



**INSTITUTO LELOIR**  
FUNDACIÓN

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y naturales  
Fundación Instituto Leloir



“Estudios estructurales, funcionales y evolutivos de una proteína de *B. abortus* relacionada con la vía biosintética de la riboflavina”

Lic. Vanesa Zylberman

Director: Dr. Fernando Alberto Goldbaum

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA DE LA UNIVERSIDAD  
DE BUENOS AIRES

2006

*A Fernando por ser un excelente jefe y haber confiado en mi todos estos años. Por estar siempre dispuesto a discutir mis resultados, y haberme dado la posibilidad de trabajar con mucha libertad.*

*A todos los compañeros del labo: Sebas, Juan, Ana, Marie, Pau, Gastón, Vani, Pato, Hernán y Naty. Me ayudaron muchísimo en mi Tesis!, por crear un clima cálido de trabajo, por todos los favores que me hicieron, y por las risas de cada día. A Pato por las enriquecedoras charlas sobre la lumazina, por alentarme en la escritura y por enseñarme a usar el light scattering. A Sebas por compartir sus conocimientos cristalográficos. A Naty, por la amistad que nos une y por todas las veces que me sentí comprendida por vos. A los que alguna vez formaron parte del labo: Lau, Flaca, Die, Meli, Guille. A la flaca, que en mis comienzos me tuvo mucha paciencia, por ser tan confiable y sincera. A Lau por ser una persona tan encariñable. A Guille por repartir su humor en cada momento.*

*A Gonzalo, por sus consejos, por interesarse en mi trabajo y por ser tan generoso conmigo, permitiéndome usar el equipamiento que necesité.*

*A la gente del 209 donde siempre me sentí bien recibida. A Leo por cambiarme tantas veces el tip del sonicador sin molestarse y por ser tan amigable (aunque yo no sea de BJ). A Mery por su franqueza. A Marian por ayudarme con el EndNote y por algún que otro mangazo. A Ale, Marce, Clari, Diana, Eleo y Cari por su simpatía.*

*A nuestros vecinos más cercanos*

*del 303. A Lore por los tantos cigarrillos que me convidó, A Diana, por ayudarme con el análisis filogenético.*

*A todos los becarios y jefes de la FIL, por ser siempre tan amables. A toda la gente de la FIL que agilizan el trabajo diario. A Silvia por ayudarme con todos los tramites y por ser una persona tan sensible y agradable. A bibliotecarias/os por conseguirme las citas rápidamente. A Juan por la encuadernación. A Dora por el buen día de todos los días. A la Fundación por la beca de los últimos seis meses.*

*Al CONICET, que sustentó mi trabajo de los últimos cinco años. A la UBA, la Facu, que me dio mi formación basal.*

*A Amaicha por ayudarme con las correcciones finales, gracias!.*

*A Dani por ser una amiga tan genuina, accesible, por el respeto y admiración mutuo. Por todas las veces que escuchaste mis presentaciones y por tus consejos.*

*A Lu, queridísima amiga, por que me bancas en todo, por la tranquilidad que siento al saber que puedo confiar y contar con vos, y por que no hubiera sido lo mismo sin vos. Gracias Lu!*

*A mis amigas de siempre, Mari, Gabi, Maru que son un apoyo importante en mi vida.*

*Al equipo "basas", por que hacer que los encuentros familiares sean inolvidables.*

*A Rober, Bea, por que son tan afectuosos conmigo, por el apoyo constante y por haber montado la base de una familia hermosa.*

*A mis sobrinos, por que cada uno ocupa un lugar gigante en mi corazón.*

*A Kari por entender mi limitación de tiempo y estar siempre presente en mi vida.*

*A mamá y papá, por su generosidad, por el empuje de todos los días, por que puedo contar con ustedes, por que me quieren, me cuidan, por marcarme el camino de la responsabilidad, y por haberme preguntado tantas veces quien quiero ser.*

*A Javi, por tu amor permanente y perdurable, por tu calmada manera de ser, por que me tratas de entender, por que te preocupas tanto por mi y por que tu presencia me hace feliz.*

*Javi, a vos te dedico esta Tesis.*

*Riboflavin is an essential cofactor for all organisms. The penultimate step in riboflavin biosynthesis involves the condensation of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate with 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione, catalyzed by 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (LS). LS is composed of monomers that assemble into pentamers which, in turn, can associate into icosahedral particles or remain as pentamers, depending on the organism analyzed. Pathogenic Brucella species present two genes involved in riboflavin synthesis, ribH1 and ribH2, located on different chromosomes. The ribH2 gene codifies for the P18 (or RibH2) enzyme and previous studies demonstrated that it is a dominant antigen during Brucella spp. infection, capable of eliciting a strong cellular and humoral response in-vivo. The present thesis determined that the P18 protein presents a novel quaternary arrangement, consisting of a dimer of pentamers as well as low catalytic LS activity (LS type-II). The lack of LS activity was related to the protein's structure, which diverged to give rise to a different and unknown function. Also, we show that the RibH1 enzyme (LS type-I), codified by the ribH1 gene, fulfills the classical LS role in B. abortus. The results presented in this work promoted an evolutionary study of LS, which set the grounds for understanding divergent biological functions of this protein.*

