q A QVHESMPKGIREFGE I KKI QTLQSQ TR	S	VQTQ	57
<i>S. oneidensis</i>	I--NP K-	E A QLSDSLPSGLKQFAG F ERS QVLQNQ LK	S	VQQH	57
<i>L. pneumophila</i>	F--DP Q-	E A KLFATLPTSLQNFEK I QKF EVLQST SR	T	VQCK	57
<i>X. campestris</i>	I--DF Q-	D A RLSDLVPPGLRQSRE L STF GALQAG GK	T	VQRA	57
<i>P. aeruginosa</i>	L--PP AV	A S QASRLFAGESPLPKA L SQF ALMQSA SK	S	SQML	58
<i>B. pertussis</i>	N--RT QW	D Q NISDLIARS---PAA V RNV AMMTQT AR	T	VQVD	55
<i>A. tumefaciens</i>	STTGT RF	E A LMTD-AAGAAQGVRR A AAF AQADRW NS	R	AVRE	59
<i>S. meliloti</i>	S-TGA RI	D A LMTD-AAGAAQGVRR V AAF AQTENW NS	K	AVKE	58
<i>B. abortus</i>	T-SGQ RV	E A LVTD-AAGAAQGVRR V TAL SQGERV NT	Q	ALRE	58
<i>R. palustris</i>	T-QTN RL	E G LMND-AAGAAQGVRR V TVV TQAEKF RD	K	VVKD	58
<i>E. coli</i>	LLR	EKLAL EQR SE EN S--TEIKKQDPETLPPTL-----	96		
<i>S. typhimurium</i>	LLR	EKLAL EQR SE EA DKPEEVKPAIPAIPVDPQOE-----	99		
<i>S. oneidensis</i>	LLK	EKLEA QAQ NE EK LNATD-----	84		
<i>L. pneumophila</i>	LAR	EKLEQ QHQ ED IK QEVKNNK-----	86		
<i>X. campestris</i>	LLR	EKLDA EQT AA EA SGNAPPTSPTP-----	90		
<i>P. aeruginosa</i>	LAR	ARLEA EAK AE ES LTPPAD-----	86		
<i>B. pertussis</i>	LAR	TRVDQ SAQ QQ EA LAALEAGKPQA-----	88		
<i>A. tumefaciens</i>	AIQ	DENDA RAR ET EA LS-----AAKD-----	87		
<i>S. meliloti</i>	AAR	DENDA LAR EA EA LAAT--GPAAADITGK-----	95		
<i>B. abortus</i>	AIK	SENSA LAR EA EA LAKFEGGSSAKPAKSASVSSSKSDNS	106		
<i>R. palustris</i>	VRL	EENEA KVR AA EA LG-----SGAPTA-----	88		

Figura 3.1. Alineamiento múltiple de secuencias, utilizando el programa Clustal X, de 11 miembros representativos del COG2960: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shewanella oneidensis*, *Legionella pneumophila*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Brucella abortus*,

Rhodopseudomonas palustris. Los residuos idénticos se muestran en azul y los similares en verde. En cuadrados rojos se muestra la localización de las mutaciones por delección correspondientes a livA-ΔN, livA-ΔC y livA-ΔM

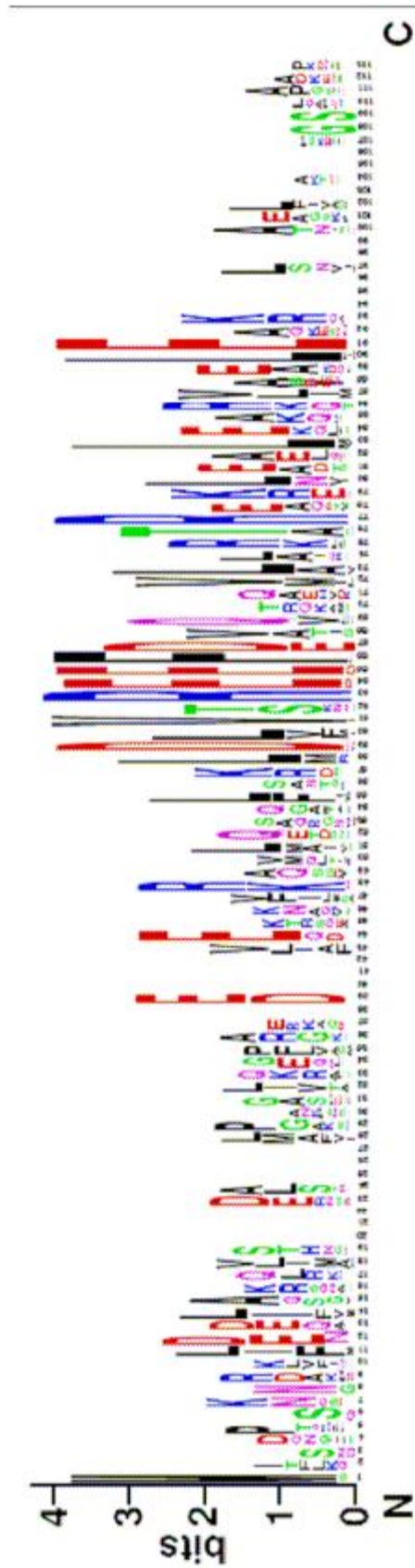


Figura 3.2. Representación gráfica de la secuencia consenso de las proteínas del COG 2960, mostradas como una secuencia "Logo". Se utilizó el programa WebLogo (Hibino, Pironkova et al.), el cual fue alimentado con un alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las 204 proteínas del grupo de ortólogos. El alineamiento fue realizado con el programa Clustal X. En la representación se utiliza el código de una letra para las secuencias aminoacídicas y el tamaño de las letras indica la conservación de ese residuo en el alineamiento. Debajo de la secuencia se indica la posición de cada residuo.

Materiales y métodos

3.1. Construcción de la proteína livA- Δ M

Las técnicas de biología molecular básicas utilizadas fueron la mismas que las descritas en el capítulo 1. *iivA* llevando la delección en fase en los nucleótidos que codifican para los aminoácidos QREDF fue amplificada por PCR utilizando como molde un vector PBBR1MCS que contiene el gen *iivA* con la delección Δ M previamente realizada por Cravero et al. La amplificación fue realizada con los oligonucleótidos AAACCATGGAAACAAGGAAGAATG y TCTCGAGATTATCTTTGGATTTTGACGAAAC. Los amplicones fueron clonados en pGEM-T (Promega) y luego liberados con las enzimas NcoI y XhoI contenidas en la secuencia de los primers. Los fragmentos liberados fueron clonados en el vector de expresión para *E. coli* pET24D (Novagene) en marco con el promotor de T7 en el extremo 5' y con una etiqueta de seis histidinas en el extremo 3'. Las construcciones fueron chequeadas por secuenciación nucleotídica utilizando el servicio de secuenciación prestado por el INTA.

La expresión y purificación de *livA- Δ M* y los experimentos de cross-linking, light scattering estático, difracción circular y de fusión de liposomas se realizaron de igual manera a lo descrito en el capítulo 1 y 2.

3.2. Construcción de los derivados de *iivA*, llevando mutaciones puntuales, en un vector replicativo para *Brucella* spp.

Para realizar las mutaciones puntuales en la región QREDF de *livA* se alteraron los codones que codifican para cada uno de los aminoácidos por separado por alanina, eligiendo el codón que codifica para dicho aminoácido más abundante en *Brucella* spp. que es GCT, mediante la técnica de PCR que se describirá a continuación para la mutación Q49A (el resto de las mutaciones se realizó de la misma manera). Primero se realizaron dos reacciones de PCR por separado utilizando los primers pBruff y Q49Arev en una reacción y Q49Aff y pBrurev en la otra de manera de obtener un fragmento de 630 pb y otro de 314 pb con una parte de la región 5' de uno y 3' del otro con nucleótidos complementarios. Esta primera reacción de PCR se realizó con la enzima AccuPrime (Invitrogen) que no deja residuos de adenina en los extremos y se utilizó como molde un plásmido pGemT conteniendo una zona de 1 Kb del DNA cromosomal de *Brucella abortus* S2308 que contiene al gen *iivA* y zonas flanqueantes suficientemente extensas como para asegurar la presencia del promotor nativo en ella. Los dos productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa, las bandas correspondientes se

purificaron con un Kit de Quiagen, se mezclaron, se desnaturalizaron por calor y se dejaron renaturalizar lentamente para la obtención de moléculas híbridas. Luego se realizó una segunda PCR sin el agregado de oligonucleótidos durante los 10 primeros ciclos para permitir la extensión de los fragmentos por la polimerasa Taq para obtener ADN doble cadena, y agregando luego los oligonucleótidos pBruff y pBrurev que amplifican la región completa. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGemT para ser secuenciados y luego se subclonaron en el vector replicativo en *Brucella* spp. PBBR1MSC en el sitio BamHI.

Tabla 3.1

Oligonucleótido	Secuencia	Observación
pBruff	AAGGATCCCGAGCGGGTTGGAGATATAA	Contiene la ER BamH I
pBrurev	AAGGATCCAAGCTGAATCCGAACACCAG	Contiene la ER BamH I
Q49Aff	CGTTGTGGCTCGTGAGGATTTG	Contiene mutación en Gln49
Q49Arev	CAAAATCCTCACGAGCCACAACG	Contiene mutación en Gln49
R50Aff	GTTGTGCAGGCTGAGGATTTTGA	Contiene mutación en Arg50
R50Arev	TCAAATCCTCAGCTGCACAAC	Contiene mutación en Arg50
E51Aff	GTTGTGCAGCGTGCTGATTTTG	Contiene mutación en Glu51
E51Arev	CAAAATCAGCACGCTGCACAAC	Contiene mutación en Glu51
D52Aff	GTTGTGCAGCGTGAGGCTTTT	Contiene mutación en Asp52
D52Arev	AAAAGCCTCACGCTGCACAAC	Contiene mutación en Asp52
F60Aff	CAGCGTGAGGATGCTGAAGCC	Contiene mutación en Phe53
F60Arev	GGCTTCAGCATCCTCACGCTG	Contiene mutación en Phe53

3.3. Condiciones de crecimiento de las cepas de *Brucella*.

Las cepas de *Brucella* fueron crecidas en caldo soja triptosa (Tryptic Soy Broth TSB) (DIFCO) a 37°C con agitación. Como medio solidó se utilizó agar triptosa (AT) de DIFCO. En los casos que corresponde se adicionó antibióticos a una concentración de 25 µg/ml para Kanamicina y 10 µg/ml para Cloranfenicol.

3.4. Preparación de *Brucella abortus* iivA::Km electrocompetentes

Se inocularon 100 ml de TSB con 1 ml de un cultivo saturado de *Brucella abortus* iivA::Km y se incubó a 37°C con agitación hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm de 0.5. Se enfrió el recipiente conteniendo las bacterias por 15 minutos en hielo y se centrifugó el cultivo a 4000 rpm a 4°C por 15 min. Se descartó el sobrenadante y se

resuspendieron las bacterias en 50 ml de agua apirogénica. Este paso de lavado se repitió 3 veces y luego se resuspendieron las bacterias en 300 μ l de agua apirogénica de manera de tener una densidad bacteriana de aproximadamente $1-6 \times 10^9$ células/ml. Esta suspensión fue fraccionada en alícuotas de 50 μ l y guardada hasta su utilización a -70°C .

3.5. Transformación de los vectores replicativos conteniendo las mutaciones puntuales en *Brucella abortus* iivA::Km

Las bacterias competentes se descongelaron en un baño de hielo y se adicionó 0.5-1 μ g de plásmido en 50 μ l de bacterias. Se dejó 5 minutos en hielo para permitir el establecimiento del contacto entre las bacterias y el ADN. Transcurrido el tiempo se colocó la suspensión en cubetas de electroporación de 0.2 cm estériles previamente enfriadas. Se aplicó un pulso eléctrico fijando los parámetros del electroporador (Gene Pulse/Pulse controller, BioRad Ca, USA) en 25 μ F, 2.5 kV (12.4 KV/cm) y 400 Ω . Inmediatamente después del pulso eléctrico se agregó 1 ml de medio SOC (BRL-Bethesda) y se cultivaron las células a 37°C con agitación constante de 200 rpm durante toda la noche. Posteriormente se sembraron las bacterias en placas de AT suplementadas con el antibiótico de selección (cloranfenicol) de manera de obtener colonias aisladas. La eficiencia de transformación descrita con este método para plásmidos replicativos en *B. abortus* S19 es de 1×10^4 UFC/ μ g de ADN recombinante (McQuiston, Schurig et al. 1995) y es similar a lo obtenido en este trabajo.

3.6. Análisis de la expresión de las proteínas mutantes en *Brucella abortus*

La expresión de las proteínas conteniendo las mutaciones puntuales en *B. abortus* iivA::Km fue analizada por western blot utilizando un suero policlonal de conejo dirigido contra livA de la misma manera a lo descrito en el capítulo 1. Todas las cepas con las mutaciones puntuales y las cepas controles (*B. abortus* S2308, *B. abortus* iivA::Km y *B. abortus* iivA::Km complementada con iivA salvaje) fueron llevadas a la misma densidad óptica antes de lisarlas y resuspenderlas en buffer de siembra de manera de poder comparar los niveles de expresión de las distintas variantes de la proteína livA.

3.7. Ensayos de supervivencia en ratones BALB/c

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, provistos por el bioterio del CICVyA del INTA-Castelar. Se utilizaron grupos de 5 ratones por cada tiempo y cepa a ensayar, inoculados intraperitonealmente con 2.5×10^5 UFC/ratón de las

cepas diluidas en buffer PBS 1X. Además de analizar la supervivencia de las 5 cepas complementadas con las mutaciones puntuales de *livA*, se utilizaron como cepas control a *B. abortus* S2308, *B. abortus* *livA::Km* y dos cepas de *B. abortus* *livA::Km* complementadas, una con *livA* salvaje y otra con *livA-ΔM*. A los tiempos post inoculación de 9 y 22 días, 5 ratones de cada grupo fueron sacrificados con dióxido de carbono y a cada ratón se le extrajo el bazo. Los bazos fueron pesados para estimar la esplenomegalia producida y posteriormente homogenizados, utilizando poters, en 5 ml de PBS 1X. El número de bacterias por bazo se determinó por diluciones seriadas de los homogenatos y plaqueo en AT suplementado con los antibióticos correspondientes. Las placas fueron incubadas en estufa a 37°C por 2 o 3 días, luego de lo cual se contaron las colonias y se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC) por bazo.

Resultados

3.1. Análisis estructural de livA- Δ M

Al seleccionar las regiones para realizar mutagénesis y posteriores estudios funcionales se debe ser cuidadoso y analizar que las mutaciones producidas no causen un rearrreglo estructural en la proteína estudiada, debido a que esto podría llevar a interpretaciones erróneas. Por tal motivo, se decidió estudiar si las características estructurales básicas de livA- Δ M son similares a las descriptas para livA salvaje.

Para llevar a cabo dicho objetivo, se realizó una construcción de livA- Δ M en un vector de expresión para *E. coli* y se purificó la proteína recombinante en forma nativa para realizar los estudios estructurales. Primero se analizó la conservación de la estructura cuaternaria de livA- Δ M. Para ello se realizaron experimentos de Light scattering estático y cross-linking químico, en los que se pudo observar que livA- Δ M conserva su capacidad de formar trímeros y que la distribución de esta especie trimérica es homogénea (Figura 3.3). Por otro lado, se analizó el porcentaje de estructura secundaria y la estabilidad de livA- Δ M por espectroscopia de dicroísmo circular. Se observó que el porcentaje de estructura α -hélice de livA- Δ M en buffer Tris/HCl pH 8.0 es idéntico al de la proteína salvaje, de donde se puede extrapolar que en esta condición la α -hélice C-terminal responsable de la trimerización está intacta y que el dominio N-terminal se encuentra no estructurado de igual manera que en livA (Figura 3.4 A y tabla 3.2). Tampoco hubo variaciones en la estabilidad ante la desnaturalización termal de livA- Δ M (Figura 3.4 B).

Por último, se estudio si livA- Δ M conserva la capacidad de formar una α -hélice anfipática en su dominio N-terminal ante la presencia de distintas sales, pH ácido, SDS y vesículas fosfolipídicas, evaluados en las mismas condiciones a las descriptas para la proteína salvaje. Mediante la obtención del espectro de dicroísmo circular y comparación de la elipticidad molar a 222 nm de livA- Δ M en Tris/HCl pH 8.0 y en presencia de los distintos aditivos se observa que la capacidad de formar la α -hélice N-terminal es igual que la de livA. Del mismo modo que en la proteína salvaje, el ion fosfato es el que provoca el mayor incremento de la señal a 222 nm y de la estabilidad ante la desnaturalización térmica (Tabla 3.3). A partir de estos resultados que muestran que livA- Δ M sufre un cambio conformacional en presencia de SUV, también se puede inferir que la proteína conserva su capacidad de interactuar con membranas fosfolipídicas.

Los resultados presentados sugieren que la deficiencia de livA- Δ M para complementar el fenotipo atenuado de la cepa *B. abortus livA::Km* en ratones, no puede ser explicada por la producción de cambios conformacionales groseros en la proteína. Sin embargo, deberían ser analizadas otras situaciones, como por ejemplo la pérdida de la

capacidad de interactuar con otra proteína o receptor putativo in vivo. Por otro lado, no se descarta que la proteína haya cambiado su estructura de una manera mucho más sutil a la analizada aquí y que sean necesarios experimentos más sensibles para encontrar las diferencias entre livA- Δ M y la proteína salvaje.

