UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA

PROYECTO DE TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA

"DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE VIRULENCIA DE *Brucella abortus*"

ELABORADO POR:

MURIEL GRIJALBA MURILLO

EVAN BJORCK JENSEN GAMBOA

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

SAN PEDRO DE MONTES DE OCA

JULIO 2003

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORIA DE DOCENCIA

FACULTAD DE MICROBIOLOGIA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el primero de julio del 2003, con el objeto de recibir el informe oral de los estudiantes ***MURIEL GRIJALBA MURILLO*** *carné* ***981663*** *y* ***EVAN JENSEN GAMBOA*** *carné* ***971749*** *quienes se acogen al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de* ***PRACTICA DE GRADUACION,*** *para optar al grado de* ***LICENCIADO EN MICROBIOLOGIA Y QUIMICA CLINICA.***

Están presentes los siguientes miembros del Tribunal:

Dr. Norman Rojas Campos ***Presidente***
Dr. Esteban Chaves Olarte
Dr. Bruno Lomonte Vigliotti
Dr. Edgardo Moreno Robles
Dr. Fernando García Santamaría

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de ***MURIEL GRIJALBA MURILLO*** *y* ***EVAN JENSEN GAMBOA,*** *contienen todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que los Postulantes cumplieron con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes y, por lo tanto, se solicita que procedan a hacer la exposición.*

ARTICULO 2

Los Postulantes ***MURIEL GRIJALBA MURILLO*** *y* ***EVAN JENSEN GAMBOA*** *hacen la exposición oral de su trabajo de graduación titulado* ***"Desarrollo de herramientas para el estudio de los mecanismos de virulencia de Brucella Abortus"***

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a los Postulantes durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4

El Tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 9.5

ARTICULO 5

El Presidente del Tribunal comunica a los Postulantes el resultado de la deliberación y los declara acreedores al grado de ***Licenciado en Microbiología y Química Clínica*** *y grado profesional de* ***Doctor en Microbiología y Química Clínica.***

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación, al que serán oportunamente convocados. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y los Postulantes, a las 11:30 *horas.*

Dr. Norman Rojas Campos
Presidente

Dr. Esteban Chaves Olarte

Dr. Bruno Lomonte Vigliotti

Dr. Edgardo Moreno Robles

Dr. Fernando García Santamaría

Muriel Grijalva Murillo
Postulante

Evan Jensen
Evan Jensen Gamboa
Postulante

c: Decano
Oficina de Registro
Postulante

AGRADECIMIENTOS

Dr. Esteban Chaves Olarte

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad Nacional

Dr. Bruno Lomonte Vigliotti

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica

Dr. Edgardo Moreno Robles

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad Nacional

Lic. Carlos Santamaría Quesada

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

Lic. Marysia Grijalba Murillo

ÍNDICE

Página

ACTA DE APROBACIÓN.....*ii*

AGRADECIMIENTOS.....*iv*

ÍNDICE GENERAL.....*v*

ÍNDICE DE FIGURAS.....*vi*

RESUMEN.....*vii*

INTRODUCCIÓN

Brucelosis.....10

Internalización y tráfico intracelular..... 11

Sistema regulador de dos componentes de *B. abortus*..... 12

JUSTIFICACIÓN..... 14

OBJETIVO GENERAL.....15

OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 15

MATERIALES Y MÉTODOS.....16

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....20

CONCLUSIONES Y PESRPECTIVAS FUTURAS 24

REFERENCIAS.....25

ANEXO.....29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo representativo del sistema regulador de dos componentes BvrS-BvrR de *Brucella abortus*. En respuesta a un estímulo ambiental el dominio sensor periplasmático BvrS trasloca la señal a un dominio histidina kinasa que promueve su propia fosforilación, ésto cataliza la fosforilación de la proteína reguladora BvrR. La proteína BvrR fosforilada activa la transcripción del omp3a y probablemente omp3b y otros genes no identificados todavía. A partir de ésto la estructura del lípido A, la expresión de la Omp3a y Omp3b así como la presencia de otras proteínas en la membrana externa de *Brucella* están directa o indirectamente reguladas (13).

Figura 2. Dominios hidrofílicos e hidrofóbicos del sensor BvrS. Se muestran los dominios transmembrana (Tm) y los dominios periplasmáticos. El asterisco representa la región del dominio periplásmico que tiene la mayor divergencia entre BvrS y otras proteínas sensoras. (13).

Figura 3. Alineación de las secuencias del sensor BvrS de *Brucella abortus* y del sensor ExoS de *Sinorhizobium meliloti*. Los residuos de aminoácidos idénticos se indican con dos puntos, los cambios conservativos se indican como un punto. La secuencia de BvrS sintetizada y utilizada para producir los anticuerpos anti-BvrS se encuentra enmarcada (6).

Figura 4. Análisis por cromatografía líquida de alto desempeño en fase reversa (RP-HPLC), en una columna C8 (semipreparativa, 250 x 10 mm), de la preparación del péptido sintético del sensor BvrS. El gradiente de concentración de acetonitrilo en la fase móvil se indica

como una línea de color rojo. El pico con un tiempo de retención de 24.652 minutos y área de 77.6646% corresponde al péptido sintetizado.

Figura 5. Análisis por cromatografía líquida de alto desempeño en fase reversa (RP-HPLC), en una columna C8 (semipreparativa, 250 x 10 mm), de la preparación del péptido sintético de la proteína de membrana externa Omp3B. El gradiente de concentración de acetonitrilo en la fase móvil se indica como una línea de color rojo. El pico con un tiempo de retención de 38.490 minutos y área de 49.0126% corresponde al péptido sintetizado.

Figura 6. Curva de calibración para la determinación de la concentración del péptido sintético BvrS por el método de Bradford a 280nm.

Figura 7. Purificación de anticuerpos anti-BvrS mediante cromatografía de afinidad.

Figura 8. Análisis por Western Blot de muestras de *Brucella abortus* usando anti-BvrS. Se analizaron los lisados celulares de las cepas de *B. abortus* 2308 fenotipo silvestre, PerA rugosa, mutante 2.13 bvrS y 2.13 reconstituida con ExoS de *Sinorhizobium meliloti*. Se detectaron bandas proteicas de peso molecular esperado para el sensor BvrS en las primeras dos cepas. No se demostró reconocimiento del sensor ExoS por reacción cruzada.

RESUMEN

Grijalba Murillo, Muriel; Jensen Gamboa, Evan Bjorck

Desarrollo de herramientas para el estudio de los mecanismos de virulencia *Brucella abortus*.

Tesis Lic. Microbiología y Química Clínica. San José, C.R.

M. Grijalba M., E.B. , Jensen G., 2003.

37h.8il.-20refs.

Se pretende estudiar la expresión de las proteínas del sistema de dos componentes BvrR-BvrS y de proteínas bajo el control del mismo utilizando anticuerpos específicos.

Se sintetizaron dos péptidos el primero correspondiente a una secuencia del sensor BvrS que presentaba alta antigenicidad y homología con otras proteínas sensoras y el segundo correspondiente a una secuencia de la proteína de membrana externa Omp3b, mediante técnica manual en fase sólida utilizando la estrategia F-moc, éstos fueron analizados mediante HPLC. Se inmunizó un conejo con el péptido BvrS para obtener un suero policlonal y posteriormente se purificaron los anticuerpos mediante cromatografía de afinidad. Finalmente se realizó Western blot de lisados celulares de *B. abortus* utilizando los anticuerpos anti-BvrS.