**Keywords:**

*Lumazine synthase; riboflavin; structural stability; Brucella; virulence factor.*

*La riboflavina es un cofactor esencial de todos los organismos. El penúltimo paso de su vía biosintética involucra la condensación de 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato con 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinediona, catalizada por la enzima 6,7-dimethyl-8-ribitillumazina sintetasa (LS). Las LS se encuentran compuestas por monómeros que se unen formando pentámeros, los cuales a su vez según el tipo de organismo del cual provienen, pueden asociarse en estructuras icosaédricas o permanecer como pentámeros aislados. Las bacterias patógenas del género *Brucella* spp, poseen dos genes con similitud de secuencia para dicha enzima: *ribH1* y *ribH2*, ubicados en diferentes cromosomas. La proteína P18 (ó *RibH2*) de *B. abortus* codificada por el gen *ribH2*, es un antígeno dominante durante la infección por *Brucella*, capaz de generar una fuerte respuesta celular y humoral. En la presente tesis, se determinó que P18 presenta un arreglo cuaternario novedoso, descrito como un dímero de pentámeros con una baja afinidad por el sustrato 1 (LS tipo II). La novedosa estructura de P18 se relacionó estrechamente con su falta de actividad, permitiendo postular que la proteína divergió hacia una función diferente y aún desconocida. Por otro lado, se mostró que la enzima *RibH1* de *B. abortus* (LS tipo I), codificada por el gen *ribH1*, cumpliría el rol enzimático clásico. Los resultados presentados en éste trabajo promovieron un análisis evolutivo de las LS y sentaron las bases para la búsqueda de funciones biológicas derivadas.*

**Palabras claves:**

*Lumazina sintetasa; riboflavina; estabilidad estructural; *Brucella*; factores de virulencia.*

Algunos de los resultados presentados en esta Tesis fueron publicados en las siguientes revistas científicas:

"Evolution of vitamin B<sub>2</sub> biosynthesis. 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthases of *Brucella*".

Vanesa Zylberman, Sebastián Klinke, Ilka Haase, Adelbert Bacher, Markus Fischer and Fernando Alberto Goldbaum. *J. Bacteriology*, 188(17): 6135-42.188, **2006**.

"Crystallographic studies on decameric *Brucella* spp. Lumazine synthase: a novel quaternary arrangement evolved for a new function?".

Klinke S, Zylberman V, Vega DR, Guimaraes BG, Braden BC, Goldbaum FA. *J Mol Biol*. Oct 14;353(1):124-37. **2005**.

"Multiple display of a protein domain on a bacterial polymeric scaffold".

Craig PO, Berguer PM, Ainciart N, Zylberman V, Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Bulloj A, Boccaccio GL, Goldbaum FA. *Proteins*. Dec1;61(4):1089-100. **2005**.

"Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides".

Diego A. Laplagne, V. Zylberman, N. Ainciart, M. W. Steward, E. Scitutto, C. A. Fossati and F. A. Goldbaum. *Proteins*. Dec 1;57(4):820-8. **2004**.

"High Order Quaternary Arrangement Confers Increased Structural Stability to *Brucella* spp. lumazine synthase".

Zylberman Vanesa; Craig Patricio O.; Klinke Sebastián; Braden Bradford C.; Cauerhff Ana and Goldbaum Fernando A. *J. Biol. Chem*, Feb 27;279(9):8093-101. **2004**.

---

<b>Introducción</b>	1
Clasificación del género <i>Brucella spp.</i>	1
La brucelosis.	3
Establecimiento del nicho replicativo de <i>Brucella spp.</i>	4
Factores de virulencia de <i>Brucella spp.</i>	7
Vacunas contra la brucelosis.	7
El antígeno de 18 kDa.	9
Biosíntesis de riboflavina.	10
Divergencia estructural de las LS.	12
Características estructurales de P18.	14
Inmunogenicidad de P18.	16
Utilización de P18 como carrier inmunológico.	17
<b>Capítulo I: “Caracterización estructural de una proteína antigénica de <i>Brucella abortus</i>”</b>	
<b>Parte A.</b>	20
Objetivos	21
Obtención de P18 y características del estado nativo.	23
Estabilidad termodinámica de P18.	28
I). Urea.	28
II). Cloruro de guanidinio.	31
Estabilidad termodinámica de P18 medida por desnaturalización química.	37
III). pH.	38
IV). Estabilidad térmica de P18.	41
Estudios cristalográficos de P18.	43
Obtención de quimeras mixtas según el modelo de desplegamiento de P18.	47
<b>Parte B.</b>	52
Objetivos	53