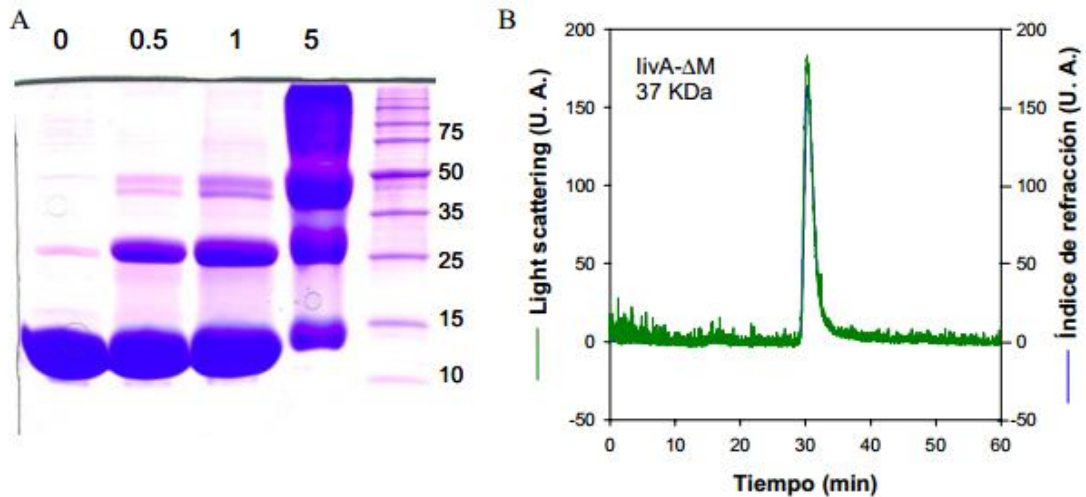


Figura 3.3. Análisis de la estructura cuaternaria de livA- Δ M. (A) Cross-linking químico de livA- Δ M. Los productos de cross-linking fueron separados mediante Tricina-SDS-PAGE, seguidos por tinción con Comassie Brilliant Blue R250. Se muestran las masas correspondientes al marcador de peso molecular en kDa a la derecha del gel. En las calles del gel se indica la concentración de cross-linking EGS utilizada en cada caso. (B) Cromatograma en el que se grafica la señal de índice de refracción (azul) y de lighth scattering (verde) en función del tiempo de elusión a través de una columna de filtración molecular Superdex 75. En la parte superior izquierda del cromatograma se observa el peso molecular calculado.

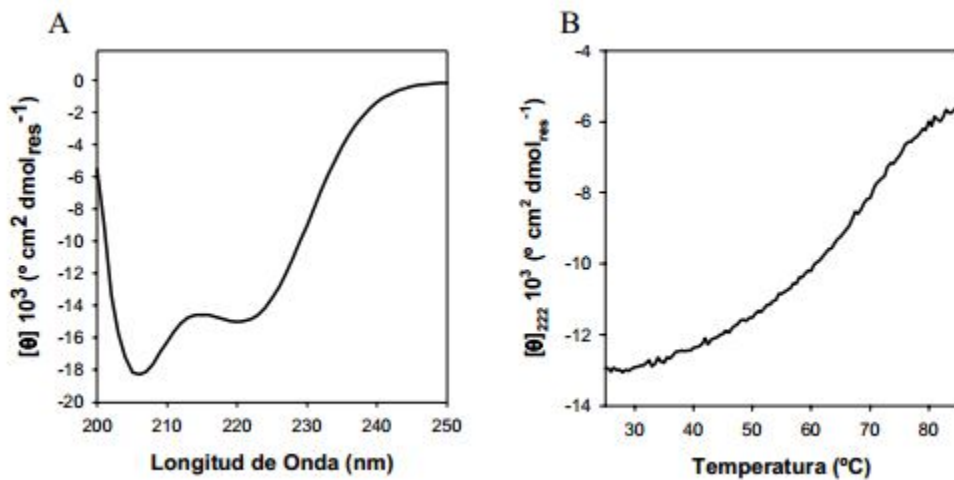


Figura 3.4. Estructura secundaria y estabilidad térmica de livA- Δ M. (A) Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano y (B) curva de desnaturalización térmica obtenida por la medida de la elipticidad molar a 222 nm en función de la temperatura. La temperatura de melting calculada fue 64°C. Las medidas fueron realizadas en 50 mM de buffer Tris/HCl pH 8.0.

Tabla 3.2. Porcentaje de estructura secundaria de livA- Δ M obtenidos a partir del análisis del espectro de CD en 50 mM de Tris/HCl pH 8.0 con el programa K2D. También se muestran los porcentajes para livA de modo comparativo.

	<i>α-hélice</i>	<i>Hoja β</i>	Random coil
livA	30	16	54
livA- Δ M	31	16	53

Tabla 3.3. Incremento de la señal de CD a 222 nm de livA- Δ M en las distintas condiciones ensayadas con respecto a la señal medida en 50 mM Tris/HCl pH 8.0.

	livA- Δ M
0.4 M Fosfato de sodio, pH 8.0	44.88
0.4 M Sulfato de sodio, pH 8.0	16.66
1.2 M Cloruro de sodio, pH 8.0	5.7
50 mM Acetato de sodio, pH 4.0	35.06
5 mM SDS, pH 8.0	19.19
SUV DPPC, pH 8.0 *	35.88
SUV DPPC:DPPA 75:25, pH 8.0 *	63.53

* la proporción lípido/proteína utilizada fue 50/1.

3.2. Estudio de la capacidad fusogénica de livA- Δ M

La función bioquímica sugerida para livA es la de fusionar membranas lipídicas, si bien esta actividad fue solo estudiada in vitro. Dado que la mutación en los residuos QREDF está directamente relacionada con la supervivencia de Brucella en ratones, lo cual debería estar ligado a la actividad bioquímica de livA, es importante determinar si la proteína livA- Δ M conserva su carácter fusogénico.

Para llevar a cabo tal objetivo se analizó la capacidad de livA- Δ M de agregar y fusionar liposomas por dos de los métodos utilizados previamente para discernir la capacidad fusogénica de membrana de la proteína salvaje.

Los ensayos elegidos fueron el de la medida de la turbidez, que discierne la capacidad de la proteína de agregar vesículas, y el de mezclado del contenido acuoso, dado que es el ensayo que refleja la fusión de los liposomas en su estadio final. Ambos ensayos fueron realizados con vesículas unilamelares pequeñas a pH 4.0 y pH 8.0 en las mismas condiciones experimentales a las descriptas para livA en el capítulo 2.

Los resultados obtenidos para livA- Δ M fueron similares a los de la proteína salvaje, o sea que ambas proteínas son capaces de agregar y fusionar liposomas, ya sea a pH ácido o cercano al neutro (Figura 3.5 A y B). De todos modos, si bien el resultado experimental obtenido no concuerda con la hipótesis de relacionar la actividad fusogénica de membrana in vitro con la capacidad que tiene livA de afectar la supervivencia de Brucella en ratones, se debe tener en cuenta que los sistemas in vivo son muchos más complejos que los que se pueden reproducir en el laboratorio con membranas modelos, debiendo considerar otros parámetros.

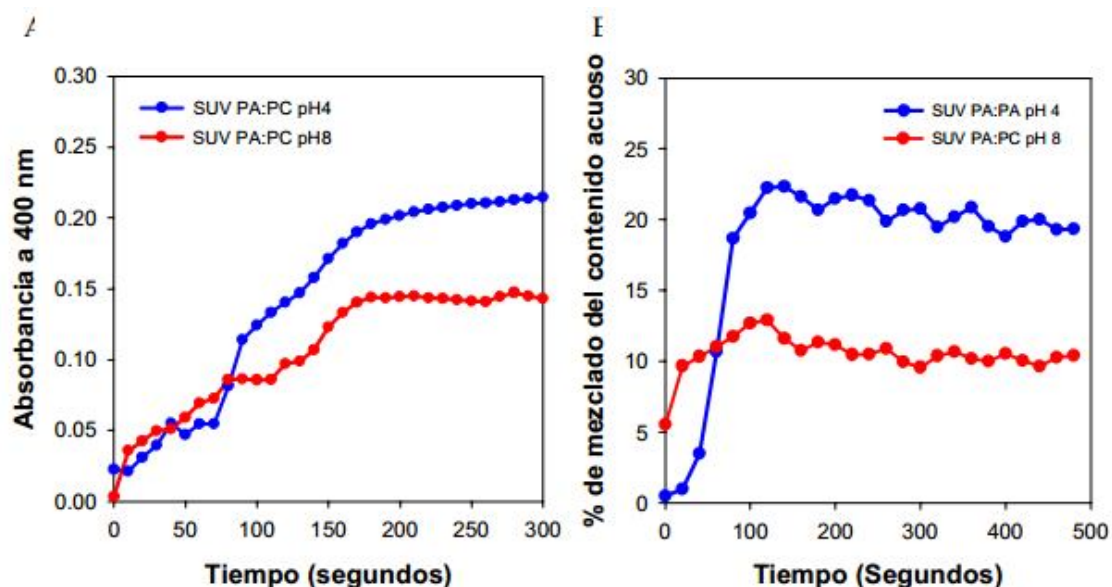


Figura 3.5. Medidas de la turbidez (A) y del mezclado del contenido acuoso (B) de liposomas en función del tiempo después del agregado de livA- Δ M. Se utilizaron vesículas unilamelares pequeñas compuestas de 75% de DPPC y 25% de DPPA formadas a pH 4.0 o 8.0. pH 8.0 corresponde a 50 mM de Tris/HCl pH 8 y pH 4 a 50 mM de acetato de sodio pH 4. La proporción lípido/proteína utilizada fue 100/1.

3.3. Identificación de los aminoácidos esenciales para la función de livA

Con el objetivo de identificar cuales son los aminoácidos de livA que están directamente involucrados en la virulencia de *B. abortus*, se construyeron mutaciones puntuales de cada uno de los residuos de la zona QREDF por alanina. Las variantes de livA mutadas se clonaron en el vector replicativo para *Brucella* spp., PBBR1MSC, y se transformaron en la cepa de *B. abortus* deficiente en livA, *B. abortus* iivA::Km. Las construcciones fueron realizadas de manera de contener zonas flanqueantes río abajo y río arriba del codón de inicio y del codón de terminación de livA, respectivamente. De esta manera se aseguró que las proteínas mutantes derivadas de livA se expresen con su propio promotor. De cada una de las cepas complementadas en trans resultantes; llamadas *B. abortus* S2308 iivA-Q49A, iivA-R50A, iivA-E51A, iivA-D52A e iivA-F53A; se obtuvo un extracto proteico que fue sometido a western blot, utilizando un suero policlonal dirigido contra livA. En el mismo ensayo se introdujeron como cepas control a *B. abortus* S2308, *B. abortus* iivA::Km y a *B. abortus* iivA::Km complementada en trans con livA salvaje o livA- Δ M, conteniendo las mismas secuencias flanqueantes que las variantes de livA con mutaciones puntuales. En la figura 3.6 se puede observar que las cepas complementadas con las distintas mutaciones puntuales derivadas de livA expresan las proteínas con tamaño y abundancia similares a lo que lo hace la cepa de *B. abortus* complementada con livA salvaje, indicando que las mutaciones estudiadas no afectan la estabilidad de la proteína.

Posteriormente, se ensayó la virulencia de las cepas de *B. abortus* complementadas con las construcciones expresando las proteínas con las mutaciones puntuales derivadas de livA y con las otras cuatro cepas antes mencionadas a modo de control, en ratones BALB/c. La virulencia en las cepas de *Brucella* spp. se relaciona con su capacidad de invadir y replicarse en bazo, provocando esplenomegalia (Rajashekara, Eskra et al. 2006), por lo que los parámetros utilizados aquí para comparar las distintas cepas fueron el recuento de las unidades formadoras de colonia y el peso de los bazo, a los 9 y 22 días post-infección intraperitoneal. Como se puede observar en la figura 3.7, ninguna de las cepas complementadas con las mutaciones puntuales de livA mostró diferencias significativas con respecto a la cepa de *B. abortus* S2308 salvaje o a la cepa complementada con livA, ya sea en esplenomegalia o en el recuento de las UFC/bazo, por lo que se concluye que las mutaciones puntuales de livA no afectaron la infección y sobrevivencia en ratones de las bacterias. Por otro lado, se observó que la cepa de *B. abortus* deficiente en livA y la complementada con livA- Δ M son significativamente más atenuadas en su virulencia como ya se ha descrito previamente (Cravero et al., no publicado), lo que valida los resultados obtenidos.

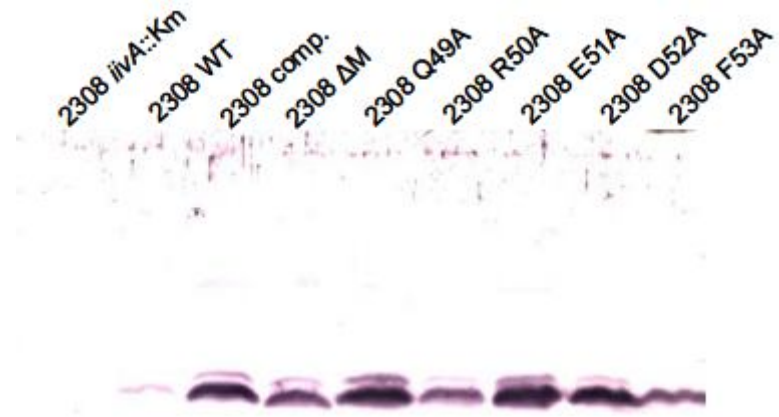
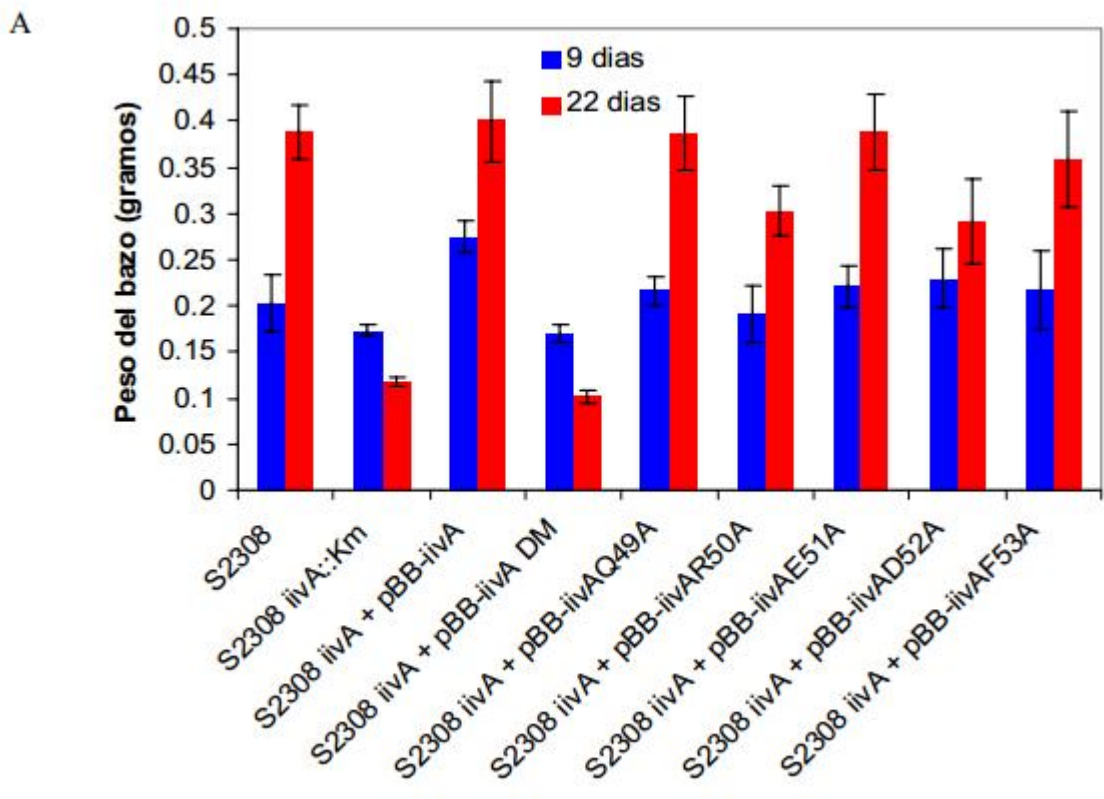


Figura 3.6. Western blot revelado con anticuerpo anti-livA de las cepas derivadas de *B. abortus* S2308 posteriormente utilizadas para los ensayos en ratones.



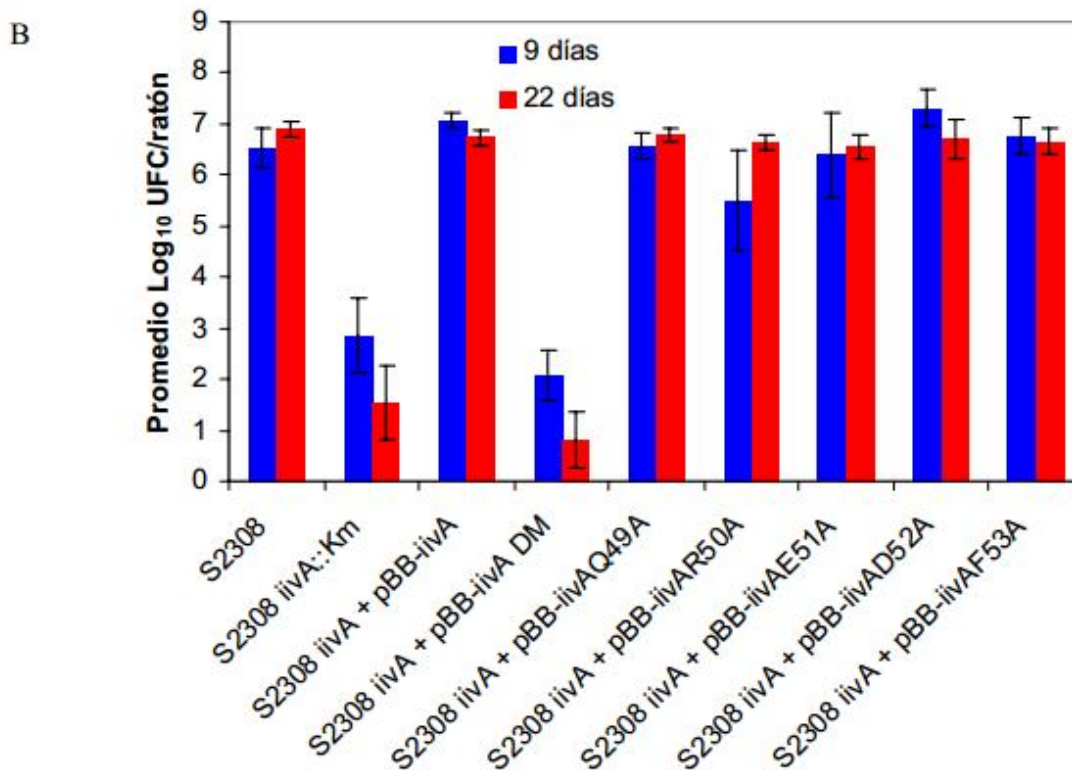


Figura 3.7. Efecto de las mutaciones puntuales en livA sobre la supervivencia de *Brucella abortus* en ratones. Los ratones fueron inoculados intraperitonealmente con 2.5×10^5 UFC de cada bacteria. El peso de los bazos (A) y el recuento de las unidades formadoras de colonia por bazo (B) a los 9 y 22 días post-infección son representados por los valores promedios de los grupos de 5 ratones. Se indican las barras del error estándar para cada caso.