El análisis del Western blot indicó que los anticuerpos policlonales anti- BvrS detectaron bandas proteicas cercanas a los 60KDa en los lisados celulares de *B. abortus* cepa silvestre 2308 y cepa rugosa PerA. El peso molecular esperado para el sensor BvrS es de aproximadamente 66KD, por lo que es probable que los anti - BvrS producidos estén reconociendo al sensor. Los anticuerpos no detectaron ninguna banda proteica en la cepa mutante 2.13 que carece de bvrs y que se incluyó como control negativo, lo mismo sucedió con el lisado celular de la cepa 2.13 que fue reconstituida con el sensor ExoS de *S .melitoti* donde los anticuerpos anti-BvrS no fueron capaces de reconocer ninguna proteína. Se esperaba un reconocimiento por reacción cruzada de los anticuerpos anti-BvrS contra el sensor ExoS expresado en la cepa 2.13 reconstituida dado el alto grado de homología, sin embargo pareciera que el cambio de tres residuos de aminoácidos en la secuencia fue suficiente para variar las propiedades antigénicas del péptido del sensor BvrS con respecto a las propiedades del sensor ExoS. Con esta herramienta se podría estudiar la expresión de este sensor en cepas silvestres virulentas bajo condiciones controladas de infección y tratar de comprender los procesos de adhesión,

internalización y replicación intracelular de la bacteria, así como desarrollar ensayos *in vivo* de reconocimiento del sensor BvrS que conduzca al desarrollo de estrategias como vacunas o fármacos que contribuyan al manejo de la brucelosis.

SISTEMA DE DOS COMPONENTES; PÉPTIDO SINTÉTICO; *B. abortus;* ANTICUERPOS.

Esteban Chaves Olarte. PhD.

Facultad de Microbiología.

INTRODUCCIÓN

Brucelosis

El género *Brucella* incluye bacterias gram negativas e intracelularmente facultativas (19). Estas bacterias son no móviles, no formadoras de esporas y no poseen cápsula. Bioquímicamente se caracterizan por oxidar la glucosa, reducir los nitratos a nitritos y ser oxidasa y catalasa positivas (15).

El género *Brucella* se incluye en la subdivisión α-2 de las Proteobacterias y consta oficialmente de seis diferentes especies: las cepas lisas *B. abortus, B. melitensis, B. neotoame* y *B. suis*, las cepas rugosas *B. canis, B. ovis,* que afectan bovinos, cabras, ratas, cerdos, perros, y ovinos respectivamente (13). Recientemente se han propuesto dos nuevas especies lisas *B. pinnipediae* y *B. cetaceae*, parásitos de focas y cetáceos respectivamente. Las cepas lisas poseen en la superficie un polisacárido con cadena O y un polisacárido hapteno nativo (NH) relacionado. Con excepción de *B. neotomae* y las brucelas parásitos de mamíferos marinos, las cepas lisas son los patógenos causantes de la brucelosis en seres humanos, una zoonosis y enfermedad ocupacional. En hospedadores animales como ganado bovino, caprino y ovino, *Brucella* puede inducir aborto en las hembras preñadas, para ello realiza una bacteremia y posteriormente coloniza la placenta y otros tejidos fetales. En los machos puede ocasionar esterilidad. La leche y otras secreciones de los animales infectados contienen a estos microorganismos y por lo tanto son fuente de contaminación, es por ello que el ser humano puede infectarse generalmente al ingerir productos lácteos o por el contacto directo con las secreciones de estos animales infectados a través de membranas mucosas y conjuntiva. Luego de un período de incubación de 1-3 semanas,

Brucella se disemina vía hematógena, ahí persiste en compartimientos intracelulares dentro de los monocitos que se encargan de transportarla hacia nódulos linfáticos desde donde diseminan a otros órganos como hígado y bazo (17).

Brucella se caracteriza por no poseer los factores de virulencia clásicos como exotoxinas, enzimas citolíticas, fimbrias, flagelos, plásmidos, fagos lisogénicos, variación antigénica, sistemas de secreción III, cápsulas o paredes celulares gruesas (7). Su capacidad de invadir células parece ser su principal factor de patogenicidad. Se han descrito algunos posibles factores de virulencia de la bacteria, como la composición particular de la membrana externa, el lipopolisacárido, los glucanos cíclicos, el sistema de dos componentes BvrR/BvrS y el sistema de secreción tipo IV VirB (3, 7).

Internalización y tráfico intracelular de *B. abortus*

Los factores bacterianos y los receptores celulares implicados en la adhesión y la entrada de *B. abortus* en la célula hospedera no están totalmente definidos. La internalización de *B. abortus* debe involucrar receptores ampliamente distribuidos, debido a su habilidad de invadir una gran variedad de células provenientes de diferentes especies de vertebrados, principalmente mamíferos. *B. abortus* es capaz de penetrar células blanco mediante la inducción de un rearreglo local de la membrana plasmática y existen evidencias que sugieren la necesidad de microtúbulos y de filamentos de actina para este fin (18).

Se ha demostrado además que la internalización es dependiente de las pequeñas GTPasas Rho, Rac y Cdc42, ésta última incluso activada por la propia *Brucella* (3).

En trabajos realizados con fagocitos no profesionales se ha observado que en las células infectadas la multiplicación de *Brucella* ocurre en un compartimento limitado por

membrana compatible con el retículo endoplasmático (13,18). *Brucella* sigue una ruta retrógrada que la lleva hasta el retículo endoplásmico, siendo éste el compartimiento intracelular dentro del cual ocurre la replicación bacteriana (18).

Inicialmente *Brucella* interactúa con compartimientos de la cascada endocítica temprana, se separa rápidamente de esta vía de tráfico intracelular y se asocia con la cascada autofagocítica, alcanzando vacuolas similares a autofagosomas y posteriormente alcanza el retículo endoplasmático. Así como muchos otros parásitos intracelulares han desarrrollado formas diversas para evitar el proceso de fagocitosis, se ha demostrado que *Brucella* posee mecanismos de modulación de la composición fagosomal y de evasión de la degradación por medio de la disociación de la cascada endocítica/fagocítica evitando la fusión con lisosomas (18).

Sistema regulador de dos componentes de *B. abortus*

Las células bacterianas contienen numerosos sistemas de transducción de señal que han evolucionado para permitir el acople estímulo-respuesta (1,5). La transducción de la señal la lleva a cabo un sensor kinasa, el primer componente, que interactúa directamente con un ligando señal o con un receptor que se une al ligando señal; el producto final de este proceso es usualmente una histidina autofosforilada. La kinasa fosforilada es reconocida por un regulador de la respuesta específico, el segundo componente, al cual es transferido el fosfato y de esta forma se activa el regulador de la respuesta (8, 18). Generalmente, el segundo componente es un factor de transcripción para genes que codifican para proteínas que están involucradas con la señal original que activa el sistema (16, 19).

Se ha encontrado un alto porcentaje de similitud entre el sistema regulador de dos componentes BvrR-BvrS de *Brucella abortus* y los sistemas de regulación ChvI-ExoS de *Rhizobium meliloti* y ChvI-ChvG de *Agrobacterium tumefasciens.* Este grupo de sistemas similares parecen ser de vital importancia para el establecimiento de relaciones entre estas bacterias y sus hospedadores (20).

La disfunción del sistema BvrR-BvrS altera las propiedades de la membrana externa de *Brucella* y la hace más susceptible a los mecanismos de defensa de su hospedador. Se ha demostrado que mutantes para los genes que codifican para este sistema penetran en bajo número a las células y no son incapaces de inhibir la fusión fagosoma-lisosoma por lo que difícilmente sobreviven y se replican intracelularmente (20).

El sistema BvrR-BvrS regula la expresión de algunas proteínas de membrana externa (Omps) y la estructura del lípido A, componentes de superficie críticos para el parasitismo celular y posiblemente para la homeostasis de la membrana externa (Fig.1). Al igual se demostró que mutantes en alguno de los componentes de este sistema provoca la disminución de una proteína todavía no identificada y la ausencia de Omp3a y Omp3b, ésta última recién descubierta y de función desconocida (6).

JUSTIFICACIÓN

La brucelosis es una enfermedad endémica en países en desarrollo y anualmente ocasiona grandes pérdidas económicas en el campo de la ganadería sobre todo por su capacidad de producir esterilidad en los machos e inducir aborto en las hembras de animales de importancia económica (15).

A nivel mundial, la brucelosis es también una de las zoonosis y enfermedades ocupacionales más importantes. En muchos casos esta enfermedad puede llegar a ser incapacitante, la recuperación puede ser muy lenta y los periodos de administración de antibióticos pueden ser prolongados; por lo que se generan gastos económicos no solo a los servicios de salud sino a las naciones en general (20).

A pesar de la intensa investigación que se ha desarrollado en torno a la virulencia de esta bacteria, aún no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares y celulares por los que la bacteria invade, transita y se replica dentro de su célula hospedero. Frecuentemente, se describen nuevos componentes involucrados en la patogeniciad de *Brucella abortus* y se descubren interacciones entre estos nuevos mecanismos y los ya conocidos.