---

I). Mutantes de estabilidad conformacional reducida.	55
Obtención y caracterización de mutantes de interfaz de contacto.	55
Estabilidad conformacional de las mutantes de P18.	58
II). Mutantes de triptofano.	65
Obtención de P18-W22A-F121W y P18-W22A-F130W.	65
Estudios fluorimétricos y de DC de W22A-F121W y P18-W22A-F121W.	67
Estabilidad termodinámica de P18-W22A-F130W.	70
Desnaturalización térmica de P18-W22A-F121W y P18-W22A-F130W.	72
<b>Capítulo II. “Actividad de lumazina sintetasa en <i>Brucella abortus</i>: Evolución de la familia de proteínas”</b>	
<b><i>Parte A.</i></b>	<b>75</b>
Objetivos	
Organización genómica de los genes ribH de <i>B. abortus</i> .	77
Clonado y caracterización estructural de RibH1 de <i>B. abortus</i> .	82
Detección de RibH1 en extractos de <i>B. abortus</i> .	84
Estudios enzimáticos de RibH1 y RibH2 de <i>B. abortus</i> .	86
Bases estructurales de la actividad residual de LS en RibH2 de <i>B. abortus</i> .	89
Evolución de la vía biosintética de la riboflavina.	92
<b><i>Parte B.</i></b>	<b>97</b>
Objetivos	98
Clonado y caracterización de RibH1 y RibH2 de <i>M. loti</i> .	99
Caracterización bioquímica de la unión de RibH2 de <i>B. abortus</i> a diferentes moléculas.	102
<b>Discusión general</b>	<b>112</b>
<b>Conclusiones generales</b>	<b>125</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>128</b>
<b>Referencias</b>	<b>148</b>



### **Clasificación del género *Brucella* spp.**

*Brucella* spp. son bacterias gram-negativas que pertenecen a la clase  $\alpha 2$  de las proteobacterias heterotróficas filogenéticamente relacionadas a patógenos de plantas y simbioses como *Rhizobium* y *Agrobacterium*, a parásitos intracelulares de animales como *Rickettsia* y *Bartonella* y a bacterias de vida libre como *Ochrobactrum* y *Caulobacter* (De Ley 1987; Moreno 1990; Velasco 1998; Ugalde 1999) (Tabla 1). Mediante técnicas de biología molecular (hibridación ADN-ADN) se ha observado que existe una homología a nivel nucleotídico mayor del 95% entre los miembros pertenecientes a *Brucella* spp. Por este motivo se ha propuesto considerar a *Brucella* spp como un género monoespecífico (Verger 1985). Sin embargo esta nomenclatura no fue ampliamente utilizada, como sí lo fue la cual divide al género en especies a su vez subdivididas en biotipos (biovars) (Corbel 1984; Moreno 2002a). Esta división está basada principalmente en las características metabólicas, patogenicidad y preferencia de huésped de cada una (Corbel 1984; Moreno 2002a). Las especies conocidas hasta el momento son: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*. Recientemente se aislaron y caracterizaron algunas especies de una variedad de animales marinos, los cuales difieren en términos de fenotipo y características moleculares de las seis especies de *Brucella* spp. reconocidas y reciben el nombre (aun no oficial) de *B. pinnipediae* y *B. cetaceae* (Ewalt 1994; Foster 1996; Cloeckert 2001). En los últimos años (2002-2005) se obtuvieron las secuencias genómicas completas de *B. suis*, *B. melitensis* y *B. abortus* (DeVecchio 2002; Paulsen 2002; Chain 2005; Halling 2005) pudiéndose confirmar la alta identidad existente al nivel de secuencia nucleotídica en la mayoría de los genes (100% identidad en 90% de los genes) y también la conservación del orden de los mismos. *Brucella* spp. posee dos cromosomas circulares cuyos tamaños en promedio son: 2.12 Mb (cromosoma I) y 1.18Mb (cromosoma II), y no presenta plásmidos (Tabla 2). El contenido de G+C de sus dos cromosomas es prácticamente el mismo (57%), también poseen la misma proporción de secuencias codificantes (ORF) en relación con el tamaño del cromosoma, así como una cantidad similar de genes "housekeeping". Estas características dan a suponer que ambos cromosomas poseen una larga coexistencia evolutiva (Moreno 2002a). Como excepción, el biotipo 3 de *B. suis* posee un único cromosoma de 3,1 Mb (Tabla 2) (Jumas-Bilak 1998a). Al igual que *Brucella* spp., varios organismos pertenecientes a las  $\alpha$ -proteobacteria presentan una organización genómica multipartita (Tabla 1).

El género más cercano evolutivamente a *Brucella* spp. es *Ochrobactrum* (Jumas-Bilak 1998b), el cual también posee dos cromosomas, sugiriendo que el antecesor de estos dos géneros poseía dos megareplicones y probablemente plásmidos (Moreno 1998). Algunos autores especulan que el cromosoma menor