Discusión

En la primera parte de este capítulo se demostró que la eliminación de los aminoácidos QREDF no afecta la estructura y la actividad fusogénica de membrana in vitro de livA. Por lo tanto, el hecho de que la mutación ΔM afecta significativamente la supervivencia de *Brucella abortus* en ratones, no puede ser explicado por tales parámetros.

La región de livA involucrada en la mutación, Q49R50E51D52F53, se encuentra contenida parcialmente en la α -hélice coiled-coil C-terminal predicha por el programa Paircoil. Mientras que el aminoácido Q49 no forma parte del coiled-coil predicho, el resto de los aminoácidos son designados por el programa Paircoil para ocupar las posiciones e, f, g y a de la repetición heptamérica (Figura 1.4 de capítulo 1). Por otro lado, otros programas de predicción de estructura secundaria, como JPred y PSIPred, predicen que la estructura α -hélice empieza en el residuo D52. Además, la predicción de la α -hélice anfipática en el dominio N-terminal de livA indica que esta terminaría entre los aminoácidos N43 y L45, antes de la región que involucra la delección ΔM . Por lo tanto,

teniendo en cuenta estas predicciones y los resultados obtenidos, se sugiere que la región QREDF podría estar formando parte de un dominio flexible que conectaría a los dominios N-terminal y C-terminal de livA. También, es interesante notar que el residuo F53 en la posición "a" del coiled-coil no es encontrado comúnmente en proteínas naturales, lo que argumenta a favor de que el mismo no este formando parte del coiled-coil (Tripet, Wagschal et al. 2000). Si la hipótesis mencionada fuera verdadera, por los experimentos realizados en este trabajo no se podría detectar ningún cambio estructural, ya que las dos regiones α -hélices se formarían de igual manera que en la proteína salvaje, dando los mismos espectros de dicroísmo circular. Una región flexible entre la α -hélice N-terminal y C-terminal de livA podría permitir que los dos dominios de la proteína se doblen sobre si, en el momento que interaccionan con la membrana, contribuyendo a acercar las dos bicapas lipídicas, lo cual permitiría la fusión de las mismas, siguiendo un mecanismo similar al de las proteínas fusogénicas virales (Dutch, Jardetzky et al. 2000). En este punto es contradictorio que livA- ΔM sea capaz de producir la fusión de liposomas, ya que anteriormente se relacionó este proceso con la virulencia de *Brucella abortus*. De todos modos, se debe tener en cuenta que las membranas de los liposomas utilizados para realizar los experimentos de fusión, poseen una mayor curvatura y es más fácil producir perturbaciones de los lípidos locales en ellas que en las membranas biológicas, lo cual es un paso importante para la fusión de membranas.

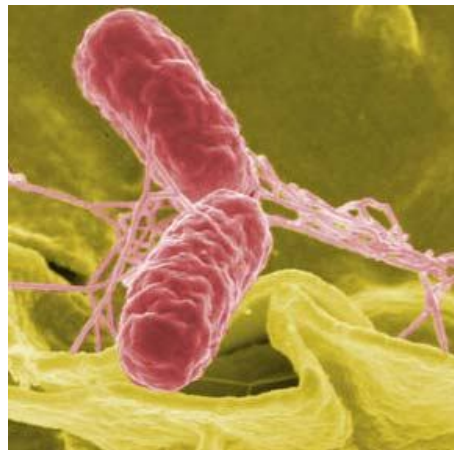
Una hipótesis alternativa que explicaría los resultados observados sería que la zona estudiada estuviera involucrada en el reconocimiento e interacción de otra proteína, o ligando o receptor in vivo que fuera importante para establecer el mecanismo que involucra la supervivencia de *Brucella abortus* en ratones.

La zona REDF de livA está conservada en la mayoría de las proteínas homólogas del COG2960, lo que sugiere que esta región cumple un rol fundamental en la función biológica de este grupo de proteínas (en lugar de D predomina E en el resto de las proteínas del COG2960). Sin embargo, mediante los análisis de virulencia en ratones, utilizando las cepas de *B. abortus* iivA::Km complementadas con las variantes de livA con mutaciones puntuales en la zona ΔM , se observó que la mutación individual de los aminoácidos de dicha zona no afectan la supervivencia de la bacteria. Este resultado argumenta en contra de que esta sea una región específica para reconocimiento de un ligando o sugiere que si existe dicha interacción es de baja especificidad.

Bibliografía

- Blaber, M., W. A. Baase, et al. (1995). "Alanine scanning mutagenesis of the alpha-helix 115-123 of phage T4 lysozyme: effects on structure, stability and the binding of solvent." *J Mol Biol* **246**(2): 317-30.
- Cunningham, B. C. and J. A. Wells (1989). "High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis." *Science* **244**(4908): 1081-5.
- Dutch, R. E., T. S. Jardetzky, et al. (2000). "Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis." *Biosci Rep* **20**(6): 597-612.
- Gregoret, L. M. and R. T. Sauer (1993). "Additivity of mutant effects assessed by binomial mutagenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 4246-50.
- Hibino, H., R. Pironkova, et al. (2002). "RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca(2+) channels." *Neuron* **34**(3): 411-23.
- Liovic, M., J. Stojan, et al. (2001). "A novel keratin 5 mutation (K5V186L) in a family with EBS-K: a conservative substitution can lead to development of different disease phenotypes." *J Invest Dermatol* **116**(6): 964-9.
- McQuiston, J. R., G. G. Schurig, et al. (1995). "Transformation of *Brucella* species with suicide and broad host-range plasmids." *Methods Mol Biol* **47**: 143-8.
- Morrison, K. L. and G. A. Weiss (2001). "Combinatorial alanine-scanning." *Curr Opin Chem Biol* **5**(3): 302-7.
- Rajashekara, G., L. Eskra, et al. (2006). "Brucella: functional genomics and host-pathogen interactions." *Anim Health Res Rev* **7**(1-2): 1-11.
- Sidhu, S. S. and A. A. Kossiakoff (2007). "Exploring and designing protein function with restricted diversity." *Curr Opin Chem Biol* **11**(3): 347-54.
- Tripet, B., K. Wagschal, et al. (2000). "Effects of side-chain characteristics on stability and oligomerization state of a de novo-designed model coiled-coil: 20 amino acid substitutions in position "d"." *J Mol Biol* **300**(2): 377-402.

CAPITULO 4



Caracterización de la proteína YqiC de *Salmonella typhimurium* y construcción y evaluación de una cepa deficiente en la misma

4.1. El género *Salmonella*

Introducción

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, orden Enterobacteriales, clase γ -Proteobacteria (Garrity 2004). Son bacilos intracelulares facultativos, Gram negativos y anaerobios facultativos. La mayoría de las especies de *Salmonella* presentan flagelos peritricos que le atribuyen movilidad. Además, no desarrollan capsula ni esporas.

El género *Salmonella* es extremadamente heterogéneo, comprende más de 2000 serotipos, de los cuales solo unos pocos son patógenos para el humano (Ochman and Groisman 1994). Sin embargo, a pesar de esta aparente complejidad, las especies de *Salmonella* son similares genéticamente y los distintos serotipos son diferenciados por los antígenos de superficie somáticos, flagelares y capsulares. El tratamiento taxonómico actual de *Salmonella* reagrupa a todas las cepas (patógenas o no) en dos únicas especies: *S. enterica* y *S. bongori*, siendo esta última no patógena para el humano. A su vez, la especie *S. enterica*, esta conformada por seis subespecies, que son: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *houtenae*, *diarizonae* e *indica* y cada subespecie está conformada por distintos serotipos (Reeves, Evins et al. 1989). Debido a que esta clasificación es poco práctica, a menudo se usa una nomenclatura simplificada, que es la que se usará en este trabajo, en la que se consideran los nombres de los serotipos como nombres de especies. De este modo, por ejemplo, *Salmonella enterica* subgrupo *enterica* serotipo *Typhimurium* se

referirá como *Salmonella typhimurium*.

4.2. La salmonelosis

Salmonella spp. es uno de los patógenos más distribuidos en el mundo, y produce una enfermedad denominada salmonelosis, que se calcula que afecta a 1.3 billones de humanos por año.

El hábitat primario de las especies de *Salmonella* es el tracto intestinal de los animales, pudiendo encontrarse también en el tracto intestinal de los humanos, en alimentos contaminados con heces y en el ambiente. Dependiendo del grado de adaptación a un hospedador o ambiente específico se habla de: serotipos adaptados al hospedador, como *S. typhi* que solo infecta a humanos y algunos primates, o serotipos de amplio rango de hospedador (a este grupo pertenecen la mayoría), como *S. dublin*, *S. typhimurium* y *S. choleraesuis*, que pueden infectar tanto a humanos como a una gran variedad de animales (Coburn, Grassl et al. 2007).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad dependen tanto de la susceptibilidad del hospedador como del serotipo de *Salmonella* con el que es infectado. Se pueden dar tres tipos de manifestaciones clínicas que son: la fiebre entérica o tifoidea, la enterocolitis o diarrea y la bacteremia.

4.3. Infección y replicación intracelular

Generalmente *Salmonella* spp. penetra en el hospedador por la vía digestiva, a través de alimentos o agua contaminada. Luego de la ingestión oral, las bacterias que sobreviven al pH ácido y a otros sistemas de defensa del tracto digestivo, inician la infección en el íleon y/o colon donde invaden el epitelio interactuando tanto con enterocitos como con células M (células epiteliales especializadas que recubren los nódulos linfáticos de las placas de Peyer del íleon).

El mecanismo de invasión involucra la unión de la bacteria a receptores específicos del hospedador y la acción del sistema de secreción tipo III bacteriano (SST3). La bacteria transloca proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula eucariota, utilizando el SST3, lo que provoca, entre otros efectos, rearrreglos en el citoesqueleto de actina. Esto desemboca en la formación de proyecciones en la membrana del hospedador (llamadas "ruffling"), las cuales favorecen la internalización de la bacteria en vacuolas grandes similares a los macropinosomas. Inmediatamente después de invadir el epitelio intestinal, las bacterias se translocan alcanzando la lámina propia y son fagocitadas por los macrófagos, donde son capaces de sobrevivir y replicarse. Para llevar a cabo esto, las

bacterias utilizan moléculas efectoras, translocadas por un segundo tipo de SST3, y diversos factores de virulencia.

Una vez que *Salmonella* spp. invadió la célula eucariota, se localiza dentro de un compartimiento membranoso conocido como SCV (por *Salmonella* containing vacuoles). *Salmonella* spp. es capaz de sobrevivir y replicarse dentro de las SCV, y eventualmente mata a la célula hospedadora, lo que conlleva a la liberación de bacterias en el medio extracelular permitiendo la infección de nuevas células. El tráfico intracelular de las SCV implica la interacción de éstas con endosomas tempranos inmediatamente después de la invasión. Sin embargo, dentro de los 30 minutos siguientes a la infección, las SCVs no siguen el camino endosómico y no se produce la fusión con lisosomas, evitando así la exposición a enzimas degradativas. A pesar de que las SCV no se fusionan con el lisosoma adquieren algunas glicoproteínas lisosomales, como LAMP-1 (Finlay and Brumell 2000). Posteriormente, las bacterias intracelulares comienzan a replicarse y a formar unas extensiones filamentosas en la membrana de las SCVs, conocidas como SIF (*Salmonella* induced filaments) (Steele-Mortimer, Meresse et al. 1999). Aunque el papel de la formación de las SIF en la interacción de *Salmonella* con macrófagos no está definido, éstas son indispensables para la supervivencia intracelular.

Generalmente, el sistema inmune se encarga de destruir a las bacterias intracelulares mediante la liberación de citoquinas y activación de los macrófagos por interferón γ . Sin embargo, en algunas personas inmunocomprometidas esto no ocurre, lo que permite que *Salmonella* se disemine en el organismo a través del sistema linfático y sanguíneo provocando una bacteremia que puede desembocar en septicemia. De esta forma *Salmonella* puede colonizar distintos órganos como hígado, bazo, tracto urinario, y tejido muscular, entre otros.

4.4. Factores de virulencia

Las estrategias de patogénesis de *Salmonella* spp. incluyen el traspaso de la barrera mucosa intestinal y la interacción de la bacteria con células del sistema inmune, donde se comporta como un patógeno intracelular. Por lo tanto, los mecanismos de virulencia que emplea la bacteria son necesariamente complejos. Se estima que aproximadamente 4% del genoma de *Salmonella typhimurium*, o sea unos 200 genes, codifica para factores de virulencia (Bowe, Lipps et al. 1998).

Los factores de virulencia de *Salmonella* se pueden dividir en dos grupos: por un lado los factores que están involucrados en la formación de estructuras de superficie en la bacteria y por otro lado los factores de virulencia solubles que modifican la fisiología celular del hospedador y protegen a la bacteria de sistemas antimicrobianos del mismo (van Asten

and van Dijk 2005). A su vez, los factores de virulencia de *Salmonella* spp. pueden estar codificados en plásmidos o en el cromosoma, ya sea en forma aislada o formando agrupaciones pequeñas (islotos) o agrupaciones mayores, llamadas islas de patogenicidad (Hensel 2004).

4.4. a. Factores de virulencia que forman estructuras superficiales

Dentro del grupo de factores de virulencia que forman estructuras superficiales de la bacteria y que además son dianas del sistema inmune del hospedador se encuentran los siguientes:

-Lipopolisacáridos: Es uno de los principales determinantes de virulencia en *S. typhimurium* y está compuesto de tres dominios: el lípido A, responsable de la actividad endotóxica, el oligosacárido central y el polisacárido o antígeno O (Kaniuk, Monteiro et al. 2002). Las cepas de *Salmonella* que poseen el antígeno O completo son referidas como lisas, mientras que las que no lo tienen son referidas como rugosas. Se reportó que la presencia del antígeno O es importante en la bacteria para la colonización del intestino (Nevola 1985), la resistencia a la muerte por neutrófilos (Okamura and Spitznagel 1982) y para la resistencia a la muerte por la cascada del complemento (Joiner, Grossman et al. 1986).

-Flagelos: *Salmonella* spp. poseen de 5 a 10 flagelos. Los flagelos están compuestos por la proteína flagelina. Esta proteína es un antígeno importante que posee una región altamente variable, que se utiliza para clasificar a *Salmonella* en distintos serotipos. Esta variabilidad en la proteína flagelar le permite a la bacteria escapar de los sistemas de defensa del hospedador (Fan and Macnab 1996). Los flagelos dirigen a la bacteria hacia el epitelio intestinal mediante quimiotaxis, le permiten atravesar la espesa capa de mucina y contribuyen en el proceso de inflamación.

-Cápsula: El único antígeno capsular que se conoce en *Salmonella* es el antígeno Vi, el cual es un polímero lineal del ácido α -1,4 (2-deoxi)-2-N-acetilgalacturónico. Se encuentra presente solo en tres serotipos de *Salmonella* (*typhi*, *paratyphi C* y *dublín*) y está directamente relacionado con su capacidad invasiva (Raffatellu, Chessa et al. 2006).

-Fimbrias: En *Salmonella typhimurium* se han descrito más de 13 operones implicados en la formación de fimbrias, aunque no todas ellas están exclusivamente asociadas con la virulencia bacteriana (Humphries, Raffatellu et al. 2003). *Salmonella* tiene varios tipos de fimbrias o "pili". Las fimbrias son estructuras de naturaleza proteica consideradas como adhesinas, ya que facilitan la unión de la bacteria a receptores específicos de la célula hospedadora. Entre los varios tipos de fimbrias se encuentran las Lpf (long polar fimbria) que median la unión de la bacteria a las placas de Peyer, las Tafi

(thin aggregative fimbria) y las fimbrias tipo 1, que son codificadas por el plásmido de virulencia (Romling, Sierralta et al. 1998; Fierer and Guiney 2001; Weening, Barker et al. 2005).

4.4. b. Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad de Salmonella (SPIs) se definen como grandes agrupaciones de genes dentro del cromosoma bacteriano. Las SPIs codifican para determinantes responsables de establecer interacciones específicas con el hospedador y factores que son necesarios para la virulencia bacteriana. Las SPI poseen un contenido de GC diferente al del resto del cromosoma bacteriano y en ocasiones presentan elementos genéticos móviles, como integrasas y transposasas, por lo que se propone fueron adquiridas mediante eventos de transferencia horizontal a lo largo de la evolución del patógeno (Groisman 1996; Hensel 2004).