El desarrollo de herramientas específicas para estudiar los procesos claves durante la infección de la bacteria permitiría la mejor comprensión de los mecanismos de virulencia causantes de la patogenicidad de la misma.

Con este conocimiento, la posibilidad de desarrollar nuevas y mejores soluciones que contribuyan al control de la infección sería una realidad. Se podrían generar vacunas y antibióticos más efectivos que disminuyan la capacidad de la bacteria de infectar y que ayuden a controlar la enfermedad en el mundo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de las proteínas del sistema de dos componentes BvrR-BvrS y de proteínas bajo el control del mismo mediante el uso de anticuerpos específicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar péptidos que abarquen secuencias de aminoácidos del sensor del sistema regulador de dos componentes BvrR-BvrS y de la proteína de membrana externa Omp3b de *B. abortus.*

2. Obtener anticuerpos policlonales contra el sensor de BvrR-BvrS inmunizando un animal de laboratorio con el péptido BvrS sintetizado.

3. Purificar los anticuerpos obtenidos.

4. Detectar el sensor Bvrs en lisados celulares de diferentes cepas de *B. abortus* utilizando los anticuerpos anti-BvrS purificados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de péptidos

Los péptidos se sintetizaron mediante una técnica manual en fase sólida utilizando la estrategia "F-moc" (12). Los residuos se acoplaron en forma secuencial del extremo C-terminal hasta el N-terminal. En cada acople se desprotegió el grupo α-amino del aminoácido antecesor o de la resina (primer paso de la síntesis) con piperidina al 20% a temperatura ambiente y en agitación, posteriormente se efectuaron lavados con N,N-dimetilformamida (DMF) y se verificó la presencia del grupo α-amino libre mediante la prueba positiva de kaiser o de cloranilo, ésta última únicamente para el residuo prolina. El primer aminoácido se acopló a la resina de soporte Rink Amide MBHA reconstituída en DMF a razón de 0,062 mmol de resina por gramo de péptido a sintetizar. La unión del siguiente aminoácido se realizó mediante activación con los reactivos HbTu, HboT y DiPEA disueltos en DMF, se incubó en agitación y a temperatura ambiente por un periodo de tiempo variable según la estructura química del aminoácido, posteriormente se lavó con DMF y se verificó la presencia del grupo α-amino protegido mediante una prueba negativa de Kaiser (o de cloranilo). A ambos péptidos se les acopló en última instancia una lisina con el fin de facilitar su unión a proteínas transportadoras. Antes de efectuar la liberación del péptido de la resina ésta se lavó 3 veces con metanol. La desprotección de las cadenas laterales R se efectuó agregando reactivo K (ácido trifluoroacético, tiofenol, agua purificada, ditiotreitol, etanoditiol y anisol) e incubando por un tiempo mínimo de una hora y por treinta minutos más por cada residuo de arginina presente en la secuencia sintetizada. Se hizo gotear el filtrado sobre éter frío para precipitar el péptido y se centrifugó 3 veces a 1.500g a 4°C resuspendiendo en éter frío. Finalmente, se dejó secar todo el éter del

precipitado en una campana de extracción y se disolvió el péptido en ácido acético al 1% se congeló y posteriormente se liofilizó. Se determinó el rendimiento de la síntesis obteniendo el peso neto del péptido liofilizado. Finalmente se reconstituyó una pequeña cantidad del péptido sintetizado en una solución de ácido acético al 1% y se analizó mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), en una columna de fase reversa C8 (250 x 10 mm; Vydac, EUA).

Acople del péptido sintético de BvrS a toxoide diftérico

Se siguió el protocolo para acople de péptidos a proteínas transportadoras que utiliza carbodiimida como activador de grupos carboxílicos (12). Se diluyó el péptido a 1 mg/mL en agua. Posteriormente se agregó hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) hasta alcanzar una concentración de 10 mg/mL. Se ajustó el pH a 5 y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió un volumen igual de toxoide diftérico y se incubó a temperatura ambiente por 4 horas. Se detuvo la reacción agregando acetato de sodio (pH 4.2) e incubando una hora a temperatura ambiente. Se realizó diálisis contra PBS para purificar.

Protocolo de inmunización

Se inmunizaron conejos vía intramuscular. Se inyectó 250 ug del péptido sintetizado acoplado a toxoide diftérico más adyuvante de Freund completo como dosis inicial y 3 dosis de 250 ug del péptido más adyuvante de Freund incompleto como dosis de refuerzo cada dos meses por la misma ruta durante 6 meses. Para la obtención del suero policlonal se realizó sangría en la arteria central de la oreja.

Purificación de anticuerpos

Se realizó una curva de calibración para la determinación de la concentración del péptido mediante el método de Bradford a 280 nm para posteriormente verificar la eficiencia del acople (2). Se purificaron los anticuerpos mediante cromatografía de afinidad para lo cual se preparó un gel de Sepharose® al 10% en HCl 1mM. Al gel se le añadieron 5 mL del péptido sintetizado a una concentración aproximada de 2 mg/mL en buffer de Na_2HCO_3 para activarlo. Se incubó por tres horas posteriormente se centrifugó y determinó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Se resuspedió el gel en glicina 5mM pH 8.8 y se reincubó en agitación durante 30 minutos para detener el acoplamiento y bloquear sitios activos. Se centrifugó y descartó el sobrenadante. Al gel con el péptido acoplado se añadió el suero anti-BvrS y se incubó en agitación por 2 horas y media. Finalmente se realizó una corrida en columna para separar el resto del suero no unido al péptido. Se utilizó Na_2HCO_3 como fase móvil y se eluyeron los anticuerpos con glicina pH 2.5 , los cuales fueron recolectados por fraccionamiento en tubos que contenían Tris 0,5M pH 8.8. A los tubos con las fracciones que presentaron un pico alto en el graficador se les determinó la absorbancia a 280nm para determinar su concentración y se les concentró utilizando una cámara de ultrafiltración .

Western blot de lisados celulares de *B. abortus* utilizando anticuerpos anti-BvrS

Se utilizaron las cepas de *B. abortus* silvestre 2308, cepa atenuada *bvrs* 2.13, cepa rugosa PerA y cepa mutante *bvrs* 2.13 reconstituida con el sensor ExoS de *Sinorhizobium meliloti.* Para obtener los lisados celulares, las diferentes cepas se cultivaron durante 24 horas en agitación en caldo tripticasa soya (CTS), se tomaron alícuotas de cada cepa, se centrifugaron y se les añadió buffer de lisis (10). Las soluciones obtenidas se hirvieron

durante 10-15 minutos. Se determinó la concentración de proteínas para ajustar la cantidad de muestra a 20 μg. La electroforesis de proteínas se realizó por Tris/glicina SDS-PAGE. Se verificó la separación de las proteínas con colorante de Coomassie. Para el Western blot, se transfirió el gel a un papel de nitrocelulosa y se comprobó la transferencia con colorante de Ponceau S. Se bloquearon los sitios libres incubando en agitación en presencia de leche descremada (11). Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos purificados, diluidos 1/100. Se agregó un conjugado anti-conejo peroxidasa. Los complejos inmunes se visualizaron mediante reacción de quimioluminiscencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de péptidos

La elección de la secuencia de aminoácidos del sensor BvrS que se sintetizó se llevó a cabo tomando en cuenta su ubicación en el dominio citoplasmático de la proteína lo que implica que la secuencia tenga carácter hidrofílico y por lo tanto una antigenicidad predictiva mayor (Fig. 2). Esta ubicación también garantiza alta homología (con excepción de 2 a 3 aminoácidos) entre el sensor de *Brucella* y el de otras bacterias de la subclase α-Proteobacteria, debido a que en este dominio se encuentra el sitio de fosforilación histidina kinasa el cual es muy conservado entre los diferentes sistemas sensores en donde participan dos componentes, contrario a lo que sucede en la región periplasmática en donde se encuentra el sitio de unión específico al ligando señal el cual presenta alta variabilidad. Los anticuerpos dirigidos contra una secuencia relativamente conservada como ésta podrían utilizarse no sólo para el reconocimiento de las proteínas de *Brucella* sino también para probar si hay reconocimiento por reacción cruzada de proteínas de bacterias relacionadas y determinar si los diferentes sensores están antigénicamente relacionados.