Bacteria	Plásmido	Cromosoma I (Mb)	Cromosoma II (Mb)	G + C (%)	Hábitat y huésped preferencial
<i>Rickettsia prowazekii</i>	–	1,11	-	29	Patógeno intracelular de humanos
<i>Rickettsia conorii</i>	–	1,27	-	33	Patógeno intracelular de perros
<i>Rickettsia typhi</i>	–	1,40	-	29	Patógeno intracelular de ratas
<i>Bartonella quintana</i>	–	1,60	-	39	Patógeno pericelular de humanos
<i>Bartonella henselae</i>	–	1,90	-	41	Patógeno intracelular de gatos
<i>Brucella suis</i>	–	1,85	1,35	57	Patógeno intracelular de cerdos
<i>Brucella abortus</i>	–	2,12	1,17	57	Patógeno intracelular del bovino
<i>Brucella melitensis</i>	–	2,12	1,18	57	Patógeno intracelular de ovinos y caprinos
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	+	3,70	-	66	Pato-organotrofos acuáticos y de vida libre
<i>Sphingomonas aromaticivorans</i>	+	3,80	-	64	Vida libre en sedimentos terrestres profundos
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	+	3,05	0,91	65	Pato-organotrofos acuáticos y de vida libre
<i>Caulobacter crescentus</i>	+	4,00	-	67	Vida libre acuática
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	+	4,50	-	65	Vida libre acuática
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	+	3,15	2,15	62	Patógenos de suelo
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	+	5,46	-	65	Patógenos de suelo y acuáticos de vida libre (fotoorganotrofos)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	+	3,65	1,35; 1,68	63	Patógenos de suelo y endosimbiontes de leguminosas
<i>Mesorhizobium loti</i>	+	7,00	-	62	Patógenos de suelo y endosimbiontes de leguminosas

**Tabla 1. Características de algunos miembros pertenecientes a las  $\alpha$ -proteobacterias. Adaptado de (Moreno 2002b).**

	Número y tamaño de cromosomas (Mb)	
<i>B. abortus</i>	2	2,10; 1,15
<i>B. melitensis</i>	2	2,10; 1,15
<i>B. ovis</i>	2	2,10; 1,15
<i>B. suis</i> Biovar 1	2	2,10; 1,15
<i>B. suis</i> Biovar 2	2	1,85; 1,15
<i>B. suis</i> Biovar 3	1	3,10
<i>B. suis</i> Biovar 4	2	1,85; 1,15

**Tabla 2. Número y tamaño de cromosomas en el género *Brucella* spp. Adaptado de (Ugalde 1999).**

de *Brucella/Ochrobactrum* pudo haber evolucionado a partir de un megeplásmido, el cual sufrió múltiples inserciones de los genes “housekeeping” (por ejemplo, por eventos de transposición) los cuales terminaron por convertirlo en cromosoma (Moreno 2002a). Por cierto, algunos clusters de genes como arginina y ornitina ciclodeamidasa y el operón *virB*, localizados en el cromosoma II, son homólogos a los genes encontrados con el mismo orden en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (Moreno 1998).

### **La brucelosis.**

*Brucella* spp. es una bacteria patógena para animales y ocasionalmente para humanos, aunque la infección en humanos no constituye una vía de diseminación de la bacteria. La infección por cualquiera de las especies causa una enfermedad crónica conocida como brucelosis. La brucelosis es una zoonosis, en la que cada una de las especies de *Brucella* spp. está adaptada a la vida intracelular de una variedad de células de mamíferos de manera específica, aunque no exclusiva. *Brucella melitensis* generalmente infecta a ovejas y a cabras y es la especie más virulenta en humanos. *Brucella abortus* es la responsable en mayor medida de la infección bovina y es la especie más diseminada en el mundo. *Brucella suis* fue aislada de cerdos. Estas tres constituyen las especies más patogénicas (Ko 2003; Godfroid 2005). Las especies menos distribuidas son *Brucella ovis* (ovejas), *Brucella canis* (perros), *Brucella neotomae* (ratas silvestres) y *Brucella cetaceae* y *B. pinnipediae* (mamíferos marinos) (Moreno 2002a). La brucelosis está diseminada en todos los continentes, afectando a muchos de los países sub-desarrollados.

Las características principales de la enfermedad en animales infectados son la placentitis y aborto de las hembras preñadas, e infección en el aparato genital de los machos (esterilidad y orquitis), afectando la capacidad reproductiva de los animales (Corbel 1997). Esta enfermedad es responsable de importantes pérdidas económicas en los países afectados, particularmente en América del Sur (en especial Brazil y Argentina), principales países de exportación de productos de origen vacuno (Poester 2002; Samartino 2002).