Se han identificado cinco islas de patogenicidad en el genoma de Salmonella denominadas desde SPI-1 hasta SPI-5, las cuales se detallan a continuación:

SPI-1: Esta isla es necesaria para que se produzca la infección intestinal, mediante la invasión de las células no-fagocíticas por Salmonella. Interviene también en la inflamación del epitelio intestinal y síntomas diarreicos (Marcus, Brumell et al. 2000; Wallis and Galyov 2000; Zhou and Galan 2001). SPI-1 posee al menos 29 genes que codifican para los componentes estructurales del sistema de secreción tipo III (SPI1-SST3), proteínas que forman un poro o translocón por el que penetran proteínas efectoras al citosol de la célula huésped, algunas proteínas efectoras y proteínas reguladoras.

SPI-2: Esta isla se relaciona con la capacidad de la bacteria de sobrevivir en el interior de los macrófagos y de multiplicarse dentro de SCVs en fagocitos y otras células eucariotas (Schmidt and Hensel 2004). La SPI-2 se compone de dos regiones distintas: una de ellas codifica para un sistema de secreción tipo III (SPI2-SST3) que se activa cuando la bacteria está en el interior del macrófago, translocando proteínas efectoras a través de la membrana de las SVC, y la otra región presenta un grupo de genes que están implicados en la respiración anaerobia (Marcus, Brumell et al. 2000). Las actividades fisiológicas del SPI2-SST3 son múltiples: interfiere con distintos aspectos del tráfico vesicular, impidiendo la fusión de SCV con endosomas tardíos y lisosomas, evita la muerte de la bacteria por especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno producidas por los fagocitos, controla la dinámica de las SCV, origina la formación de SIFs y retrasa la destrucción apoptótica de las células infectadas (Abrahams, Muller et al. 2006).

SPI-3: El principal contribuyente en la virulencia bacteriana de esta isla está codificado por el operón *mgtCB*. *MgtCB* constituye un sistema de transporte de Mg^{2+} de

alta afinidad, implicado en la adaptación a limitaciones nutricionales del hábitat intrafagosómico. La transcripción de este operón está regulada por el sistema de dos componentes *phoP/Q*, el cual está codificado en un islote cromosomal (Blanc-Potard and Groisman 1997).

SPI-4: Esta isla posee al menos 18 marcos de lectura abiertos y se propone que codifica para un sistema de secreción tipo 1 que media la secreción de toxinas, sin embargo su función específica aun no ha sido esclarecida (Wong, McClelland et al. 1998).

SPI-5: Esta isla codifica para las proteínas efectoras *SopB* y *PipA/B*, que son translocadas de manera selectiva por los dos sistemas de secreción tipo III implicados en la virulencia de *Salmonella*. Mutaciones en genes de la SPI-5 disminuyen la respuesta inflamatoria y secretoria intestinal de *S. dublín* en el ileon bovino, pero no afectan la infección de ratones (Wood, Jones et al. 1998).

Un análisis basado en la secuencia genómica completa de la cepa CT18 de *S. typhi*, identificó al menos otras cinco SPIs, designados desde SPI-6 hasta SPI-10 (Parkhill, Dougan et al. 2001). SPI-6 codifica para dos operones involucrados en la producción de fimbrias. SPI-7 codifica para genes biosintéticos y para un operón involucrado en la síntesis de fimbrias tipo IV. SPI-8 codifica para genes que confieren resistencia a bacteriocinas. SPI-9 codifica para un sistema de secreción tipo 1 y para una proteína semejante a RTX (repeats in toxin). Y por último, SPI-10 codifica para otro operón involucrado en la síntesis de fimbrias.

4.4. c. Islotes de patogenicidad y genes aislados

Una gran variedad de genes codifican para proteínas necesarias en diferentes fases del proceso de patogénesis y se encuentran formando parte de "islotes". Entre ellos se encuentran: *sifA* (el cual codifica para un efector del SST3 que induce la formación de SIFs, y por lo tanto necesario para la multiplicación en macrófagos), *pagC* y *msgA* (requeridos para la supervivencia en el interior de los fagosomas), *iviVI* (relacionado con la adhesión e invasión de los enterocitos) y algunos genes de fimbrias (Groisman 1998). Otros genes se encuentran de manera aislada, entre ellos los que codifican toxinas (*stn*, *ast*), sideróforos (*iroB*), resistencia al estrés oxidativo (*sodC1*) y reguladores transcripcionales de distintos genes de virulencia (*phoP/Q*, *slyA*).

4.4. d. Plásmidos de virulencia

Al menos seis serotipos de *Salmonella* (*abortusovis*, *choleraesuis*, *dublín*, *enteritidis*,

gallinarum/pullorum y typhimurium) poseen un plásmido de virulencia de bajo número de copias (1-2 copias por célula). Si bien los plásmidos varían en su tamaño en los distintos serotipos, todos conservan una región de 7.8 Kb, llamada el locus *spv* (Salmonella plasmid virulence). Este locus tiene cinco genes designados *spvRABCD* que poseen un papel en la multiplicación intracelular de Salmonella (Guiney, Fang et al. 1995; Rotger and Casadesus 1999). Además, los plásmidos pueden contener otros loci como los que intervienen en la biosíntesis de fimbrias (operon *pef*) o en la resistencia al suero (*rck* y *rsk*), cuyos productos desempeñan papeles importantes en diferentes etapas del proceso de infección. También se han identificado genes que codifican proteínas con acción reguladora, como *tlpA* cuyo producto actúa como termosensor, reprimiendo su propia expresión cuando se produce un incremento en la temperatura.

4.5 Modelos de experimentación animal

El modelo de experimentación animal más empleado para estudiar varios aspectos en la interacción patógeno-hospedador de *S. typhimurium* es el murino. Esta bacteria, la cual es un patógeno natural de los roedores, desarrolla en el ratón una enfermedad sistémica, sin diarrea, similar a la fiebre tifoidea causada por *S. typhi* y *S. paratyphi* en humanos. Cuando se infectan líneas de ratones susceptibles (como BALB/c) con *S. typhimurium*, se observa una distribución de la bacteria en los órganos similar a la de *S. typhi* en humanos. Los animales muestran signos de enfermedad, como fiebre, entre los 4-8 días post-infección, y en el intestino se produce un incremento en el tamaño de las placas de Peyer y una disminución de la mucosa ileal. En esta zona también se observa hiperplasia folicular del tejido linfoide, trombosis capilar, hemorragias y ulceración. En la última etapa, *S. typhimurium* desarrolla una enfermedad sistémica donde las bacterias se multiplican intracelularmente en los macrófagos del hígado y del bazo del ratón, produciendo hepatomegalia y esplenomegalia. La muerte de los ratones en general se produce por lesiones del tejido hepático producida por citocinas pro-inflamatorias (Santos, Zhang et al. 2001; Zhang, Kingsley et al. 2003).

Una limitación del modelo murino descrito anteriormente para el estudio de la fiebre tifoidea, es que *S. typhimurium* en humanos causa enteritis en vez de fiebre tifoidea. Además, algunos genes requeridos en *S. typhi* para causar fiebre tifoidea en humanos están ausentes en *S. typhimurium* y viceversa.

Por otro lado, en los países desarrollados donde ya se ha erradicado la fiebre tifoidea, es necesario disponer de modelos animales para estudiar la enterocolitis producida por las cepas de Salmonella, lo cual es una enfermedad transmitida por los alimentos muy frecuente. Debido a que para este tipo de estudios no es útil el modelo

murino, se utiliza al bovino como sistema. Tanto en terneros infectados de manera natural como experimental con *S. typhimurium* se produce una enfermedad entérica que produce manifestaciones clínicas y patológicas similares a las observadas en el humano. Después de 12-48 horas post-infección oral con la bacteria los terneros muestran manifestaciones clínicas que incluyen diarrea, anorexia, deshidratación y postración. En general la bacteria se autoelimina entre los 2-8 días y la mortalidad es muy baja, solo observándose a veces en terneros menores de 2 meses (Santos, Zhang et al. 2002).

En este capítulo se analizará la conservación de las características estructurales de la proteína YqiC de *S. typhimurium* con respecto a la de su homólogo livA de *B. abortus*.

Por otro lado, se empleará el modelo de experimentación murino para analizar la contribución en la relación patógeno-hospedador del gen *yqiC*, mediante la inactivación del mismo en la cepa de *S. typhimurium* patógena modelo ATCC14028. También se analizará la capacidad de infección y replicación de dicha cepa en células epiteliales y macrofágicas, así como su comportamiento ante distintas condiciones *in vitro* que mimetizan las condiciones adversas que la bacteria encuentra en el organismo hospedador durante la infección.

Materiales y métodos

4.1. Clonado del gen yqiC con fusión a histidina

El gen yqiC fue amplificado por PCR, utilizando como molde ADN genómico de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, con los oligonucleótidos diseñados a partir del genoma secuenciado de *Salmonella typhimurium* LT2 depositado en GenBank (NC 03197), cuya secuencia se detalla a continuación en sentido 5' a 3': ACCCATGGTTGACCCGAAAAAATT y TTCTCGAGCTCTTGTGTTGTGGATCGAC. Los amplicones fueron clonados en pGEM-T (Promega) y luego liberados con las enzimas NcoI y XhoI contenidas en la secuencia de los oligonucleótidos. Los fragmentos liberados fueron clonados en el vector de expresión para *E. coli* pET24D (Novagene) en marco con el promotor de T7 en el 5' y con una etiqueta de seis histidinas en el extremo 3'. Las construcciones fueron revisadas por secuenciación nucleotídica utilizando el servicio de secuenciación prestado por el INTA.

4.2. Expresión y purificación de la proteína YqiC recombinante

La construcción en el vector pET24D conteniendo la secuencia codificante para YqiC se introdujo en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) y se indujo la expresión proteica mediante el promotor de T7. La expresión, purificación y cuantificación de la proteína en condiciones nativas fueron realizadas de igual manera a las descritas para livA de *Brucella abortus* en el capítulo 1.

4.3. Caracterización estructural y análisis de la capacidad fusogénica de YqiC

Los experimentos de crosslinking químico, Light scattering estático, dicroísmo circular, medidas de turbidez y del mezclado del contenido acuoso de los liposomas, fueron realizados en las mismas condiciones a las previamente descritas para livA en el capítulo 1 y 2 para obtener resultados comparables en ambas proteínas.

4.4. Generación de suero policlonal dirigido contra YqiC

Para obtener suero policlonal dirigido contra YqiC se inmunizaron dos ratones intraperitonealmente con 10 µg de proteína purificada más adyuvante incompleto de Freund diluido al medio. La inmunización se realizó 3 veces por periodos de 1 semana y se extrajo regularmente sangre de la cola de los ratones para obtener suero y probar su

efectividad.

4.5. Cepas bacterianas y medios de cultivos

Salmonella typhimurium ATCC 14028 y sus derivadas *S. typhimurium yqiC::cm* y *S. typhimurium yqiC::cm* complementada, fueron cultivadas en medio líquido Luria-Bertani (LB) en agitación o LB agar (5 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, DIFCO) a 37°C o 28°C en el caso de *S. typhimurium yqiC::cm*. En los casos que corresponde, los antibióticos se suministraron en las siguientes concentraciones: Kanamicina (sigma) 25 µg/ml, Ampicilina (USB) 100 µg/ml y Cloranfenicol (sigma) 10 µg/ml.

4.6. Preparación de células competentes y transformación

Las cepas de *Salmonella* se hicieron electrocompetentes y se transformaron por electroporación como se describe a continuación. Se inocularon 100 ml de LB con 1 ml de un cultivo saturado de *Salmonella* y se incubó con agitación a 37°C o 28°C, según corresponde, hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm de 0.5. El recipiente conteniendo las bacterias se enfrió por 15 minutos en hielo y se centrifugó el cultivo a 4000 rpm a 4°C por 15 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 50 ml de agua apirogénica. Este paso de lavado se repitió 3 veces y luego se resuspendieron las bacterias en 300 µl de agua apirogénica. Esta suspensión fue fraccionada en alícuotas de 50 µl y fue utilizada inmediatamente o guardada hasta el momento de ser utilizada a -70°C.

Para la transformación, las bacterias competentes se descongelaron en un baño de hielo y se adicionó 0.5-1 µg de plásmido o 5 µg de ADN lineal en 50 µl de bacterias. Se incubó 5 minutos en hielo para permitir el establecimiento del contacto entre las bacterias y el ADN. Después se colocó la suspensión en cubetas de electroporación de 0.2 cm estériles previamente enfriadas. Se aplicó un pulso eléctrico fijando los parámetros del electroporador (Gene Pulse/Pulse controller, BioRad Ca, USA) en 25 µF, 2.5 kV (12.4 KV/cm) y 200Ω. Inmediatamente después del pulso eléctrico se agregó 1 ml de medio LB o SOC y las células fueron cultivadas con agitación constante de 200 rpm durante 1-2 horas. Posteriormente se sembraron las bacterias en placas de LB suplementadas con el antibiótico de selección para obtener colonias aisladas.

4.7. Construcción de una cepa de *Salmonella typhimurium* mutante en el gen *yqiC*

La cepa de *S. typhimurium* ATCC14028 mutante en *yqiC* se obtuvo mediante la

técnica de transducción utilizando el bacteriófago p22.

En primer lugar se construyó un segmento de ADN lineal que contiene un cassette de resistencia a cloranfenicol flanqueado por dos segmentos homólogos al gen *yqiC*. Este fragmento de ADN se construyó por PCR utilizando como molde un plásmido pKD3, el cual contiene el gen de resistencia a cloranfenicol, y dos oligonucleótidos que en su extremo 3' hibridan con el cassette CmR y en el extremo 5' presentan secuencias complementarias al gen *yqiC*. La secuencia de los oligonucleótidos se detalla a continuación en orientación 5' a 3' y se marca con azul las bases homólogas a *yqiC* y en negro las que hibridan con el cassette

CmR:

```
CGCACTACAATAAGAGCTAACACTTACCAGTTCAGGGAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCT
TCGTGGATCGACTGGCGGAATGGCGGGCGCAGGTTTTACTTCTCATATGAATATCCTC
CTTA
```

Posteriormente se transformó la cepa de *Salmonella* LB5010/pKD46 por electroporación con 5 µg del ADN lineal desalado. La cepa LB5010 tiene una alta eficiencia de transformación debido a que carece de los tres sistemas de restricción normalmente presentes en *Salmonella enterica* (Bullas L. R. 1983). El plásmido pKD46 es termosensible y presenta los genes *gam*, *bet* y *exo* del fago λ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa, cuyos productos génicos evitan la degradación del ADN lineal por la nucleasa RecBCD de la bacteria y facilitan la recombinación de éste en el cromosoma (Datsenko K A 2000).

La preparación de células LB5010/pKD46 competentes se llevó a cabo como se describió anteriormente, excepto que los cultivos fueron crecidos a 30°C y con 20 mM de arabinosa.

La presencia de la mutación deseada en los transformantes fue confirmada por PCR de colonia y finalmente la mutación obtenida fue transducida a la cepa de *S. typhimurium* salvaje ATCC14028 con el bacteriófago P22. La cepa de *S. typhimurium* ATCC14028 mutante en *yqiC*, fue llamada *S. typhimurium yqiC::cm*, y la mutación se confirmó por PCR y la ausencia de expresión de la proteína fue monitoreada por western blot utilizando un suero policlonal dirigido contra *YqiC*.

4.8. Complementación de *S. typhimurium yqiC::cm* con *yqiC* salvaje

La cepa de *S. typhimurium yqiC::cm* se complementó en trans con el gen *yqiC* salvaje clonado en el vector de amplio rango de huésped y de bajo número de copias pBBR1MSC que contiene resistencia a kanamicina y es replicativo en *Salmonella* spp.

Para ello se amplificó una zona de 1210 pb del ADN cromosomal de *S. typhimurium* ATCC14028 que contiene el gen *yqiC* con su promotor nativo. Los oligonucleótidos

utilizados para la amplificación son los siguientes, escritos en sentidos 5' a 3': GGCTTCAATGGTCACGGTAA y GCAATATGGACGAGGAGCATC. El producto de amplificación fue clonado en el plásmido pGEM-T easy, liberado posteriormente con la enzima EcoRI y clonado en el mismo sitio del plásmido pBBR1MSC.

La construcción obtenida fue transformada en células *S. typhimurium* yqiC::cm electrocompetentes. Las bacterias complementadas con el plásmido fueron seleccionadas en placas de LB suplementadas con los antibióticos cloranfenicol y kanamicina y la sobreexpresión de la proteína YqiC fue monitoreada por Western blot.

4.9. Ensayos de virulencia en ratones BALB/c

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, provistos por el bioterio del CICVyA del INTA-Castelar. Para la obtención del inóculo bacteriano, las cepas a ensayar se cultivaron en medio LB con agitación a 28°C o 37°C, según corresponde, hasta llegar a saturación. Luego los cultivos fueron centrifugados, lavados tres veces con buffer PBS y finalmente resuspendidos en 2 ml de PBS estéril. Se midió la densidad óptica de la solución y se calculó la dilución que se debe realizar para obtener la cantidad de bacterias requeridas por cada ensayo teniendo en cuenta que una OD a 600 nm de 0.8 corresponde a aproximadamente 1x10⁹ UFC/ml. Posteriormente la cantidad exacta de bacterias inoculadas fue calculada por plaqueo de diluciones.

Se utilizaron grupos de 5 a 7 ratones, los cuales fueron inoculados en forma intraperitoneal o intragástrica. Se registró la mortandad de los ratones durante 30 días e inmediatamente después de producida la muerte se les extrajo los bazos para realizar el conteo de las UFC. Los bazos fueron homogenizados utilizando poters en 5 ml de PBS 1X. La carga total de bacterias por bazo se determinó por diluciones seriadas de los homogenizados y plaqueo en LB suplementado con los antibióticos correspondientes.

4.10. Curvas de crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano se graficó en curvas de densidad óptica medidas a 600 nm en función del tiempo en horas. La DO se midió periódicamente cada 1-2 horas hasta llegar a fase estacionaria. Para las curvas de crecimiento en función de la temperatura, se realizó una dilución 1/100 en 50 ml de medio LB a partir de un cultivo bacteriano crecido a saturación. Posteriormente, el cultivo se incubó con agitación a 200 rpm en estufas a 28°C, 37°C o 42°C.