Las secuencia sintetizada del sensor BvrS incluía los residuos de aminoácidos 543 al 557: KYTDRPASEAFGQNSG. La alineación de las proteínas BvrS de *B. abortus* y ExoS de *S. meliloti* demostró una alta homología con un 63% de identidad (20), es por ello que se seleccionó esta secuencia en particular, pues presenta una alta similitud con la secuencia correspondiente del sensor ExoS de *S. meliloti* con la que difiere en solamente tres residuos de aminoácidos (Fig. 3).

El péptido del sensor se solubilizó fácilmente en ácido acético al 1% y al analizarlo mediante HPLC se encontraron seis picos principales; el segundo pico era el mayor de ellos

con un área de 77.6646 % y un tiempo de retención de 24.652 minutos, el cual muy probablemente correspondía al péptido deseado (Fig. 4). El peso final obtenido del péptido fue de 77 mg.

La secuencia sintetizada de la proteína de membrana externa Omp3b abarcaba los residuos de aminoácidos 27 al 41: KMMGGTDYTYNDPVAA. En anteriores investigaciones en donde se alinearon las secuencias de aminoácidos de diferentes proteínas de membrana externa se encontró homología entre esta nueva Omp3b con la Omp3a también de *B. abortus,* Omp31 de *B. melitensis* y la RopB de de *R. leguminosarum* (8). Anteriormente, también se probaron lisados de membrana externa de diferentes cepas de *B. abortus* con anticuerpos dirigidos contra una secuencia de la que corresponde por alineación con la secuencia de Omp3b seleccionada para sintetizar (8) Es por ello, que al escoger esta secuencia de la Omp3b se pretende contar con un péptido que sirva para inmunizar y obtener anticuerpos que se utilicen para probar a las diferentes proteínas de membrana externa y determinar si existe relación antigénica entre ellas, así como determinar si diversas cepas de *B. abortus* expresan la Omp3b y bajo cuáles condiciones.

El péptido de la Omp3b resultó sumamente hidrofóbico y fue muy difícil disolverlo en la solución de ácido acético, lo cual era predecible debido a la marcada hidrofobicidad de la mayoría de los residuos de la secuencia; éste podría ser un importante inconveniente para la futura utilización de este péptido sintético, puesto que la mayoría de los sistemas de trabajo son acuosos. El análisis de la preparación por HPLC presentó seis picos principales, el quinto pico era el más importante con un área de 49.0126% y un tiempo de retención de 38.490 minutos, éste pico probablemente correspondía al péptido de la Omp3b (Fig. 5), sin embargo para comprobarlo sería necesario realizar espectrometría de masas. El peso del péptido obtenido fue de 113 mg.

Purificación de anticuerpos

La eficiencia del acople del péptido al gel fue satisfactoria, ya que se obtuvo un 100% de acoplamiento. Este valor se determinó comparando la concentración del péptido antes y después del acople por interpolación de las absorbancias respectivas en la curva de calibración (Fig. 6).

En cada una de las tres corridas de purificación se obtuvieron 9 fracciones y se encontró un pico máximo de recuperación de anticuerpos para cada corrida (Fig. 7). A las fracciones con mayor recuperación se les determinó la absorbancia a 280 nm y utilizando el coeficiente de extinción a 280 nm para las inmunoglobulinas se determinó que la concentración de las fracciones era de 390 µg/ml, 240 ug/ml y 560 ug/ml para las tres corridas, respectivamente.

Western blot de lisados celulares de *B. abortus* utilizando anticuerpos anti-BvrS

El análisis del Western Blot indica que los anticuerpos policlonales anti-BvrS fueron capaces de detectar bandas proteicas cercanas a los 60 KDa en los lisados celulares de *B. abortus* cepa silvestre 2308 y cepa rugosa PerA. El peso molecular de estas bandas proteicas coincide con el peso molecular esperado para el sensor BvrS que es de aproximadamente 66 Kda, por lo que es muy probable que los anti-BvrS producidos efectivamente estén reconociendo al sensor (Fig. 8). Los anticuerpos anti-BvrS no detectaron ninguna banda proteica en la cepa mutante 2.13 que carece de *bvrs* y que se incluyó como control negativo. En los lisados celulares de la cepa 2.13 que fue reconstituida con el sensor ExoS de *S. meliloti* los anticuerpos anti-BvrS no fueron capaces de reconocer ninguna proteína.

En estudios anteriores acerca del sistema BvrS-BvrR y su relación antigénica con los sistemas reguladores de dos componentes de otras bacterias de la subclase α-Proteobacteria se utilizaron anticuerpos policlonales anti-ExoS de *S. meliloti* para probar si esos anticuerpos eran capaces de reconocer proteínas en los lisados celulares de diferentes cepas de *B. abortus*; y se determinó que esos anticuerpos únicamente detectaban bandas proteicas que correspondían con el peso molecular del sensor BvrS en cepas de fenotipo rugoso (6). Posteriormente, también se investigó si los anticuerpos dirigidos contra el sensor BvrS podían reconocer al sensor ExoS en lisados celulares de *S. meliloti* y si podían reconocer al sensor BvrS en diferentes cepas de *B. abortus*. Se demostró que los anticuerpos anti-BvrS no reaccionaban en forma cruzada contra el ExoS y que solamente reconocían al BvrS que era expresado en las cepas rugosas de *B. abortus* (6). Los hallazgos de la presente investigación coinciden con esos estudios previos y confirman la correlación entre el fenotipo rugoso y la detección de BvrS.

El alto grado de homología entre la secuencia sintetizada del sensor BvrS y la secuencia correspondiente del sensor ExoS hacía esperar un reconocimiento por reacción cruzada de los anticuerpos anti-BvrS contra el sensor ExoS expresado en la cepa 2.13 reconstituída. Sin embargo, parecería que el cambio de tres residuos de aminoácidos en la secuencia fue suficiente para variar las propiedades antigénicas del péptido sintético del sensor BvrS con respecto a las propiedades del sensor ExoS, de manera que el epitopo lineal que fue reconocido para la producción de los anticuerpos anti-BvrS fue diferente al epitopo lineal de la proteína ExoS en el lisado celular y no fue posible su reconocimiento en el Western Blot.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los anticuerpos desarrollados en este estudio parecen tener la capacidad de detectar al sensor BvrS de *Brucella abortus*, proteína importante involucrada en la patogenicidad de esta bacteria. La disponibilidad de esta herramienta permitirá continuar experimentando acerca de la expresión del sensor BvrS en cepas de *B. abortus* y en bacterias relacionadas. De la misma forma se podría estudiar la expresión de este sensor en cepas silvestres virulentas bajo condiciones controladas de infección, y tratar de dilucidar cuándo y en respuesta a cual estímulo el sistema BvrR-BvrS se activa e interviene en el proceso de adhesión, internalización y replicación intracelular de la bacteria. En un futuro podrían realizarse ensayos *in vivo* de reconocimiento del sensor BvrS que conduzcan al desarrollo de estrategias como vacunas o fármacos que contribuyan al manejo de la brucelosis en el mundo.

De la misma forma en que se procedió con el sensor BvrS, el péptido sintetizado de la proteína de membrana externa Omp3b, podría eventualmente utilizarse para inmunizar, producir anticuerpos y experimentar con ellos; para finalmente determinar las condiciones que afectan la expresión de esta proteína, su relación con los otros mecanismos de virulencia y su función.

REFERENCIAS

1. Barret, J., Hoch, J.1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. Antimicrobial Agents Chemotherapy.42, 1529-1536.

2. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical. Biochemistry. 72, 248-254.

3. Chaves, E., Guzmán, C., Badilla, J., Meresse, S., Gorvel, J.P., Moreno, E. 2002. Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. Cellular Microbiology. 10, 663-668.

4. Fessenden, R., Fessenden, J.1992. Organic Chemistry. PWS Publishers. Boston, USA. 14, 345-366.

5. Goudreau, P., Stock, A. 1998. Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. Cell regulation. 1, 160-169.

6. Guzmán-Verri, C.2002. Tesis: Virulence mechanisms of two Gram negative bacteria: studies on *Escherichia coli* hemolisyn HlyA and on the interaction of *Brucella abortus* with non-phagocytic cells. Karolinska Institutet. Stockholm, Sweden. 10-62.