***Establecimiento del nicho replicativo de Brucella spp.***

*Brucella* invade a células fagocíticas profesionales o no profesionales y se replica dentro de un compartimento con características semejantes al retículo endoplasmático luego de evadir la fusión con el lisosoma (vía endocítica clásica) (Figura 1) (Detilleux 1990a; Detilleux 1990b; Pizarro-Cerda 1998b; Pizarro-Cerda 2000; Celli 2003). En los últimos años se han publicado trabajos en los que se caracterizan algunas de las moléculas claves para la infección, evasión y adquisición del nicho replicativo (Sola-Landa 1998; Comerci 2001; Lopez-Goni 2002; Roop 2002; Ficht 2003; Roop 2004; Arellano-Reynoso 2005). Ciertas evidencias demuestran que existen diferentes mecanismos de entrada de la bacteria a la célula huésped, dependiendo tanto del tipo de célula como de la cepa de *Brucella spp.* (Moreno 2002b). Algunos autores afirman que incluso el destino intracelular de *Brucella spp.* puede variar dependiendo de cual mecanismo de entrada haya sido utilizado (Iñón de Iannino 2004). Los macrófagos unen e internalizan a *Brucella spp.* en un alto grado, probablemente por la naturaleza fagocítica de los mismos (Celli 2003). En estas células los “lipid rafts” parecen proporcionar un puerto de entrada de la bacteria (en condiciones que la misma no está opsonizada). Caso contrario los macrófagos internalizan a la bacteria vía receptores Fc, fibronectina ó complemento. Esta vía de entrada parece afectar negativamente la sobrevivencia del patógeno en la célula huésped (Gross 1998; Gross 2000a). En células epiteliales, *Brucella spp.* interacciona con extensiones celulares y aparentemente la infección ocurre a través de moléculas receptoras en un mecanismo que demanda energía de la célula huésped (Detilleux 1991). Varios estudios mostraron que las “small GTPases” poseen un rol importante durante estos eventos de internalización (Guzman-Verri 2001). Una vez dentro de la célula la bacteria se localiza en el fagosoma temprano y comienza un proceso de escape de la vía endocítica clásica (evadiendo la fusión con el endosoma tardío y los lisosomas). Sólo una pequeña parte de las bacterias que son internalizadas son capaces de redireccionar el tráfico intracelular hacia el nicho final, mientras que la gran mayoría son destruidas dentro del fagolisosoma (Gorvel 2002). Aquellas bacterias que logran evadir eficientemente la fusión con el lisosoma, finalmente alcanzan su nicho replicativo dentro de un compartimento semejante al retículo endoplasmático (Figura 2).

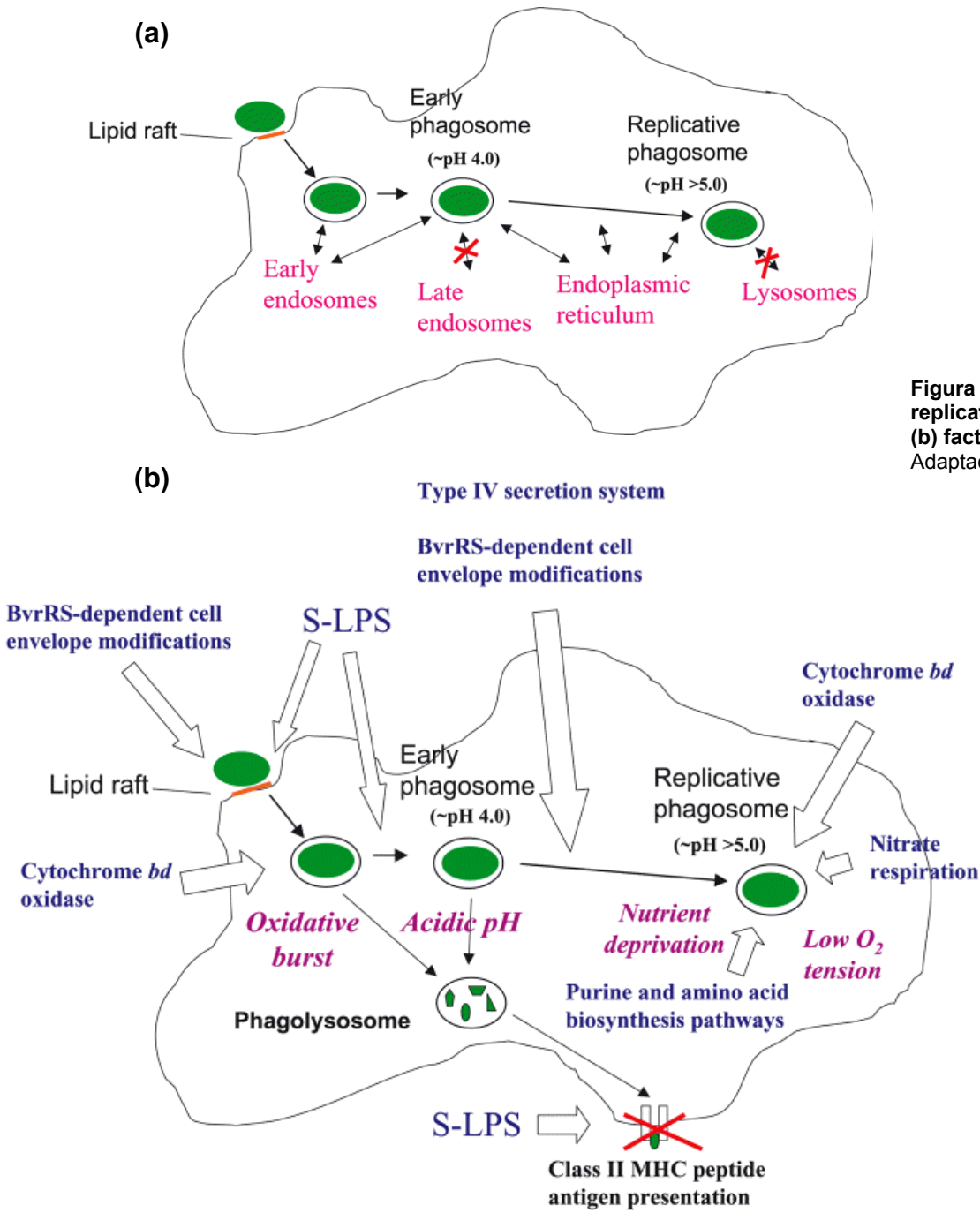
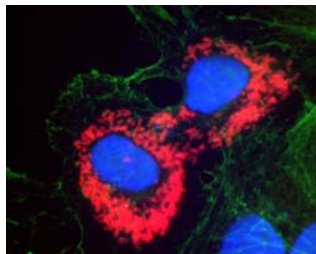