Para las curvas de crecimiento en medio mínimo, 1 ml de cultivos saturados en LB de las cepas de *Salmonella* a ensayar fueron centrifugados y lavados 3 veces con PBS para

eliminar los restos de medio rico, y utilizados para inocular 50 ml de medio mínimo para Salmonella (10 gr/l de sales para medio mínimo M9 suplementado con 0.4% p/v de glucosa como fuente de carbono y 0.0025 gr/l de casaaminoácidos. Posteriormente se incubó en agitación a 28°C.

Para realizar las curvas de crecimiento en pH ácido, se realizó una dilución 1/100 a partir de cultivos saturados de la cepas de Salmonella en 50 ml de medio LB llevado a pH 4 con ácido clorhídrico 1N, y se incubó con agitación a 28°C.

4.11. Infección y replicación intracelular

Células de la línea de macrófagos J774 o de la línea de células epiteliales HeLa se cultivaron en placas de 24 pocillos con medio DMEM + 5% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂, hasta alcanzar una confluencia de 80%, lo que equivale a aproximadamente 5x10⁵ células por pocillo. En este punto se lavaron las células tres veces con PBS estéril y se realizó la infección con las cepas de Salmonella estudiadas por triplicado con una multiplicidad de infección aproximadamente igual a 10. La preparación de las bacterias y la cuantificación de las mismas se realizaron como se describió previamente para la infección de ratones. Se permitió la fagocitosis de las bacterias durante 1 hora a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación el medio de cultivo se reemplazó por DMEM + 5% SFB con 50 µg/ml de gentamicina (GIBCO) para eliminar las bacterias extracelulares remanentes. Luego de 1 h el medio se reemplazó con DMEM + 5% SFB conteniendo 10 µg/ml de gentamicina y a partir de este punto se empezó a contabilizar el tiempo de infección. Transcurrido 1, 6 y 24 h post infección las monocapas se cosecharon y se lisaron con 0.1% de Triton X-100 diluido en buffer PBS. El número de bacterias sobrevivientes se determinó por diluciones seriadas y plaqueo en LB agar con o sin antibióticos, según corresponde. Las placas de *S. typhimurium* yqjC::cm se cultivaron a 28°C y el resto a 37°C.

Resultados

4.1. Análisis bioinformático

La proteína YqiC de *S. typhimurium* pertenece al grupo de proteínas ortólogas 2960 al que también pertenece livA de *Brucella abortus*. Al igual que todos los miembros del COG 2960, YqiC está anotada como una proteína de función desconocida. Ambas proteínas comparten entre sí 22% de residuos idénticos y 46.5% sumando los residuos idénticos y los similares en cuanto a carga y polaridad, como se puede observar en la figura 4.1A. YqiC posee 99 aminoácidos, un peso molecular de 11.5 KDa y un punto isoeléctrico ácido (PI=4.96). El punto isoeléctrico ácido es característico en la mayoría de los miembros del COG2960, mientras que el PI básico de la proteína livA de *Brucella* spp. parece ser una excepción.

Mediante diversos programas de predicción de estructura secundaria se infiere que la proteína está conformada de 66-77% de α -hélices, las cuales están distribuidas en dos regiones, una en la mitad N-terminal y la otra en la C-terminal. La α -hélice predicha en la región N-terminal de YqiC comprende desde los residuos 4 o 5 hasta 43 o 44, y en algunos programas esta hélice se predice como continua mientras que en otros se observa una interrupción entre los residuos 18 y 23 o 24, probablemente debido a la presencia de un residuo de prolina en esta región (Figura 4.1B). En una representación helical wheel de esta región (Figura 4.1C) se puede observar que la hélice posee una distribución de los residuos polares y no polares asimétrica, constituyendo una α -hélice anfipática, lo cual es una característica conservada con livA de *B. abortus* y muchas otras proteínas del COG2960, como las de *Escherichia coli*, *Shewanella oneidensis*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertusis*, *Sinorhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, etc.

Por otro lado la α -hélice que involucra los residuos 49 a 79 o 81 de la región C-terminal posee probabilidad de formar una estructura coiled-coil. Esta predicción es conservada prácticamente en todas las proteínas pertenecientes al COG2960. Utilizando el programa Multicoil que, además de calcular la probabilidad de cada aminoácido de formar parte de una estructura coiled-coil, estima el estado de oligomerización, se predice que la región C-terminal de YqiC tiene mayor probabilidad de formar un coiled-coil trimérico (0.27) que dimérico (0.19). Del mismo modo que en livA, se conserva el motivo de trimerización descrito para proteínas coiled-coil pequeñas (R-h-x-x-h-E), aunque solo se presenta una vez entre los residuos R72 a E77.

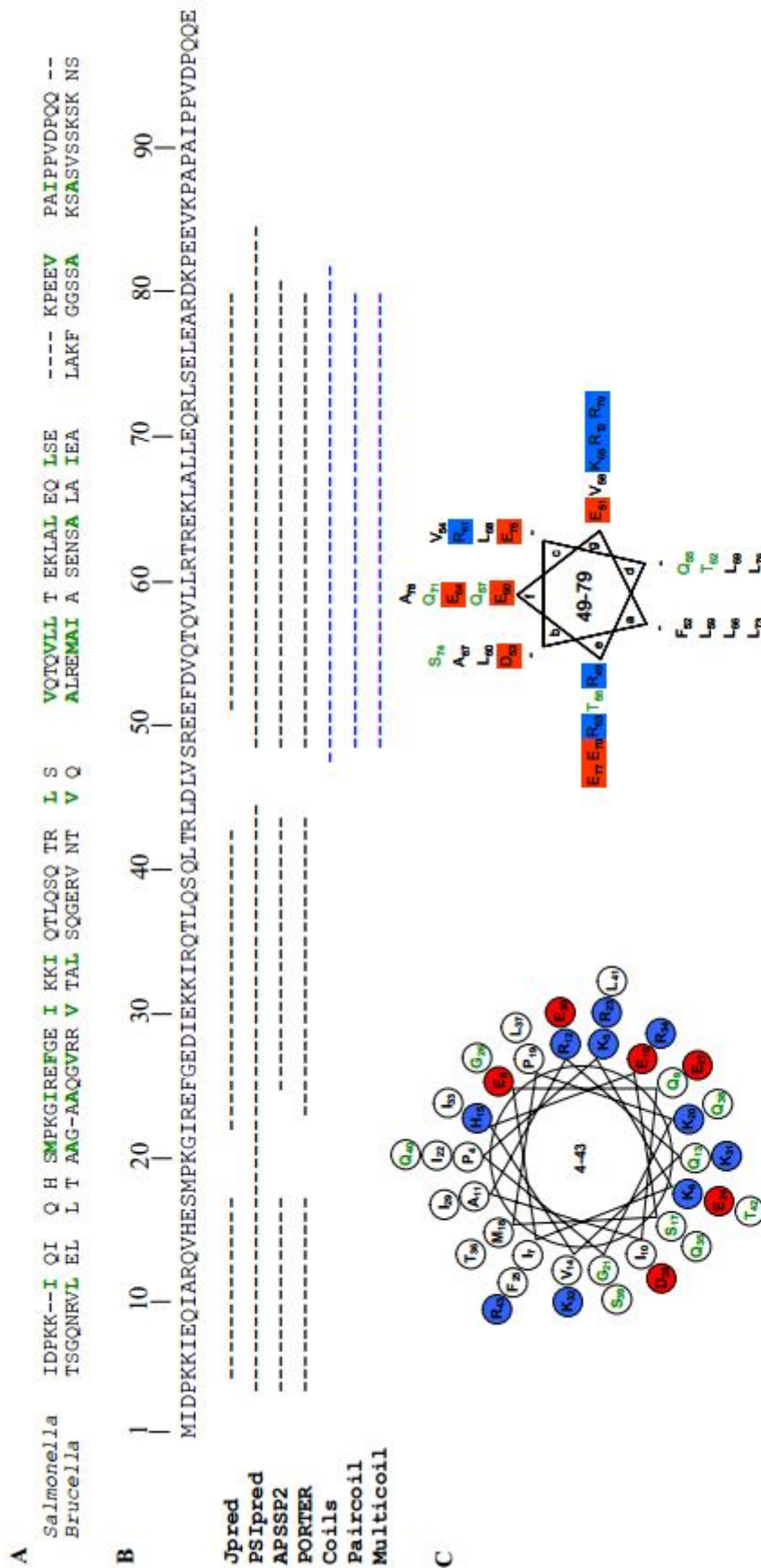


Figura 4.1. Análisis bioinformático de la proteína YqjC de *S. typhimurium*. (A) Comparación de la secuencia aminoacídica de YqjC de *S. typhimurium* y de liva de *B. abortus*. En fondo azul se muestran los residuos idénticos, en fondo rojo los residuos con cargas similares y en letras verde los residuos hidrofóbicos conservados entre ambas proteínas. (B) Análisis de la estructura secundaria. Debajo de la secuencia de YqjC, en líneas punteadas negras se presenta la ubicación de los residuos que se predicen como α -hélices y en líneas punteadas azules los residuos con probabilidad de formar α -hélices *coiled-coil*. A la izquierda se indican los programas que se utilizaron para hacer las predicciones. (C) Representación *helical wheel* de la región N-terminal predicha como α -hélice (representado con periodicidad 18/5) y de la región C-terminal predicha como α -hélice *coiled-coil* (representado con periodicidad 7/2). Se usaron las posiciones *a-g* del *coiled-coil* asignadas por el programa Paircoil.

4.2. Caracterización estructural

Con el objetivo de caracterizar estructuralmente a YqiC y de comparar los resultados obtenidos con los de livA de *B. abortus*, se clonó el ORF que codifica para YqiC a partir del DNA cromosomal de *S. typhimurium* cepa ATCC 14028 en un vector de expresión para *E. coli*. La proteína se expresó fusionada a una etiqueta de seis histidinas y se purificó en condiciones nativas, de manera similar a lo ya descrito para livA, para ser utilizada en ensayos posteriores.

En primer lugar, se analizó el estado de oligomerización de la proteína, utilizando las técnicas de cross-linking químico y de light scattering estático. En la figura 4.2A se presenta un SDS-PAGE que contiene la proteína YqiC incubada con distintas concentraciones del cross-linking etilen-glicol-bis (succidimil succinato) (EGS), en donde se pueden observar productos de pesos moleculares correspondientes a la formación de dímeros y trímeros. Por otro lado, en el cromatograma de YqiC, monitoreado por light scattering estático e índice de refracción, se observa un pico homogéneo que corresponde a una proteína de 40.2 KDa, lo que concuerda con la formación de trímeros (el PM del monómero de YqiC fusionado a histidina es 12.5 KDa) (Figura 4.2B).

En segundo lugar, se estudió el contenido de estructura secundaria de YqiC y los cambios conformacionales producidos ante el agregado de distintos aditivos, por espectroscopía de dicroísmo circular, utilizando las mismas condiciones que se describieron previamente para livA. El espectro de CD de YqiC es característico de proteínas donde predominan las estructuras α -hélices (Figura 4.3A). Mediante el análisis del espectro de CD con el programa K2D se calculó que el porcentaje de α -hélice de YqiC es 63% (Tabla 4.1). Este porcentaje es similar al estimado por los programas de predicción de estructura secundaria (66-77%). Por lo tanto, a diferencia de lo que ocurre en livA, la proteína YqiC presenta tanto la hélice C-terminal como la N-terminal estructuradas en buffer Tris/HCl pH 8.0.

Por otro lado, se realizó la medida de la estabilidad térmica de YqiC en buffer Tris/HCl pH 8.0, monitoreando la elipticidad molar de la proteína a 222 nm en función de la temperatura. Se obtuvo una temperatura de melting aparente de 68°C, la cual es ligeramente superior a la descrita para livA (Figura 4.3B).

Debido a que en livA se producen cambios en la conformación y estabilidad de la proteína en presencia de distintos aditivos, como fosfato de sodio, sulfato de sodio, cloruro de sodio, pH ácido, SDS y vesículas fosfolipídicas, se decidió analizar si estas mismas condiciones producen algún efecto sobre la estructura y estabilidad térmica de YqiC. Para ello se obtuvo espectro de dicroísmo circular y la curva de desnaturalización térmica de YqiC en cada condición. En la tabla 4.2 se muestra el incremento en la elipticidad molar a

222 nm de YqiC en cada condición con respecto a la señal a 222 nm previamente obtenida en buffer Tris/HCl pH 8.0 y la temperatura de melting aparente. Como se puede observar, ninguna de las condiciones ensayadas incrementó la elipticidad molar a 222 nm, excepto en el caso de presencia de fosfato de sodio y vesículas fosfolipídicas, donde se produce un ligero incremento de la señal. Estos resultados sugieren que la α -hélice anfipática predicha en el N-terminal se encuentra formada en la condición basal, por lo que no es inducida por cambios en el entorno como la α -hélice N-terminal de livA de *Brucella abortus*. Es interesante notar que, si bien no se producen cambios conformacionales significativos en el contenido de estructura secundaria de YqiC ante la presencia de los distintos aditivos, sí se produce un incremento en la estabilidad de la proteína en presencia de los iones fosfato, sulfato y cloruro. De igual manera que en livA, el ion fosfato es el que produce el mayor incremento en la estabilidad térmica, lo que sugiere que este ion o un sustrato que lo contiene en su estructura, cumple un rol importante en la función de estas proteínas.

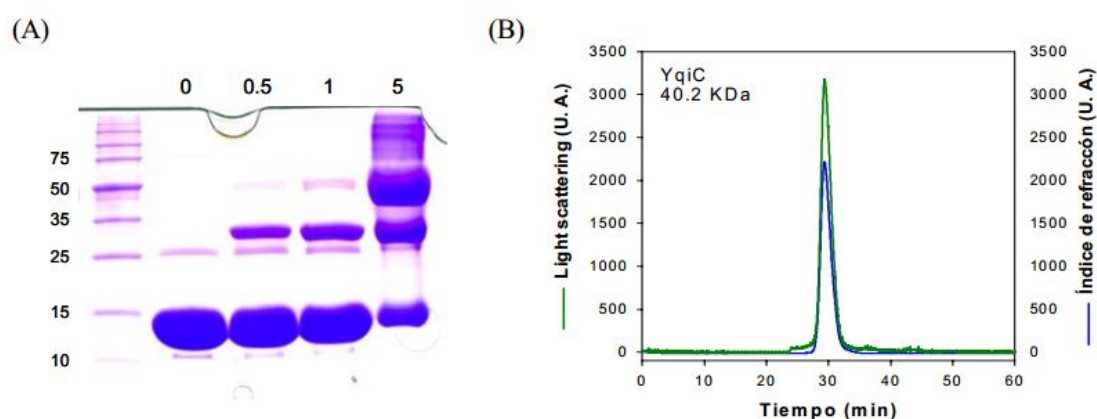


Figura 4.2. Análisis de la estructura cuaternaria de YqiC. (A) Cross-linking químico de YqiC. Los productos de cross-linking fueron separados en un SDS-PAGE y teñidos con Coomassie Brilliant Blue R250. Los pesos moleculares de los patrones se muestran al costado del gel. Los números sobre las calles indican la concentración del crosslinker EGS adicionada a cada reacción. (B) Cromatografía de filtración molecular en el que se mide la señal de índice de refracción o de light scattering estático (en unidades arbitrarias) de cada proteína en función del tiempo de elución. Se indica en el cromatograma la masa calculada para cada proteína.

(A)

(B)

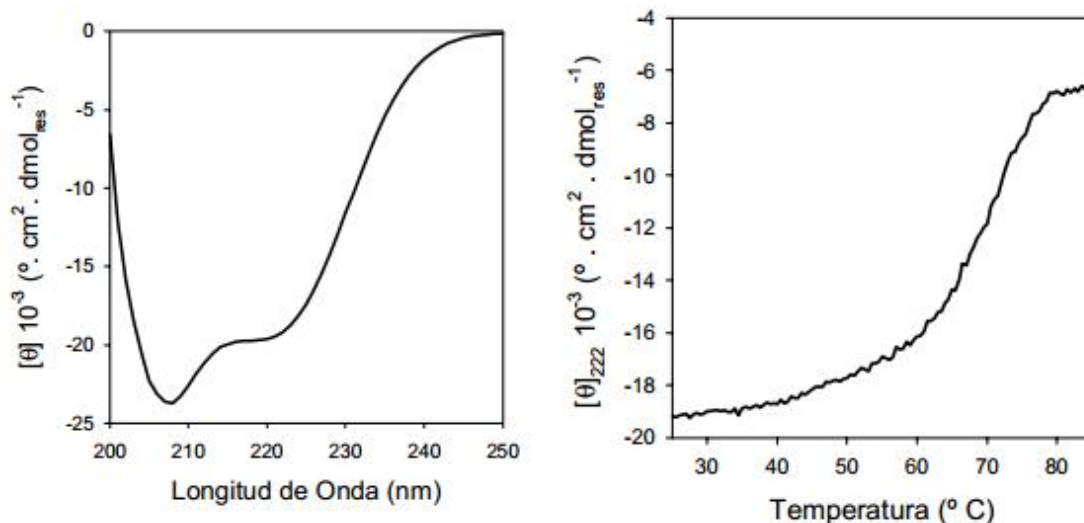


Figura 4.3. Estructura secundaria y estabilidad térmica de YqiC. (A) Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de YqiC en buffer Tris/HCl pH 8.0 a 20°C. (B) Curva de desnaturalización térmica en Tris/HCl pH 8.0 obtenida por la medida de la elipticidad molar a 222 nm en función de la temperatura. La temperatura de melting estimada fue 68°C.

Tabla 4.1. Porcentaje de estructura secundaria de YqiC calculado con el programa K2D a partir del espectro de CD en Tris/HCl pH 8.0.