7. Guzmán-Verri, C., Chaves, E., von Eichel, C., López, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J.P., Moreno, E. 2001. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non professional phagocytes. Journal of Biological Chemistry. 276, 44435-44443.

8. Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landá, A., Parra, A., Cloeckaert, A., Garin, J, Gorvel, JP., Moriyón, I., Moreno, E., López, I. 2002. The two component regulatory system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiacea. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. 99, 12375-12380.

9. Hancock, R., Chapple, D. 1999. Peptide Antibiotics. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 43, 1317-1323.

10. Laemmli, U.K. 1970. Nature. 227, 680-685.

11. Lomonte, B. 2000. Inmunología General Manual de Laboratorio. Segunda edición. San José, Costa Rica. 14, 99-106.

12. Lomonte, B. 2001. Síntesis de péptidos en fase sólida, por el método manual, utilizando la estrategia "F-moc". Manual de Procedimientos. San José, Costa Rica. 1-6.

13. López-Goñi, I., Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Moriyón, I., Moreno, E. 2002. Regulation of *Brucella* virulence by the two component system BvrR/BvrS. Veterinary Microbiology. 90, 329-339.

14. Mahon,C., Manuselis, G. 1995. Diagnostic Microbiology. Harcourt Brace & Co. Phi, Penn, EUA. 15, 443-446.

15. Perego, M., Hoch, J. 1996. Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems. 12, 97-101.

16. Perraud AL, Weiss V, Gross R. 1999. Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. Trends of Microbiology. 7, 115-20.

17. Pizarro, J., Moreno, E. , Gorvel, J.P. 2000. Invasion and intracellular traffiking of Brucella abortus in non phagocitic cells. Microbiology and Infection. 2, 829-835.

18. Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., Sanguedolce V., Mege, J.L., Gorvel, J. P. 1998. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within phagosome-like compartments. Infection and Inmunity. 66, 2387-2392.

19. Prescott, L, Harley, J, Klein, D.1999. Microbiology. Cuarta edición. Editorial McGraw Hill. EUA. 22, 475-482.

20. Sola-Landa, A., Pizarro-Cerdá, J., Grillo, M.J., Moreno, E., Moriyón, I., Blasco, J.M., Gorvel, J.P., López-Goñi, I. 1998. A two component regulatory system playing a critical role in plants pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. Molecular Microbiology. 29, 125-38.

ANEXO

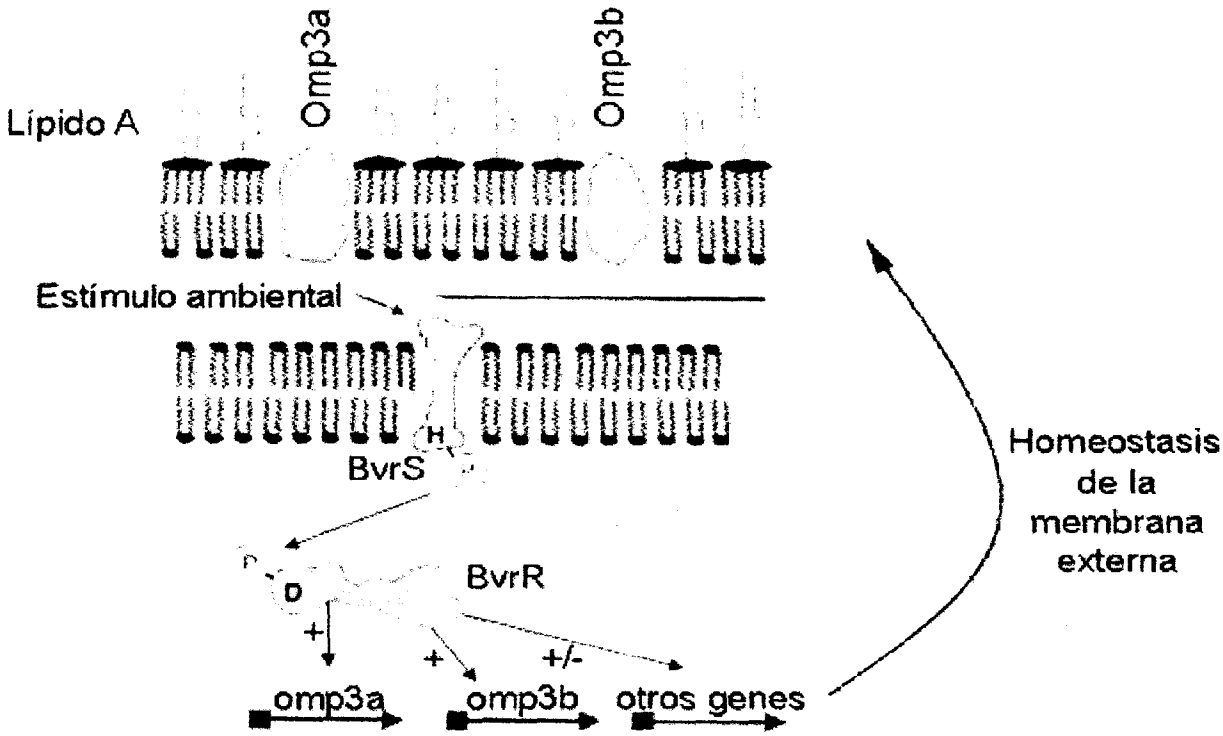

Figura 1. Modelo representativo del sistema regulador de dos componentes BvrR-BvrS de *Brucella abortus*. En respuesta a un estímulo ambiental el dominio sensor periplasmático BvrS trasloca la señal a un dominio histidina kinasa que promueve su propia fosforilación, ésto cataliza la fosforilación de la proteína reguladora BvrR. La proteína BvrR fosforilada activa la transcripción del omp3a y probablemente omp3b y otros genes no identificados aún. A partir de ésto la estructura del lípido A, la expresión de la Omp3A y Omp3B así como la presencia de otras proteínas en la membrana externa de *Brucella* están directa o indirectamente reguladas (13).

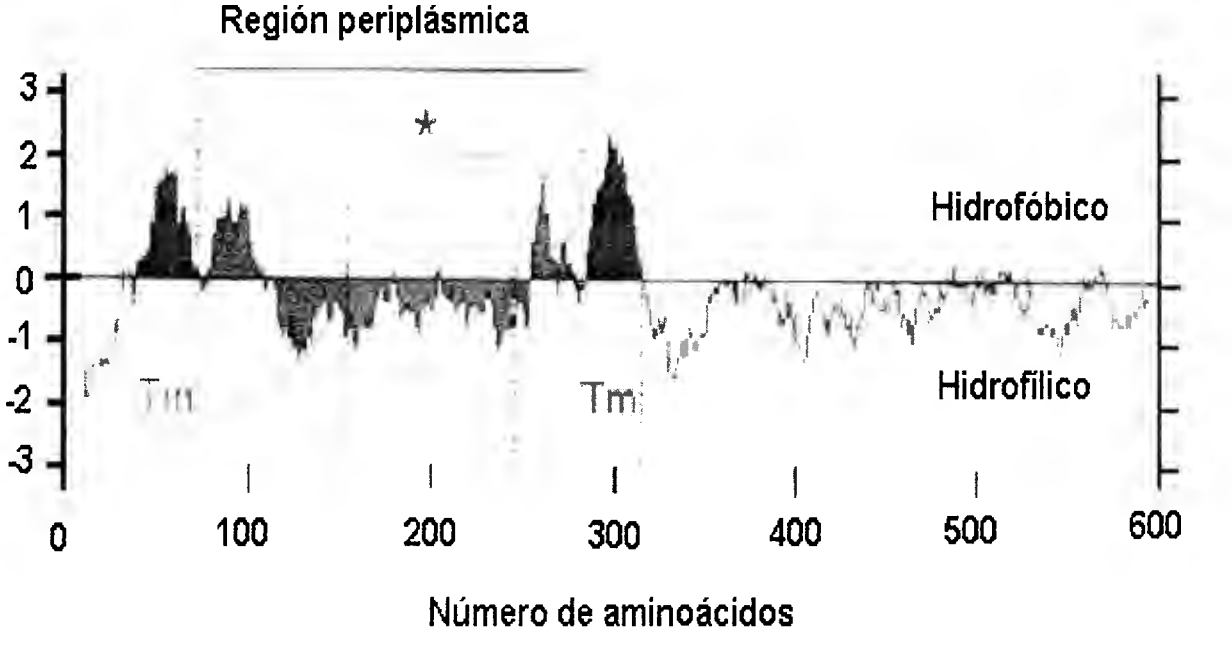

Figura 2. Dominios hidrofílicos e hidrofóbicos del sensor BvrS. Se muestran los dominios transmembrana (Tm) y los dominios periplasmáticos. El asterisco representa la región del dominio periplásmico que tiene la mayor divergencia entre BvrS y otras proteínas sensoras. (13).