Figura 1. (a) Biogénesis del fagosoma replicativo ("brucellosoma"). (b) factores de virulencia. Adaptado de (Roop 2004).

Se conocen pocas de las moléculas necesarias durante la invasión y el establecimiento del patógeno (Figura 1). Por ejemplo, el sistema de regulación de dos componentes BvrS/BvrR, que funciona como un sensor histidina



**Figura 2.** Inmunofluorescencia de *Brucella spp.* (rojo) dentro de una célula HeLa. En verde se muestran los filamentos de actina y los dos núcleos celulares en azul. La división celular procede pese a que la célula está completamente infectada. Imagen obtenida de (Moreno 2002b) .

quinasa, está involucrado en la internalización de la bacteria y en los eventos tempranos de infección tanto en células fagocíticas profesionales como no (Sola-Landa 1998; Lopez-Goni 2002). Recientemente se encontró que los  $\beta$ -1-2-glucanos cíclicos sintetizados por *Brucella spp.* son utilizados por la bacteria para sortear las defensas del huésped: interactúan con el colesterol y reorganizan los “lipid rafts”, perturbando el tráfico intracelular y contribuyendo a la supervivencia del patógeno (Arellano-Reynoso 2005). Otro complejo proteico, el sistema de secreción tipo IV (VirB) está involucrado en el tráfico intracelular de *Brucella spp.* desde el autofagosoma al compartimiento donde se multiplicara la bacteria (Comerci 2001; Gorvel 2002). Sin embargo se desconoce de qué manera este sistema de secreción controla esta fase de la infección. Probablemente la identificación de los sustratos secretados por dicho sistema permitirá entender mejor la patogenicidad de *Brucella spp.* (Sieira 2004).

Entre 12 y 24 h post infección, *Brucella spp.* crea su propio ambiente dentro del macrófago, denominado por algunos autores “brucelosoma” o “viruloma” (Kohler 2003). Mediante microscopía electrónica se vio que este compartimiento colocaliza con marcadores del retículo endoplasmático como sec61b, calnexina y PDI (Anderson 1986; Pizarro-Cerda 1998a), sin embargo se encuentra separado de los nutrientes citoplasmáticos y del retículo endoplasmático funcional del huésped (Pizarro-Cerda 2000). La bacterias allí comienza su exhaustiva replicación, sin inducir un daño evidente en el huésped ni restringirle sus funciones celulares básicas o inhibir procesos como mitosis (Moreno 2002b; Kohler 2003) (Figura 2).

A partir del análisis de los genes involucrados durante la replicación de *Brucella spp.* en su nicho, se piensa que este compartimiento tiene las siguientes características metabólicas (Figura 1): a) se encuentra privado de aminoácidos y pobre en nutrientes, ya que es requerido el funcionamiento de todas las vías biosintéticas de los mismos, b) su pH es neutro, ya que *Brucella spp.* no es capaz de multiplicarse activamente a pH menores de 5, c) está caracterizado por una baja tensión de oxígeno (*Brucella spp.* tiene la capacidad de adaptarse a ambientes aeróbicos y anaeróbicos) y d) presenta disponibilidad de iones de nitrato, los cuales pueden ser utilizados tanto en respiración anaeróbica o en la asimilación de nitrógeno (Kulakov 1997; Jubier-Maurin 2001; Kohler 2003; Roop 2004).

La comprensión de la patobiología de *Brucella spp.* es relevante no sólo porque se trata de una enfermedad infecciosa grave, que aún no ha sido controlada,

sino también porque servirá para aclarar los aspectos básicos de la replicación de parásitos intracelulares y de los mecanismos de inmunidad celular.