	Porcentaje de cada estructura
α -hélice	63
Hoja β	6
<i>Random coil</i>	30

Tabla 4.2. Incremento de la señal de CD a 222 nm de YqiC en presencia de distintos aditivos con respecto a la señal de la proteína en Tris/HCl pH 8.0 y temperatura de melting en cada condición.

*nd indica que la Tm no pudo ser medida, debido a la producción de una curva de desnaturalización no cooperativa.

	Incremento de elipticidad molar a 222 nm (%)	Temperatura de melting (°C)
0.4 M fosfato de sodio, pH 8.0	9.9	87
0.4 M sulfato de sodio, pH 8.0	0	80
1.2 M cloruro de sodio, pH 8.0	0	75
50 mM acetato de sodio, pH 4.0	0	62
5 mM SDS, pH 8.0	0	nd*
250 µM SUV-PA:PC, pH 8.0	11.4	68

4.3. Estudio de la capacidad fusogénica de YqiC

Como se describió en el capítulo 2, la función bioquímica in vitro atribuida para la proteína livA de Brucella es la capacidad de fusionar liposomas, tanto a pH neutro como ácido. Dado que la proteína YqiC de Salmonella conserva las características estructurales básicas de livA, como trimerizar, poseer una α -hélice anfipática y una hélice coiled-coil, se decidió analizar si también conserva la capacidad de fusionar liposomas.

Para llevar a cabo tal objetivo se ensayó la capacidad de YqiC de fusionar vesículas unilamelares pequeñas compuestas de 25% de DPPA y 75% de DPPC, construidas a pH 8.0 o 4.0, midiendo el incremento de la turbidez de los liposomas y la inducción del mezclado del contenido acuoso ante el agregado de proteína.

Como se observa en la figura 4.4, YqiC es capaz de aumentar la turbidez e inducir el mezclado del contenido acuoso de los liposomas, aunque de una manera más dependiente del pH que livA. Si bien el pH óptimo para que livA fusione liposomas es 4.0, también produce fusión significativa a pH 8.0, mientras que en YqiC el aumento de la turbidez y el mezclado del contenido acuoso a pH 8.0 es mucho menos significativo que el de pH 4.0. Por otro lado, la capacidad fusogénica de la proteína de Brucella es mayor que el de la proteína de Salmonella, dado que el porcentaje máximo de mezclado del contenido acuoso de los liposomas a pH 4.0 ante el agregado de livA es aproximadamente 20% y el de YqiC es 12%.

A

B

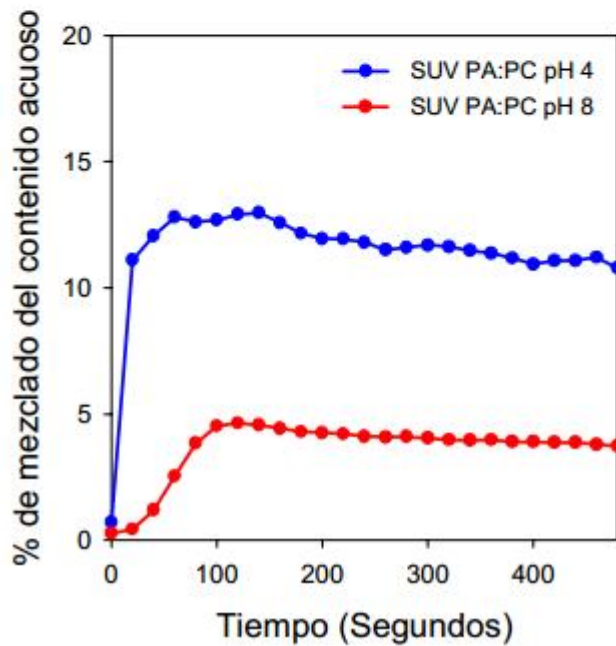
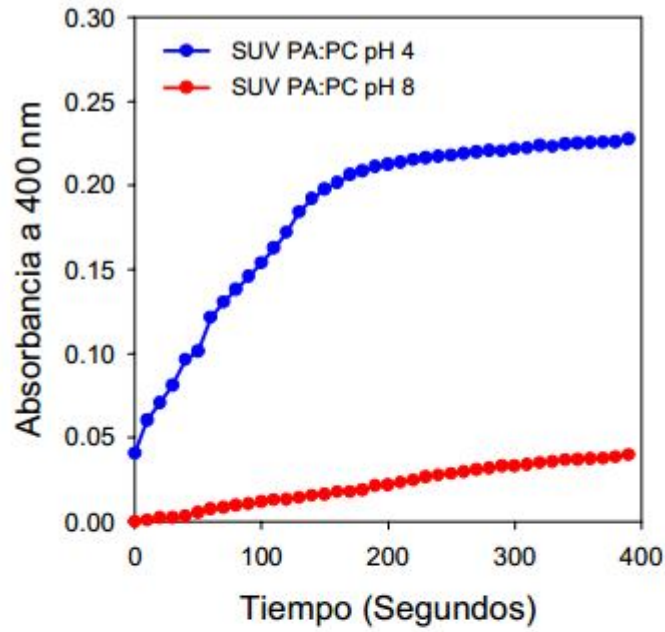


Figura 4.4. Medidas de la turbidez (A) y del mezclado del contenido acuoso (B) de liposomas en función del tiempo, después del agregado de YqiC. Se utilizaron vesículas unilamelares pequeñas compuestas de 75% de DPPC y 25% de DPPA formadas a pH 4.0 o 8.0. pH 8.0 corresponde a 50 mM de Tris/HCl pH 8.0 y pH 4.0 a 50 mM de acetato de sodio pH 4.0. La proporción lípido/proteína utilizada fue 100/1. Las medidas se tomaron por duplicado y los experimentos se realizaron dos veces en forma independiente.

4.4. Construcción y evaluación de la virulencia de una cepa de *Salmonella typhimurium* deficiente en YqiC

Como se describió en la introducción general, la mutación del gen *iivA* en *Brucella* spp. produce una severa atenuación de la virulencia de la bacteria en el sistema de experimentación murino. Debido a que *Salmonella typhimurium* es también una bacteria intracelular facultativa patógena, se decidió determinar si el gen *yqiC* homólogo a *iivA* también está involucrado en la virulencia bacteriana. Para llevar a cabo tal objetivo, se construyó la cepa *S. typhimurium yqiC::cm*, derivada de *S. typhimurium* ATCC14028. Esta cepa posee un cassette de resistencia a cloranfenicol insertado en el gen *yqiC*, para inactivar la síntesis de la proteína YqiC (Figura 4.5). En la figura 4.6 se muestra un western blot, revelado con un anticuerpo dirigido contra la proteína YqiC, de lisados proteicos pertenecientes a la cepa mutante *S. typhimurium yqiC::cm*, la cepa salvaje *S. typhimurium* ATCC 14028 y a una cepa de *S. typhimurium yqiC::cm* complementada en trans con *yqiC* salvaje. La cepa complementada se construyó por transformación de la cepa mutante con un plásmido de bajo número de copias replicativo en *Salmonella* spp. que posee al gen *yqiC* salvaje y regiones flanqueantes, de manera de asegurarse que la proteína se transcriba con su propio promotor. En el western blot se puede observar que la inserción del cassette de cloranfenicol en la cepa *S. typhimurium yqiC::cm* impide la síntesis de la proteína YqiC y que la cepa complementada en trans sobreexpresa la proteína con respecto al nivel basal de expresión de la cepa salvaje (Figura 4.6).

Con el fin de determinar la virulencia de las cepa *S. typhimurium yqiC::cm*, se infectaron ratones BALB/c con diferentes dosis de la cepa mutante y de la cepa salvaje *S. typhimurium* ATCC 14028 de forma intraperitoneal. Las cepas de *S. typhimurium* virulentas producen la muerte de los ratones infectados. Una manera de medir el grado de virulencia de una cepa de *S. typhimurium* es determinando la dosis letal 50 (DL50) de la misma, esto es, la cantidad de bacterias necesarias para producir la muerte de la mitad de los ratones inoculados. En la tabla 4.3 se muestra la cantidad y el tiempo de muerte de grupos de 6 o 7 ratones BALB/c inoculados con dosis crecientes (desde 10 hasta 1×10^5 UFC/ratón) de *S. typhimurium* ATCC 14028 o *S. typhimurium yqiC::cm*. Se observa que mientras que la DL50 de la cepa salvaje es menor a 10, la de la cepa mutante no se pudo determinar, dado que es superior a las dosis ensayadas (LD50 mayor a 1×10^5).

Posteriormente, se realizó otro experimento inoculando ratones BALB/c en forma intraperitoneal, con dosis de 5×10^5 UFC/ratón, en el que se incluyó además de la cepa salvaje y la mutante en *yqiC* a la cepa complementada en trans con *yqiC* salvaje. Como se observa en la tabla 4.4, la complementación en trans de la cepa *S. typhimurium yqiC::cm* con *yqiC* salvaje permite recuperar la virulencia de la misma a niveles similares a los de la

cepa salvaje.

S. typhimurium puede invadir y multiplicarse en distintos órganos del ratón; tales como: bazo, hígado y placas de peyer. Por lo tanto, después de producida la muerte de los ratones o luego de 20 días en el caso de los ratones infectados con la cepa mutante, se extrajo el bazo de los ratones, se los homogenizó y se plaquearon diluciones seriadas de los mismo de manera de poder determinar la cantidad de bacterias por bazo. Tanto en la cepa salvaje como en la complementada se recuperaron aproximadamente 1×10^9 UFC/bazo, mientras que en los bazo de los ratones infectados con la cepa mutante no se recuperaron bacterias o solo se extrajeron 1×10^1 o 1×10^2 UFC/bazo (Figura 4.7).

Por último, dado que la vía natural de infección de *Salmonella* es por medio de la ingestión de la misma, se ensayó la virulencia de las cepas en estudio en ratones BALB/c inoculados de forma intragástrica con 1×10^5 UFC/ratón de cada bacteria. En la figura 4.8A se observa que por esta vía de inoculación las cepas *S. typhimurium* ATCC 14028 y *S. typhimurium* *yqiC::cm* complementada en trans con *yqiC* salvaje, son capaces de producir la muerte de los ratones en un promedio de 12-14 días post inoculación. Por otro lado, la cepa *S. typhimurium* *yqiC::cm* no produce la muerte de ninguno de los ratones, aun 30 días después de la inoculación. Inmediatamente después de la muerte de cada ratón o a los 30 días post infección en el caso de los ratones inoculados con la cepa mutante, se extrajo el bazo de los mismos y se los procesó, de manera de poder obtener las unidades formadoras de colonia por bazo. Se observaron recuentos bacterianos similares a los de la experiencia en que los ratones fueron inoculados de forma intraperitoneal (Figura 4.8B).

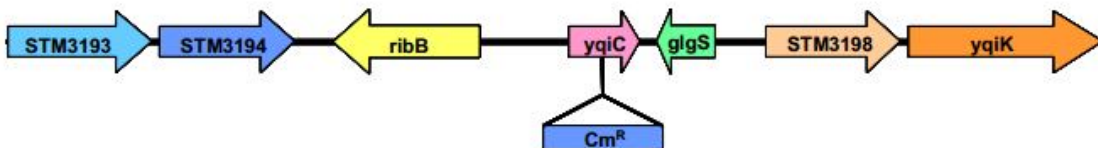


Figura 4.5. Distribución de los marcos abiertos de lectura de la zona de *Salmonella typhimurium* que contiene al gen *yqiC* y lugar de inserción del cassette de resistencia a cloranfenicol. Los ORF son indicados según el genoma secuenciado de *S. typhimurium* LT2 y se mantienen en escala los tamaños y distancias de los mismos. Los productos de cada ORF están descritos en el GenBank como: proteína involucrada en la formación de enlaces disulfuro putativa (STM3193), disulfuro oxidoreductasa putativa (STM3194), 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-fosfato sintasa (ribB), proteína hipotética (*yqiC*), proteína de síntesis de glicógeno (glgS), proteína de membrana interna putativa (STM3198) y proteína hipotética (*yqiK*).

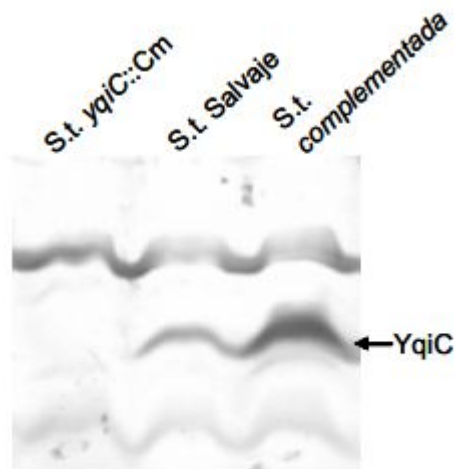


Figura 4.6. Expresión de la proteína YqiC en las cepas *S. typhimurium* yqiC::Cm, *S. typhimurium* ATCC 14028 y *S. typhimurium* yqiC::cm complementada in trans con yqiC salvaje. Se muestra un western blot de los extractos proteicos de cada cepa, en el que se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra YqiC.

Tabla 4.3. Muerte de ratones BALB/c inoculados con distintas dosis de *S. typhimurim* ATCC 14028 o *S. typhimurium* yqiC::cm. Se indica la dosis de bacteria utilizada para la inoculación intraperitoneal de grupos de 6 o 7 ratones y la cantidad de ratones de cada grupo que murieron. Entre paréntesis se indica el tiempo promedio en días que tardo en producirse la muerte.

Dosis (UFC/ratón)	Ratones muertos/ Número total de ratones (tiempo de muerte promedio en días)	
	<i>S. t.</i> ATCC14028	<i>S. t</i> yqiC::cm
1×10^1	3/7 (6)	0/7
1×10^2	7/7 (6.7)	0/7
1×10^3	6/6 (5.5)	0/6
1×10^4	6/6 (4.5)	0/6
1×10^5	6/6 (4)	0/6

Tabla 4.4. Cantidad de ratones muertos y tiempo promedio de muerte de grupos de 5 ratones inoculados intraperitonealmente con 5×10^5 UFC/ratón de las cepas de *S. typhimurium* salvaje, mutante en *yqiC* y complementada.

Ratones muertos/ Número total de ratones (tiempo de muerte promedio en días)	
S. t. ATCC 14028	5/5 (3)
S. t. <i>yqiC</i> ::cm	0/5
S. t. <i>yqiC</i> ::cm complementada	5/5 (3.5)

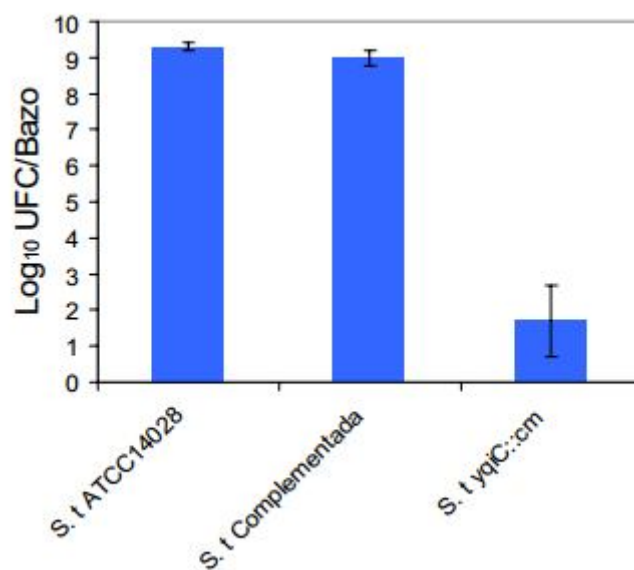


Figura 4.7. Logaritmo de las unidades formadoras de colonia por bazo promedio de los ratones inoculados intraperitonealmente con 5×10^5 UFC/ratón de cada cepa mostrada en la tabla anterior. Se indican las barras de error estándar.

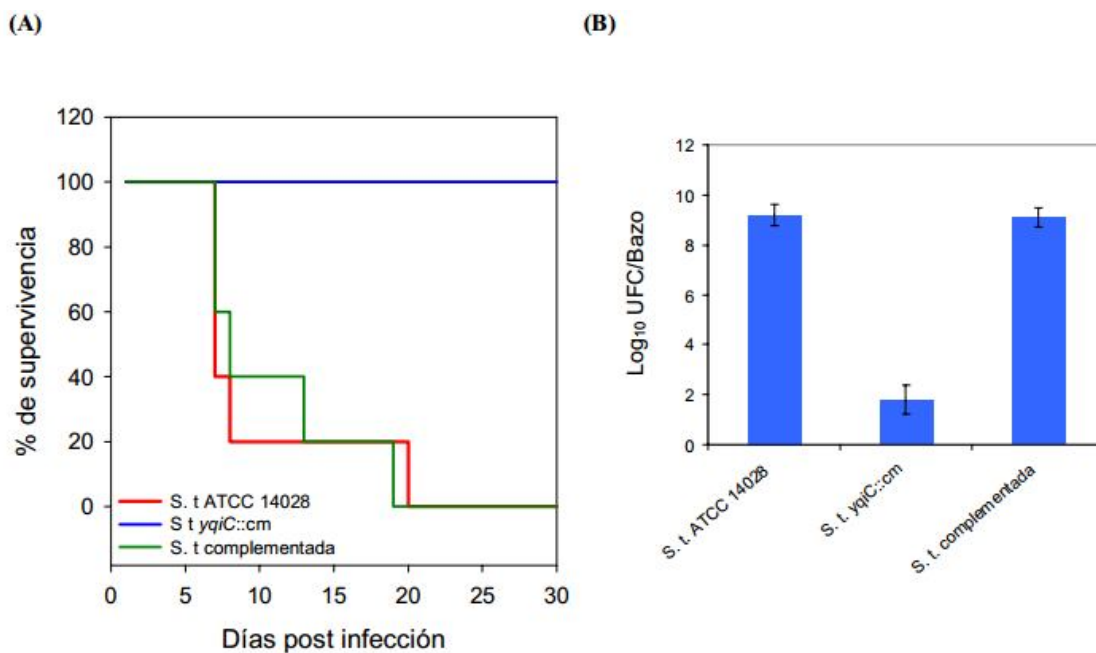


Figura 4.8. Virulencia de las cepas *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. typhimurium* yqiC::cm y *S. typhimurium* yqiC::cm complementada en trans con yqiC salvaje, inoculadas en forma intragastrica. Se utilizaron grupos de 5 ratones que fueron inoculados con 1×10^5 UFC de cada cepa en forma intragastrica. (A) Seguimiento de la muerte de los ratones en el tiempo expresado como el porcentaje de supervivencia, o sea, el porcentaje de ratones que permanece vivo con respecto al total. (B) Promedio del logaritmo de las unidades formadoras de colonia de los bazo extraídos de los ratones inmediatamente después de su muerte +/- el error estándar.