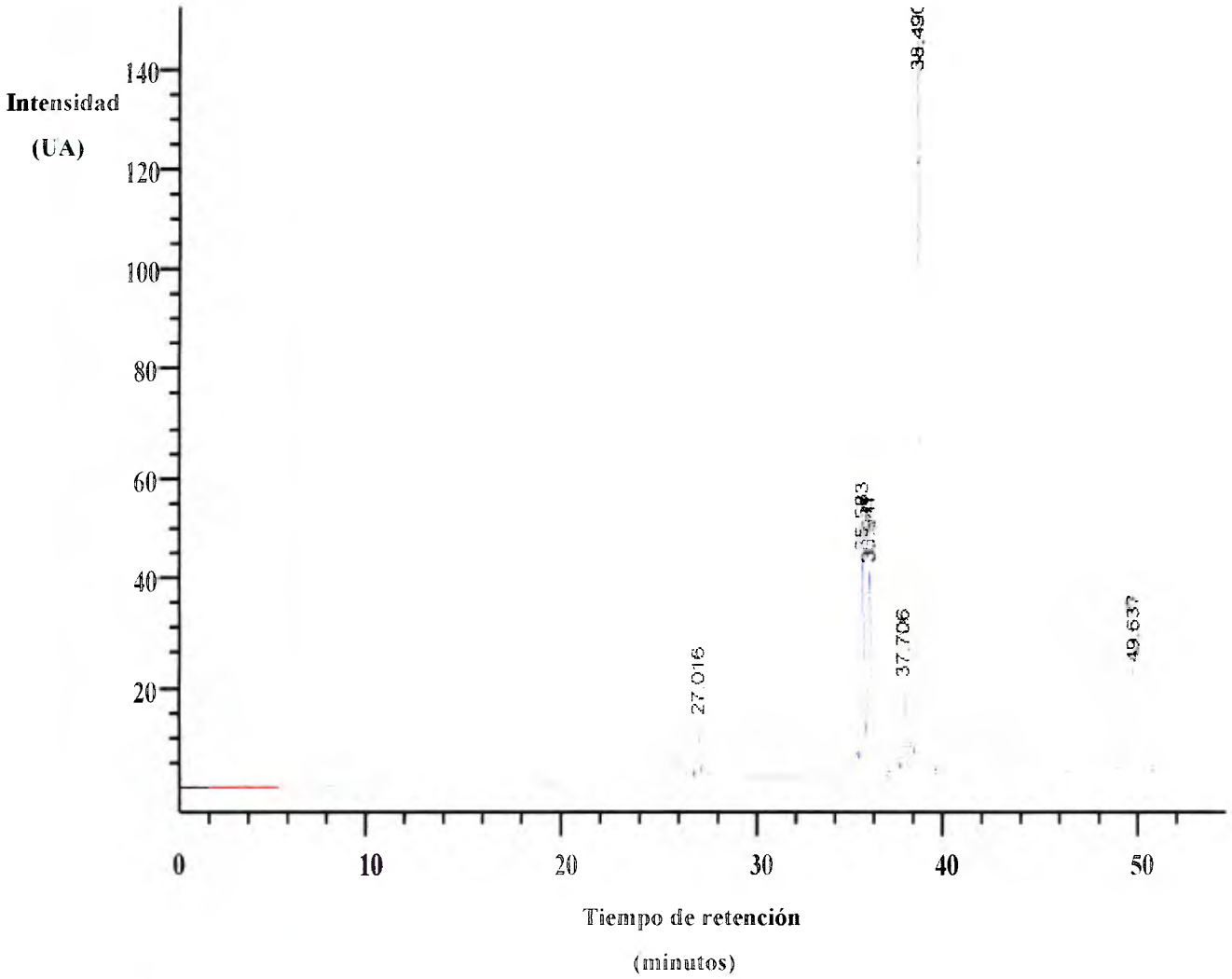

Figura 5. Análisis por cromatografía líquida de alto desempeño en fase reversa (RP-HPLC), en una columna C8 (semipreparativa, 250 x 10 mm), de la preparación del péptido sintético de la proteína de membrana externa Omp3B. El gradiente de concentración de acetonitrilo en la fase móvil se indica como una línea de color rojo. El pico con un tiempo de retención de 38.490 minutos y área de 49.0126% corresponde al péptido sintetizado.

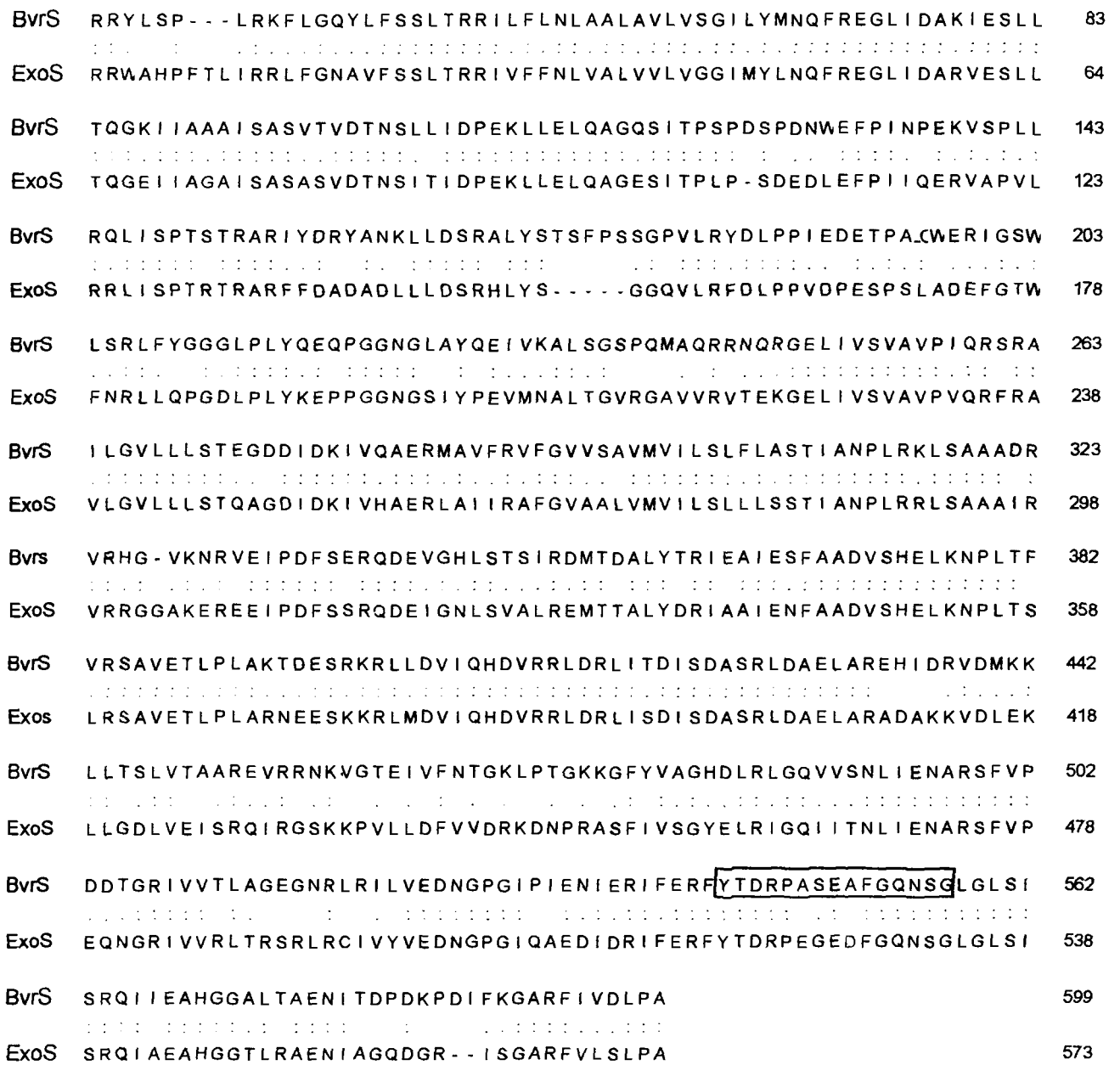

Figura 3. Alineación de las secuencias del sensor BvrS de *Brucella abortus* y del sensor ExoS de *Sinorhizobium meliloti*. Los residuos de aminoácidos idénticos se indican con dos puntos, los cambios conservativos se indican como un punto. La secuencia de BvrS sintetizada y utilizada para producir los anticuerpos anti-BvrS se encuentra enmarcada.