### ***Factores de virulencia de Brucella spp.***

*Brucella* spp. es un patógeno inusual en varios aspectos. En primer lugar la bacteria no posee los factores (ó mecanismos) de virulencia clásicos presentes en otros patógenos, tales como exotoxinas o endotoxinas, citolisinas, fimbrias, variación antigénica, flagelos, formas resistentes, plásmidos, fagos lisogénicos e islas de patogenicidad (Detilleux 1991; Gorvel 2002; Ko 2003; Pappas 2005). En algunos casos se vio que existen las secuencias cromosómicas que codifican para algunas de estas proteínas, indicando que se pueden expresar durante la vida parasitaria aunque bien podrían representar secuencias ancestrales “fósiles” remanentes (Moreno 2002a). En segundo lugar, *Brucella* spp. tiene la capacidad de invadir y persistir en la célula huésped resistiendo los efectos bactericidas de la misma e inhibiendo la muerte celular programada (Gross 2000b). Es por ello que los factores de virulencia reales en *Brucella* spp. no son los clásicos, sino aquellas moléculas que permiten a la bacteria invadir la célula huésped, resistir la lisis intracelular y alcanzar su nicho replicativo dentro del huésped (Roop 2002; Ficht 2003; Roop 2004).

### ***Vacunas contra la brucelosis.***

En los últimos años se han probado numerosas vacunas contra la brucelosis, sin embargo ninguna ha permitido erradicar la enfermedad en animales y prevenir el contagio en humanos. Entre las más estudiadas y utilizadas en el mundo, se encuentra la cepa atenuada S19 de *B. abortus* (Nicoletti 1990), la cual aporta un alto nivel de protección en bovinos, pero presenta algunas desventajas. Por ejemplo, no permite la discriminación entre animales vacunados o infectados (ya que posee similitud antigénica con las cepas más virulentas), no se la puede administrar en hembras preñadas debido a que induce aborto, y en humanos presenta virulencia residual (no pudiéndose la utilizar como vacuna) (Nicoletti 1990; Lopez-Goni 2004). Otras cepas atenuadas estudiadas para su utilización como vacunas son RB51 ó deltapgm de *B. abortus* (Al-Mariri 2001; Schurig 2002; Ugalde 2003). Sin embargo, las vacunas atenuadas han presentados hasta el momento inconvenientes que imposibilitan su uso en humanos. Existen ciertos trabajos

en la literatura en los que se han identificado antígenos obtenidos de *Brucella spp.* cuya administración en forma recombinante junto con adyuvantes podrían representar potenciales candidatos para el desarrollo de vacunas. Entre éstas están: la proteína ribosomal L7/L12 (Oliveira 1996), Cu-Zn superóxido dismutasa (Tabatabai 1994; Onate 2003), la proteína 22,9 kDa (Cespedes 2000), p39 (Al-Mariri 2001), la gliceraldehido deshidrogenasa (Rosinha 2002) y la proteína P18 (Velikovsky 2000; Velikovsky 2002). Alguno de estos antígenos tienen la capacidad de inducir la respuesta de los linfocitos T, activar a los macrófagos e incluso promover la activación de células T CD8 citotóxicas. Sin embargo, estos posibles candidatos recién están empezando a ser investigados en cuanto a su capacidad de generar una respuesta inmune protectora y a ser utilizados como vacunas recombinantes. Por otra parte el desarrollo de vacunas a ADN (en las que se administra por medio de un vector viral el gen que codifica para el antígeno responsable de la estimulación de la respuesta inmune protectora), constituye una herramienta promisoría en el campo de la inmunología (Robinson 1997). Si bien algunas han mostrado éxitos parciales en modelos murinos (Kurar 1997; Al-Mariri 2002; Velikovsky 2002), aún no se ha demostrado que este tipo de metodología pueda ser transferible a animales de campo. Una desventaja observada en varios de estos trabajos es que no se logró obtener altos niveles de inmunidad protectora, probablemente debido a una baja expresión del antígeno dentro de la célula eucariota o bien el silenciamiento de su expresión después de un corto periodo de tiempo (Schurig 2002).

En definitiva, no existe en la actualidad una vacuna protectora contra la brucelosis, suficientemente segura como para ser utilizada en humanos. La prevención de la enfermedad depende principalmente de la erradicación de la misma en animales y una adecuada higiene alimenticia (Schurig 2002; Thakur 2002). Dado el potencial epidemiológico de *Brucella spp.* (la ausencia de vacunas humanas y la eficiencia de contagio por partículas en aerosol), éste patógeno se clasifica como un organismo de nivel 3 de bioseguridad y es considerado como un potencial agente utilizable en armas biológicas (Kaufmann 1997; Moreno 2002b). Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido al desarrollo de una vacuna humana contra la brucelosis como una de las máximas prioridades actuales. Para lograrlo, resulta fundamental tanto descubrir los mecanismos utilizados por este patógeno durante el establecimiento de la infección, así como identificar moléculas ó factores de virulencia implicados en dicho proceso.