4.5. Estudio del comportamiento in vitro de la cepa de *S. typhimurium* mutante en yqiC

Al ingresar al organismo y aun una vez que se encuentra en el medio intracelular, *Salmonella* debe atravesar diversas condiciones adversas para eludir los sistemas de defensa del hospedador. Para sobrellevar estas condiciones adversas la bacteria expresa diversos factores de virulencia y es difícil establecer el motivo por el cual una cepa atenuada se comporta como tal. Con el objetivo de discernir los mecanismos por los cuales la cepa *S. typhimurium* yqiC::cm se comporta como avirulenta, se analizó el comportamiento de la misma, en comparación con la cepa salvaje y la complementada, en distintas condiciones de crecimiento in vitro que mimetizan a las encontradas en el organismo hospedador, como temperaturas elevadas, medio carente de nutrientes y pH ácido.

Se ha descrito que algunas cepas de *Salmonella* atenuadas son sensibles a temperaturas elevadas, por lo que se decidió analizar la sensibilidad a la temperatura de la

cepa de *Salmonella* deficiente en *yqiC* (Giacomodonato, Sarnacki et al. 2004; Mo, Peters et al. 2006; Liu, Karavolos et al. 2007; Lewis, Skovierova et al. 2008). Con tal fin, se realizaron curvas de crecimiento de *S. typhimurium yqiC::cm*, *S. typhimurium* ATCC 14028 y *S. typhimurium yqiC::cm* complementada, en medio líquido LB a distintas temperaturas. En la figura 4.9 se observan las curvas de crecimiento de las tres cepas ensayadas, monitoreadas por medio de la toma de la densidad óptica a períodos regulares de tiempo, crecidas con agitación a 28 °C, 37 °C o 42°C. Las curvas de crecimiento a 28°C son similares en las tres cepas, mientras que a 37°C la cepa mutante en *yqiC* disminuye su velocidad de crecimiento y llega a niveles de saturación menores a los de la cepa parental y la complementada y a 42°C prácticamente se anula su crecimiento. Estos resultados demuestran que la anulación del gen *yqiC* afecta la resistencia a temperatura elevadas de *Salmonella typhimurium* y esta sensibilidad térmica es restaurada por la complementación en trans con *yqiC* salvaje.

Otra condición que deben sobrellevar las bacterias intracelulares es la carencia de nutrientes en su nicho replicativo, por lo que muchas veces la atenuación de algunas cepas se puede explicar por la mutación en genes que codifican para enzimas metabólicas y de síntesis de compuestos esenciales, como por ejemplo las cepas deficientes en la síntesis de compuestos aromáticos (cepas Aro-) (Smith, Reina-Guerra et al. 1984). Para testear esta posibilidad se realizaron curvas de crecimiento de las bacterias en un medio mínimo para *Salmonella* con glucosa como fuente de carbono a 28°C. En la figura 4.10A se muestra la curva de crecimiento en dicha condición, observándose que la mutación de *yqiC* no afecta el crecimiento en medio mínimo de la bacteria.

Por último, se analizó el crecimiento de las cepas de *Salmonella* a pH ácido. Las bacterias deben sobrellevar el pH ácido al pasar por el aparato gástrico del hospedador y cuando se encuentran en el interior del macrófago. Debido a que *Salmonella* es capaz de crecer a pH ácido, se realizaron curvas de crecimiento a 28°C con agitación en medio LB líquido cuyo pH fue disminuido a 4 mediante el agregado de ácido clorhídrico. Las tres cepas de *Salmonella* son capaces de crecer a pH 4 y de llegar a iguales niveles de saturación, si bien la cepa deficiente en *yqiC* disminuyó ligeramente su velocidad de crecimiento (Figura 4.10B).

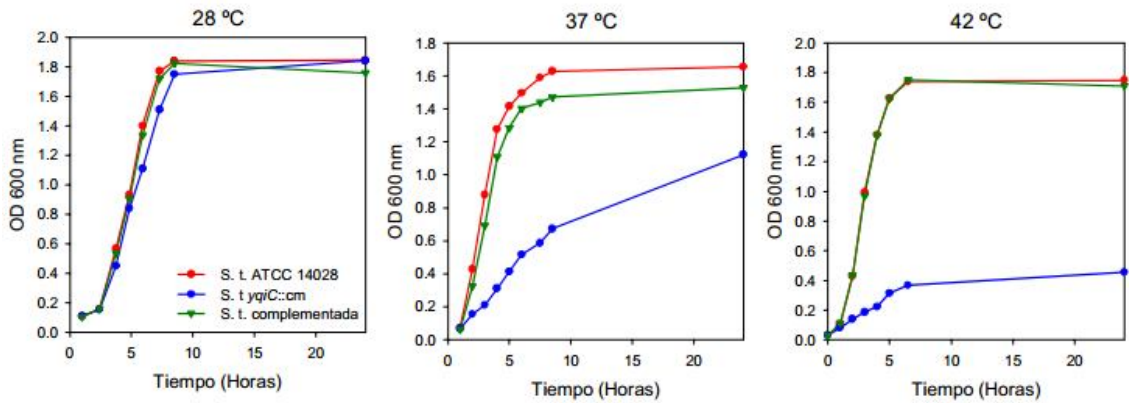


Figura 4.9. Sensibilidad a la temperatura. *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. typhimurium yqiC::cm* y *S. typhimurium yqiC::cm* complementada, fueron crecidas en medio LB con agitación en estufas a 28°C, 37°C o 42°C. El crecimiento fue monitoreado por medidas periódicas de la densidad óptica a 600 nm. Se muestra el resultado de 1 de 3 curvas realizadas que arrojaron resultados similares.

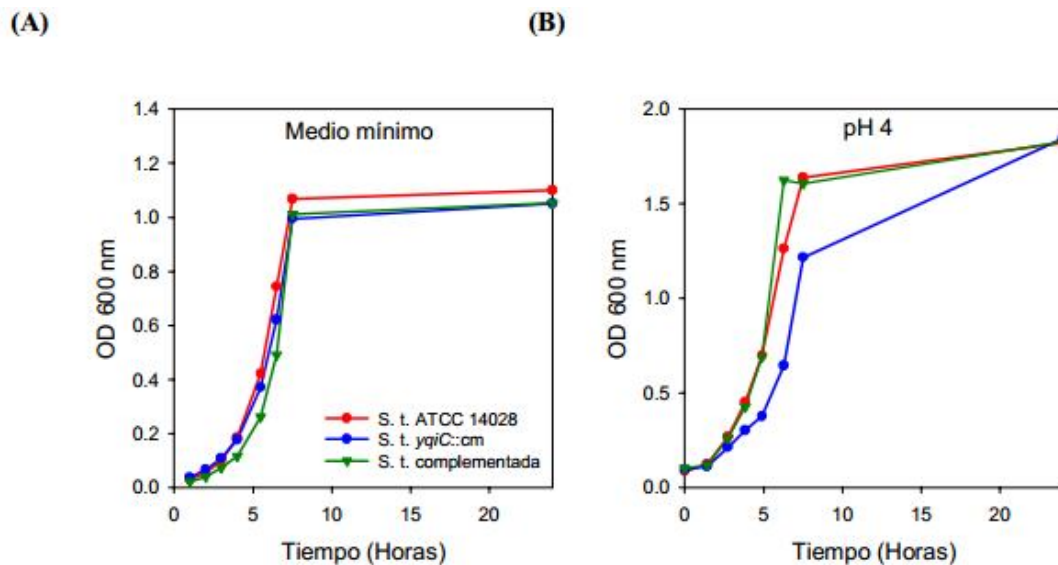


Figura 4.10. Curvas de crecimiento en medio mínimo (A) y en LB a pH 4 (B) de *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. typhimurium yqiC::cm* y *S. typhimurium yqiC::cm* complementada. Los cultivos fueron crecidos con agitación constante a 28°C. El crecimiento bacteriano fue monitoreado por medidas periódicas de la densidad óptica a 600 nm. Se muestra el resultado de 1 de 3 curvas realizadas que arrojaron resultados similares.

4.6. Estudio de la replicación intracelular de *S. typhimurium yqiC::cm*

Salmonella es una bacteria intracelular facultativa, capaz de invadir y replicarse en células epiteliales, células M, células dendríticas y macrófagos. Debido a que la correcta invasión y multiplicación dentro de la célula eucariota hospedadora es esencial para que la bacteria ejerza su patogenia, se analizó la infección y supervivencia de *S. tiphimurium* yqjC::cm en comparación con la cepa salvaje y la complementada en células epiteliales y macrofágicas.

Para evaluar la infección en macrófagos se utilizó la línea celular de macrófagos murinos J774 y como modelo de células epiteliales se utilizó la línea de células epiteliales humanas HeLa. Se utilizaron placas de 24 pocillos conteniendo células J774 o HeLa a 80% de confluencia, las cuales se infectaron por triplicado con las cepas de Salmonella a estudiar utilizando una multiplicidad de infección (moi) de 10. Posteriormente, se lisaron las células a los tiempos correspondientes a 1, 6 y 24 horas post infección para realizar el recuento de las unidades formadoras de colonias por mililitro. En ambos tipos celulares no se observan diferencias significativas, ya sea en la capacidad de infección o en la supervivencia, de la cepa mutante con respecto a la cepa salvaje o a la complementada (figura 4.11).

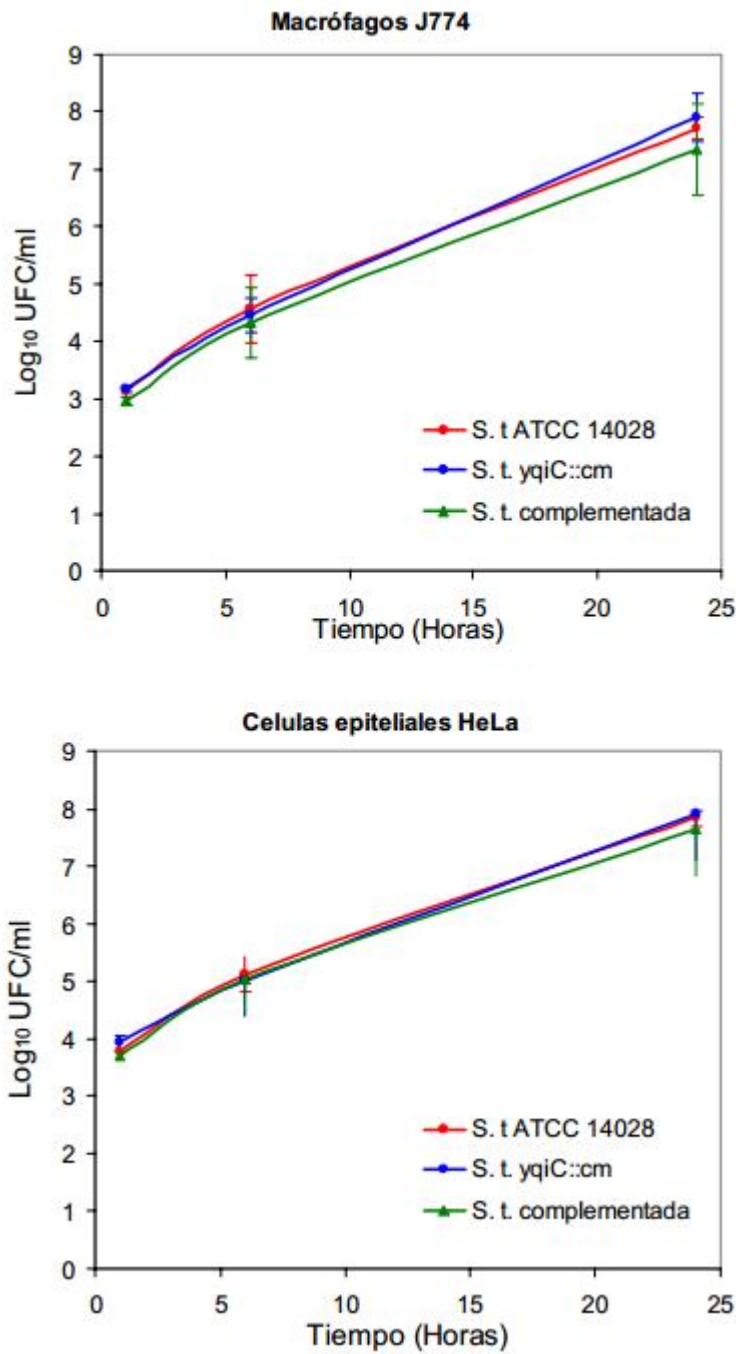


Figura 4.11. Replicación intracelular de *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. typhimurium* yqiC::cm y *S. typhimurium* yqiC::cm complementada, en la línea celular de macrófagos murino J774 y de células epiteliales humanas HeLa. El recuento de las UFC se realizó a 1, 6 y 24 horas post infección. Se utilizó una *moi* de 10. Se presenta el promedio del logaritmo de las UFC/ml obtenidas por triplicado +/- los errores estándares. Se muestra el resultado de uno de tres experimentos individuales, los cuales arrojaron resultados similares.

Discusión

En la primera parte de este capítulo se realizó la caracterización estructural y bioquímica de la proteína YqiC de *Salmonella typhimurium*. A pesar de que YqiC solo conserva 22% de identidad con su proteína homóloga en *B. abortus*, livA, las características estructurales son similares en ambas proteínas. Al igual que livA, YqiC es una proteína trimérica, en la que se predice la formación de una α -hélice coiled-coil en la región C-terminal y de una α -hélice anfipática en la región N-terminal. El porcentaje de α -hélice estimado por dicroísmo circular indica que la α -hélice N-terminal de YqiC ya se encuentra formada en la condición basal, a diferencia de su homólogo en *Brucella* donde la región N-terminal se encuentra no estructurada a pH neutro y la formación de la α -hélice anfipática es inducida por la presencia de vesículas fosfolipídicas, SDS, pH ácido y distintos iones.

El análisis de la secuencia de YqiC con el programa Paircoil, predice que el C-terminal es la región de la proteína que esta involucrada en la trimerización. Al igual que en livA, esta zona conserva el motivo de trimerización típico de proteínas coiled-coil pequeñas, aunque lo presenta una sola vez en lugar de dos veces como en su homólogo (Kammerer, Kostrewa et al. 2005). Teniendo en cuenta estos datos se construyó un modelo para la estructura coiled-coil trimérica que produciría la interacción de la α -hélice C-terminal consigo misma, el cual se muestra en la figura 4.12. Como se puede observar en el modelo propuesto, el trímero estaría estabilizado por tres interacciones electroestáticas que involucran a los residuos R49, E70 y E77 de la posición e del coiled-coil y E51, R72 y R79 de la posición g. Por otro lado, se evidencia en el modelo la presencia de dos residuos polares en la posición d del core hidrofóbico del coiled-coil. La presencia de residuos polares en las posiciones a y d del core hidrofóbico de las hélices coiled-coil es observada frecuentemente con una prevalencia de aproximadamente 20% (Yu 2002). Es particularmente llamativa la presencia de glutamina en la posición d (Q55), dado que al igual que la asparagina de la posición a del coiled-coil C-terminal de livA, este residuo es capaz de formar puentes de hidrógenos entre hélices enfrentadas. Mientras que los residuos de asparagina son mas frecuentemente encontrados en el interior de coiled-coils diméricos, el residuo de glutamina es aproximadamente tres veces mas frecuente en coiled-coils triméricos (Woolfson and Alber 1995; Wolf, Kim et al. 1997). Se ha descrito que los residuos polares contenidos en el interior del core hidrofóbico de los coiled-coils a menudo contribuyen a la especificidad del plegamiento de las proteínas, tanto determinando el estado de oligomerización como la orientación de la hélice, a expensas de disminuir la estabilidad de la misma (Harbury, Zhang et al. 1993; Lumb and Kim 1995; Eckert, Malashkevich et al. 1998). Por otro lado, se ha descrito que proteínas coiled-coil

triméricas con residuos polares en el interior pueden coordinar un ion cloruro en el mismo, por ejemplo: el coiled-coil trimérico de la proteína de membrana del virus de la leucemia murina, posee en su interior residuos de asparagina que pueden interactuar con un ion cloruro (Fass, Harrison et al. 1996). De manera similar, la proteína heterotrimérica ABC y una mutante trimérica de GCN4 (GCN4-pIQI) poseen en su interior residuos de glutamina que pueden interactuar con un ion cloruro (Nautiyal, Woolfson et al. 1995; Eckert, Malashkevich et al. 1998).

Si bien YqiC no presenta cambios conformacionales ante la presencia de iones fosfato, sulfato y cloruro, si presenta una marcada estabilización ante la desnaturalización térmica en presencia de los mismos, siendo fosfato el ion que produce mayor efecto. El ion fosfato también produce una marcada estabilización de livA de *Brucella*, por lo que es interesante analizar si la presencia de asparagina y glutamina en el interior de estas proteínas podría estar involucrada en una interacción con los iones mencionados, produciendo la estabilización de las mismas. Como se puede observar en la figura 3.2 del capítulo 3 el residuo de glutamina, que en YqiC se halla en la posición 55, es altamente conservado en los miembros del COG 2960 lo que denota la importancia del mismo.