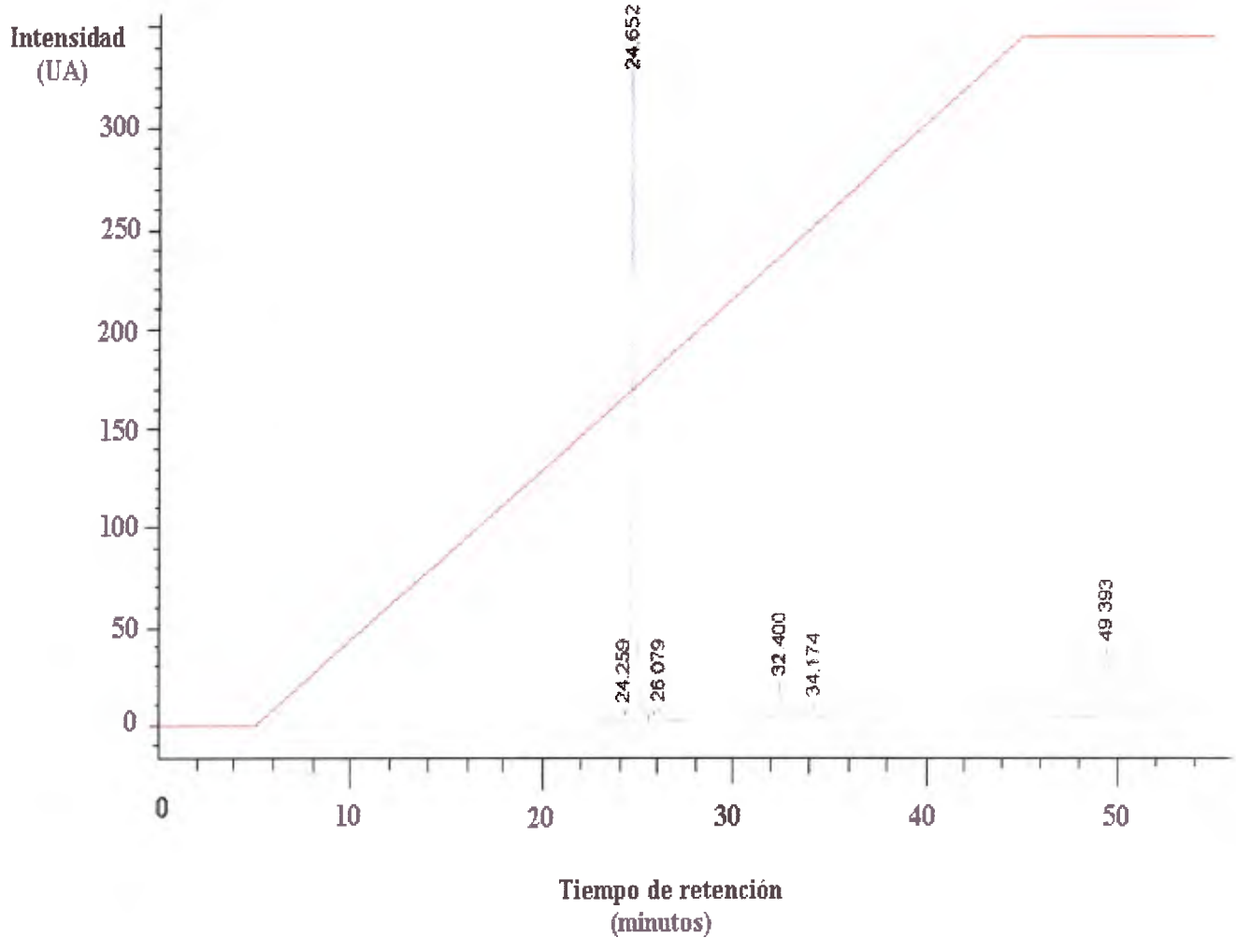

Figura 4. Análisis por cromatografía líquida de alto desempeño en fase reversa (RP-HPLC), en una columna C8 (semipreparativa, 250 x 10 mm), de la preparación del péptido sintético del sensor BvrS. El gradiente de concentración de acetonitrilo en la fase móvil se indica como una línea de color rojo. El pico con un tiempo de retención de 24.652 minutos y área de 77.6646% corresponde al péptido sintetizado.

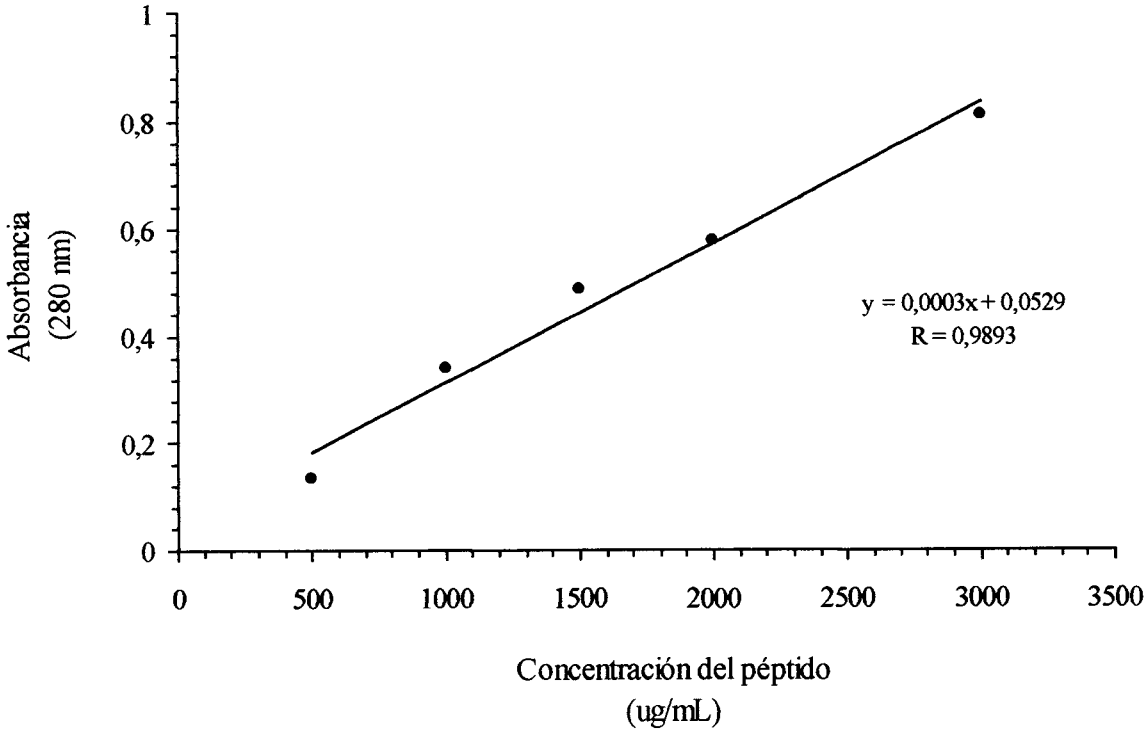

Figura 6. Curva de calibración para la determinación de la concentración del péptido sintético BvrS por el método de Bradford a 280nm.