La función bioquímica atribuida para livA *in vitro* es la de fusionar membranas fosfolipídicas, del mismo modo YqiC es capaz de fusionar membranas provista por liposomas, aunque de una manera más dependiente del pH que en la proteína de *Brucella*. Al igual que las bacterias del género *Brucella*, *Salmonella* spp. son patógenos intracelulares facultativos, capaces de replicarse en el interior de células epiteliales y macrofágicas, dirigiendo el tráfico intravesicular de manera de evitar la fusión de las vacuolas que contienen *Salmonella* con el lisosoma.

El segundo objetivo planteado en este capítulo fue la construcción de una cepa de *S. typhimurium* mutante en el gen *yqiC*, con el fin de evaluar su virulencia en el modelo murino y su fenotipo *in vitro*.

Los resultados presentados demuestran que la mutación del gen *yqiC* en *S. typhimurium* afecta drásticamente la virulencia de la misma, de igual manera a lo observado para el gen *livA* de *Brucella abortus*.

Al igual que en *B. abortus*, la mutación de *yqiC* no afecta la replicación de la bacteria en líneas celulares epiteliales y macrofágicas. De todos modos, se debe tener en cuenta que al trabajar con líneas celulares no se puede reproducir el ambiente intracelular encontrado en el hospedador, dado que estas células son inmortalizadas y además se encuentran aisladas de los componentes del sistema inmune que actúan en conjunto para destruir los microorganismos invasores.

Para que *Salmonella* pueda establecer su nicho replicativo intracelular y replicarse activamente, antes debe sobrellevar las condiciones de estrés que el organismo

hospedador utiliza como defensa antimicrobial: pHs bajos, especies reactivas de oxígeno, medios carentes de nutrientes, temperaturas elevadas, etc. Por lo tanto, a menudo la mutación de genes involucrados en la respuesta a condiciones de estrés suelen producir cepas atenuadas en su virulencia.

La característica del crecimiento in vitro más remarcable de la mutante en *yqiC* de *S. typhimurium* es la sensibilidad a temperaturas elevadas. La temperatura es uno de los estreses ambientales con los que los organismos se encuentran primero, por lo que deben ser capaces de adaptarse y responder rápidamente a él (Ono, Goldberg et al. 2005). Existen muchas mutaciones en genes puntuales de *S. typhimurium* que producen cepas sensibles a la temperatura y a su vez también son atenuadas en su virulencia. Ejemplos de esto son: las cepas mutantes en *smpA*, el cual codifica para una lipoproteína de membrana externa pequeña, *uspA*, que codifica para una proteína de respuesta a estrés universal, *degP* y *degQ*, que codifican para unas proteasas homólogas a *HtrA*, y *dam*, que codifica para la enzima ADN adenina metilasa (Giacomodonato, Sarnacki et al. 2004; Mo, Peters et al. 2006; Liu, Karavolos et al. 2007; Lewis, Skovierova et al. 2008). Este fenotipo de sensibilidad a temperaturas elevadas de la cepa de *S. typhimurium* mutante en *yqiC*, fue observado también en una cepa de *B. melitensis* mutante en *iivA*, aunque el efecto en esta última fue mucho menos marcado.

En conjunto, los resultados mostrados en este capítulo demuestran que las características principales de la proteína *YqiC* y de la cepa de *S. typhimurium* mutante en el gen *yqiC* son conservadas con las descritas para *Brucella*, aun tratándose de dos grupos bacterianos que no están cercanamente relacionadas filogenéticamente y que causan enfermedades muy diferentes. Este hallazgo sugiere que las características descritas para *livA* e *YqiC*, pueden ser relevantes para todos los miembros del COG 2960. A pesar de que son necesarias futuras investigaciones para determinar la función biológica específica de las proteínas del COG 2960, este trabajo atribuye los primeros indicios de la función de este grupo de proteínas ortólogas no caracterizadas hasta el momento.

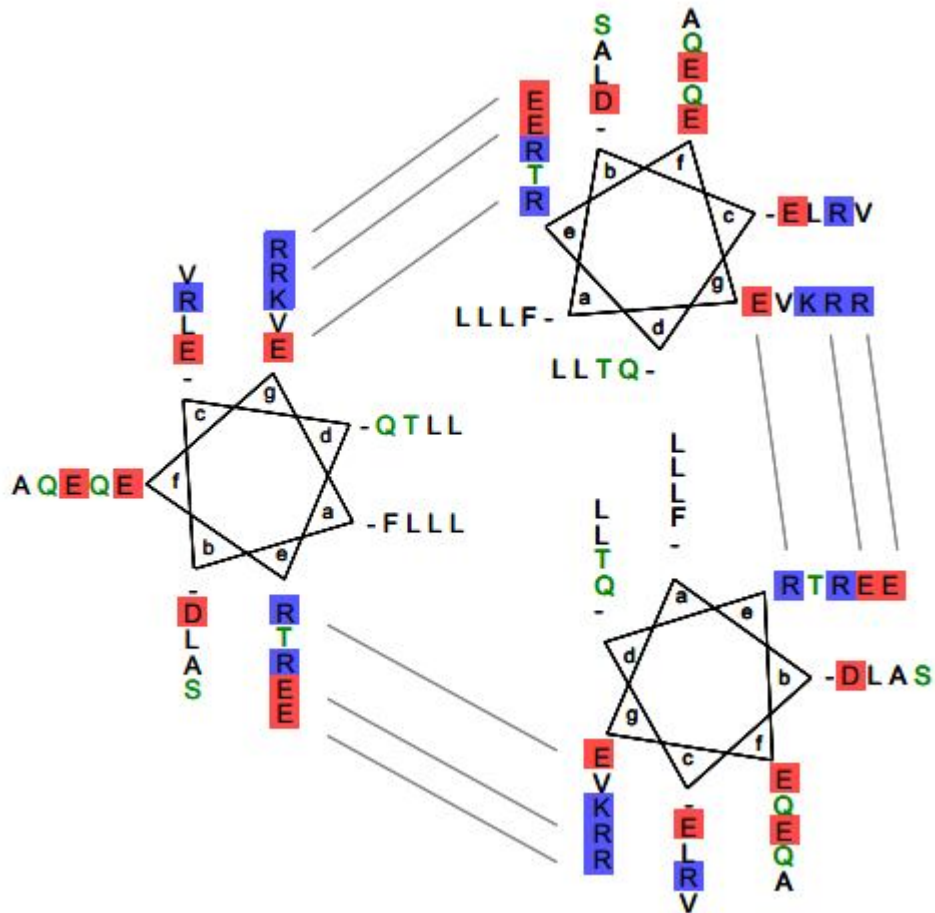


Figura 4.12. Modelo propuesto para la región C-terminal *coiled-coil* trimérica de YqiC. Se muestran los residuos hidrofóbicos en letras negras, los polares sin carga en letras verdes, los cargados positivamente en fondo azul y los cargados negativamente en fondo rojo. Con líneas grises se muestran los pares de residuos de las posiciones g y e que pueden establecer interacciones electrostáticas.

Bibliografía

- Abrahams, G. L., P. Muller, et al. (2006). "Functional dissection of SseF, a type III effector protein involved in positioning the salmonella-containing vacuole." *Traffic* **7**(8): 950-65.
- Blanc-Potard, A. B. and E. A. Groisman (1997). "The Salmonella selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival." *Embo J* **16**(17): 5376-85.
- Bowe, F., C. J. Lipps, et al. (1998). "At least four percent of the Salmonella typhimurium genome is required for fatal infection of mice." *Infect Immun* **66**(7): 3372-7.
- Coburn, B., G. A. Grassl, et al. (2007). "Salmonella, the host and disease: a brief review." *Immunol Cell Biol* **85**(2): 112-8.
- Eckert, D. M., V. N. Malashkevich, et al. (1998). "Crystal structure of GCN4-pIQI, a trimeric coiled coil with buried polar residues." *J Mol Biol* **284**(4): 859-65.
- Fan, F. and R. M. Macnab (1996). "Enzymatic characterization of Flil. An ATPase involved in flagellar assembly in Salmonella typhimurium." *J Biol Chem* **271**(50): 31981-8.
- Fass, D., S. C. Harrison, et al. (1996). "Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution." *Nat Struct Biol* **3**(5): 465-9.
- Fierer, J. and D. G. Guiney (2001). "Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection." *J Clin Invest* **107**(7): 775-80.
- Finlay, B. B. and J. H. Brumell (2000). "Salmonella interactions with host cells: in vitro to in vivo." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**(1397): 623-31.
- Garrity, G. M., Bell J. A. and Lilburn T. G. (2004). Taxonomic outline of Prokariotes *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag, New York.
- Giacomodonato, M. N., S. H. Sarnacki, et al. (2004). "Host response to a dam mutant of Salmonella enterica serovar enteritidis with a temperature-sensitive phenotype." *Infect Immun* **72**(9): 5498-501.
- Groisman, E. A. (1996). "Bacterial responses to host-defense peptides." *Trends Microbiol* **4**(4): 127-8; discussion 128-9.
- Groisman, E. A. (1998). "The ins and outs of virulence gene expression: Mg²⁺ as a regulatory signal." *Bioessays* **20**(1): 96-101.
- Guiney, D. G., F. C. Fang, et al. (1995). "Biology and clinical significance of virulence plasmids in Salmonella serovars." *Clin Infect Dis* **21** Suppl 2: S146-51.
- Harbury, P. B., T. Zhang, et al. (1993). "A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants." *Science* **262**(5138): 1401-7.
- Hensel, M. (2004). "Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica." *Int J Med Microbiol* **294**(2-3): 95-102.

- Humphries, A. D., M. Raffatellu, et al. (2003). "The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons." *Mol Microbiol* **48**(5): 1357-76.
- Joiner, K. A., N. Grossman, et al. (1986). "C3 binds preferentially to long-chain lipopolysaccharide during alternative pathway activation by *Salmonella montevideo*." *J Immunol* **136**(2): 710-5.
- Kammerer, R. A., D. Kostrewa, et al. (2005). "A conserved trimerization motif controls the topology of short coiled coils." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39): 13891-6.
- Kaniuk, N. A., M. A. Monteiro, et al. (2002). "Molecular diversity of the genetic loci responsible for lipopolysaccharide core oligosaccharide assembly within the genus *Salmonella*." *Mol Microbiol* **46**(5): 1305-18.
- Lewis, C., H. Skovierova, et al. (2008). "Small outer-membrane lipoprotein, SmpA, is regulated by σ^E and has a role in cell envelope integrity and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Microbiology* **154**(Pt 3): 979-88.
- Liu, W. T., M. H. Karavolos, et al. (2007). "Role of the universal stress protein UspA of *Salmonella* in growth arrest, stress and virulence." *Microb Pathog* **42**(1): 2-10.
- Lumb, K. J. and P. S. Kim (1995). "A buried polar interaction imparts structural uniqueness in a designed heterodimeric coiled coil." *Biochemistry* **34**(27): 8642-8.
- Marcus, S. L., J. H. Brumell, et al. (2000). "Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages." *Microbes Infect* **2**(2): 145-56.
- Mo, E., S. E. Peters, et al. (2006). "Single, double and triple mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium degP (htrA), degQ (hhoA) and degS (hhoB) have diverse phenotypes on exposure to elevated temperature and their growth in vivo is attenuated to different extents." *Microb Pathog* **41**(4-5): 174-82.
- Nautiyal, S., D. N. Woolfson, et al. (1995). "A designed heterotrimeric coiled coil." *Biochemistry* **34**(37): 11645-51.
- Ochman, H. and E. A. Groisman (1994). "The origin and evolution of species differences in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." *Exs* **69**: 479-93.
- Okamura, N. and J. K. Spitznagel (1982). "Outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 have lipopolysaccharide-dependent resistance to the bactericidal activity of anaerobic human neutrophils." *Infect Immun* **36**(3): 1086-95.
- Ono, S., M. D. Goldberg, et al. (2005). "H-NS is a part of a thermally controlled mechanism for bacterial gene regulation." *Biochem J* **391**(Pt 2): 203-13.
- Parkhill, J., G. Dougan, et al. (2001). "Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18." *Nature* **413**(6858): 848-52.
- Raffatellu, M., D. Chessa, et al. (2006). "Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis." *Infect Immun* **74**(1):

19-27.

- Reeves, M. W., G. M. Evins, et al. (1989). "Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov." *J Clin Microbiol* **27**(2): 313-20.
- Romling, U., W. D. Sierralta, et al. (1998). "Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter." *Mol Microbiol* **28**(2): 249-64.
- Rotger, R. and J. Casadesus (1999). "The virulence plasmids of *Salmonella*." *Int Microbiol* **2**(3):177-84.
- Santos, R. L., S. Zhang, et al. (2002). "Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves." *Vet Pathol* **39**(2): 200-15.
- Santos, R. L., S. Zhang, et al. (2001). "Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever." *Microbes Infect* **3**(14-15): 1335-44.
- Schmidt, H. and M. Hensel (2004). "Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis." *Clin Microbiol Rev* **17**(1): 14-56.
- Smith, B. P., M. Reina-Guerra, et al. (1984). "Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* as modified live vaccines for calves." *Am J Vet Res* **45**(1): 59-66.
- Steele-Mortimer, O., S. Meresse, et al. (1999). "Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway." *Cell Microbiol* **1**(1): 33-49.
- van Asten, A. J. and J. E. van Dijk (2005). "Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp." *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**(3): 251-9.
- Wallis, T. S. and E. E. Galyov (2000). "Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis." *Mol Microbiol* **36**(5): 997-1005.
- Weening, E. H., J. D. Barker, et al. (2005). "The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice." *Infect Immun* **73**(6): 3358-66.
- Wolf, E., P. S. Kim, et al. (1997). "MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils." *Protein Sci* **6**(6): 1179-89.
- Wong, K. K., M. McClelland, et al. (1998). "Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2." *Infect Immun* **66**(7): 3365-71.
- Wood, M. W., M. A. Jones, et al. (1998). "Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella enteropathogenicity*." *Mol Microbiol* **29**(3): 883-91.
- Wolfson, D. N. and T. Alber (1995). "Predicting oligomerization states of coiled coils."

Protein Sci **4**(8): 1596-607.

Yu, Y. B. (2002). "Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential." *Adv DrugDeliv Rev* **54**(8): 1113-29.

Zhang, S., R. A. Kingsley, et al. (2003). "Molecular pathogenesis of Salmonella enterica serotype typhimurium-induced diarrhea." *Infect Immun* **71**(1): 1-12.

Zhou, D. and J. Galan (2001). "Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins." *Microbes Infect* **3**(14-15): 1293-8.

Conclusión

livA de *Brucella abortus* es una proteína trimérica que posee dos dominios estructurales: Un dominio C-terminal α -hélice coiled-coil, por el cual la proteína trimeriza y un dominio N-terminal intrínsecamente desestructurado.

El dominio N-terminal sufre un rearrreglo conformacional, en el cual se convierte en una α -hélice que se predice como anfipática, cuando se encuentra en presencia de pH ácido; iones fosfato, sulfato y cloruro; detergente SDS y vesículas fosfolipídicas.

livA es estabilizada por la presencia de fosfato y en menor medida sulfato, lo cual se da principalmente en el dominio C-terminal de la proteína.

livA es capaz de interactuar con vesículas fosfolipídicas por medio de su dominio N-terminal. La interacción es más eficiente con vesículas que presentan en su composición fosfolípidos con carga negativa, aunque en menor medida livA también es capaz de interactuar con vesículas neutras.

livA es capaz de fusionar vesículas fosfolipídicas, tanto a pH neutro como ácido, siendo su actividad óptima a pH ácido. Para que se produzca la fusión de vesículas eficientemente es necesaria la proteína completa, dado que sus dominios por separado no presentan actividad fusogénica o la misma es muy inferior a la producida por livA.

Si bien como se ha observado en trabajos previos a este, la mutación de los residuos QREDF, ubicados en la zona central de livA, afectan la capacidad de la proteína de complementar el fenotipo atenuado de una cepa de *B. abortus* 2308 deficiente en el gen livA (*B. abortus* livA::Km), la ausencia de estos aminoácidos no afecta la estructura de la proteína ni la capacidad de fusionar membranas de la misma. Por otro lado, la mutación individual de cada uno de los aminoácidos de dicha zona por alanina, no afecta la capacidad de la proteína de complementar el fenotipo avirulento de *B. abortus* livA::Km.

La proteína YqiC de *Salmonella typhimurium*, homóloga a livA de *B. abortus*, conserva las características estructurales principales de livA, como formar trimeros, poseer un dominio C-terminal coiled-coil y un dominio N-terminal predicho como α -hélice anfipática. A diferencia de livA el dominio N-terminal de YqiC no sufre cambios conformacionales en presencia de vesículas fosfolipídicas, SDS, iones o cambios de pH, debido a que la α -hélice de esta zona ya se encuentra formada en la condición basal a pH

neutro.

YqiC es estabilizada por la presencia de iones fosfato y en menor medida también por la presencia de iones sulfato y cloruro.

Al igual que su homólogo en *B. abortus*, YqiC es capaz de fusionar vesículas lipídicas, aunque de una manera más dependiente del pH, siendo su actividad óptima a pH ácido.

Del mismo modo a lo descrito previamente para *Brucella* spp., la mutación del gen *yqiC* afecta drásticamente la virulencia de *S. typhimurium* en el modelo de infección murino, tanto cuando se utiliza la vía de inoculación intraperitoneal como la intragástrica. El aporte en trans de *yqiC* salvaje complementa el fenotipo avirulento de la cepa mutante.

La cepa de *S. typhimurium* deficiente en *yqiC* no se vio afectada en su infección y replicación intracelular y en su crecimiento en medios de cultivo mínimos o ricos. Si se observó una leve disminución de la velocidad de crecimiento a pH ácido y un marcado incremento de la sensibilidad a temperaturas elevadas, lo cual fue restaurado con el aporte en trans de *yqiC* salvaje.