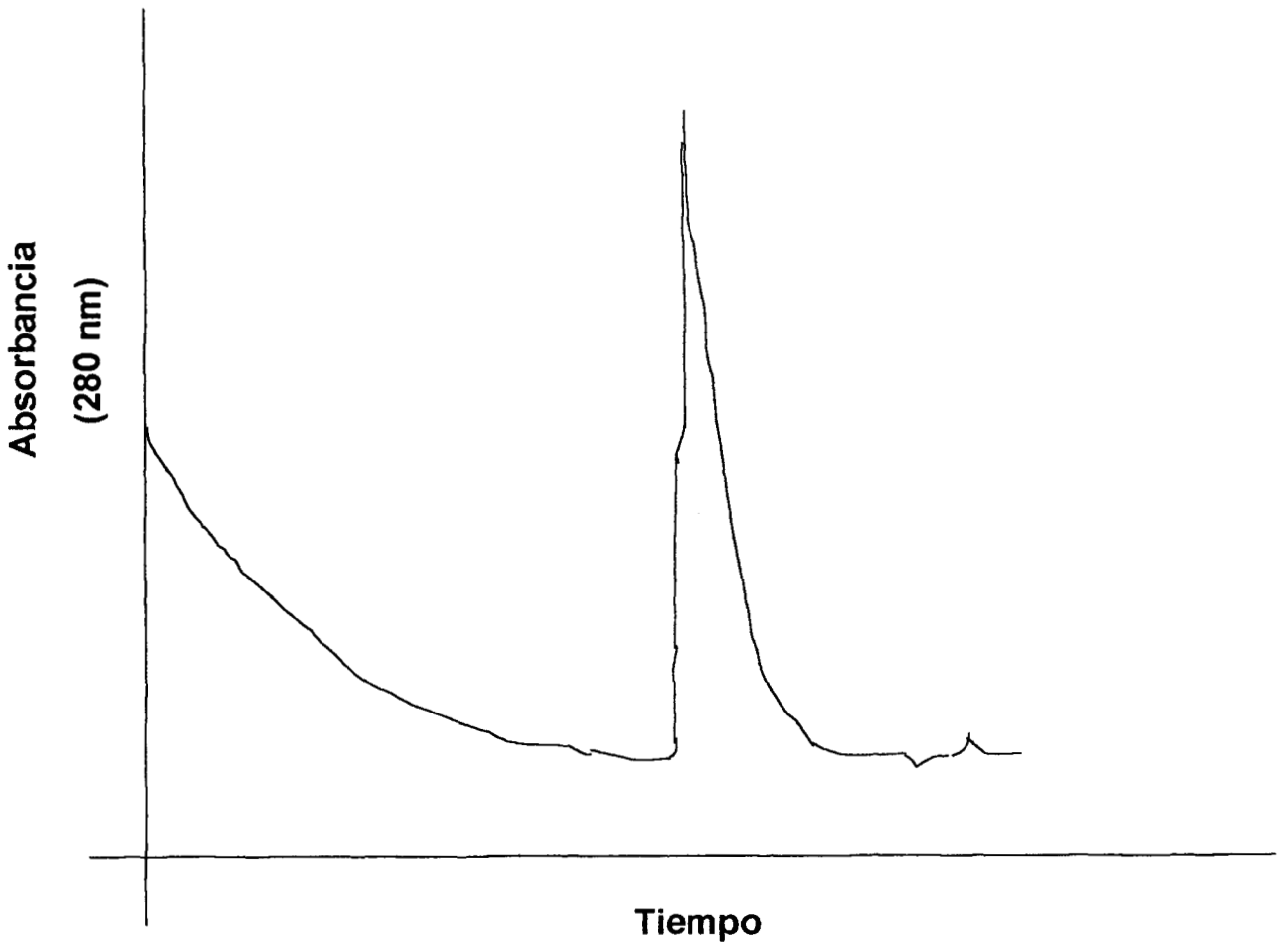

Figura 7. Purificación de anticuerpos anti-BvrS mediante cromatografía de afinidad.

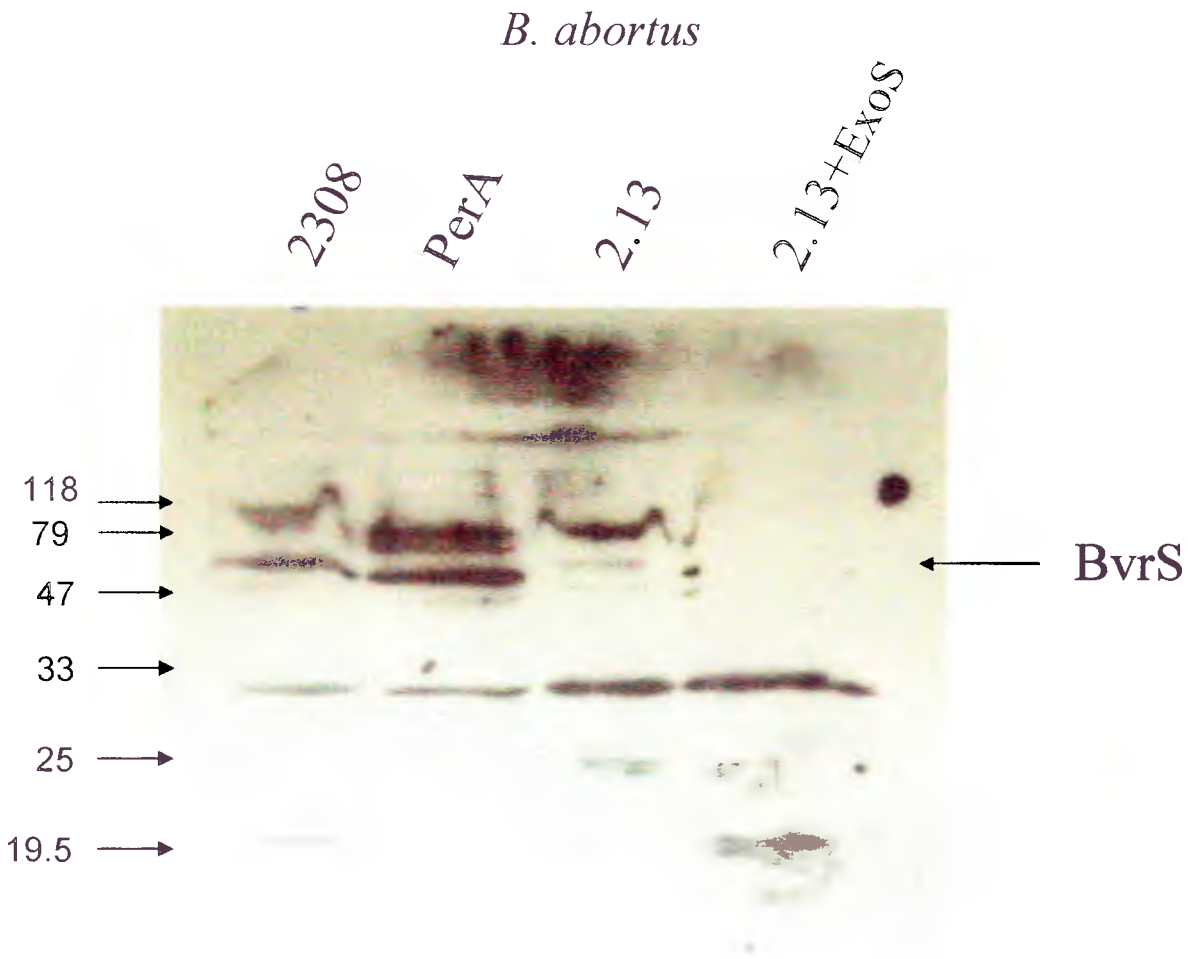

Figura 8. Análisis por Western Blot de muestras de *Brucella abortus* usando anti-BvrS. Se analizaron los lisados celulares de las cepas de *B. abortus* 2308 fenotipo silvestre, PerA rugosa, mutante 2.13 bvrS y 2.13 reconstituida con ExoS de *Sinorhizobium meliloti*. Se detectaron bandas proteicas de peso molecular esperado para el sensor BvrS en las primeras dos cepas. No se demostró reconocimiento del sensor ExoS por reacción cruzada.