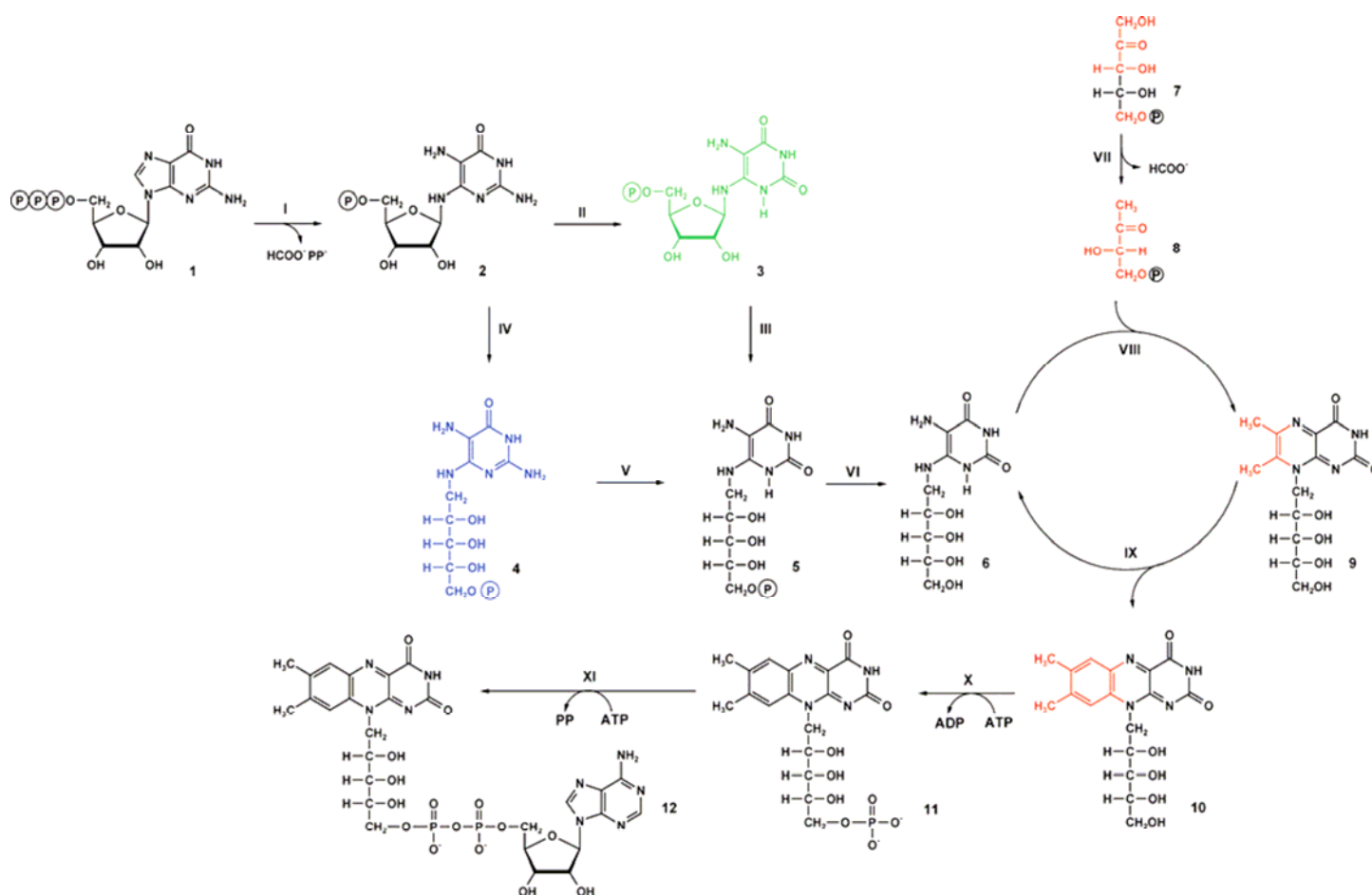
**El antígeno de 18 kDa.**

El requerimiento de nuevos marcadores serológicos de la brucelosis llevó en el año 1992 al grupo dirigido por el Dr. C. A. Fossati, a buscar anticuerpos monoclonales (ACMO) que reconociesen componentes citoplasmáticos de *Brucella spp.* (libres de lipopolisacáridos, LPS), para el desarrollo de ensayos de diagnóstico por ELISA. Para obtenerlos realizaron una fusión de bazo de ratón infectado con *B. ovis* con células del plasmacitoma NSO. La fusión produjo diferentes hibridomas secretores de ACMO anti-proteínas. Entre ellos, encontraron un ACMO (denominado BI24) que reconocía a una proteína cuyo peso molecular (PM) calculado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) era de 18 kDa, y que llamaron P18 (Goldbaum 1993). Este antígeno estaba presente en todas las cepas de *Brucella spp.* analizadas, como por ejemplo, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* y *B. ovis* (Goldbaum 1993). Un ELISA de captura utilizando al anticuerpo BI24 mostró tener utilidad diagnóstica, es decir, es capaz de discriminar entre pacientes que poseían brucelosis activa e inactiva (serológicamente positivos pero sin infección activa). La purificación del antígeno P18 y la obtención de su secuencia aminoacídica, permitió determinar que dicha secuencia era idéntica a la traducción de un gen clonado posteriormente por Hemmen *et al.* (Hemmen 1995) y facilitó el clonado del mismo a partir del ADN cromosómico de *B. abortus* (Goldbaum 1998). Una vez clonado el gen, se logró obtener la proteína recombinante en *E. coli*. Los estudios de similitud de secuencia aminoacídica realizados posteriormente, revelaron que P18 compartía una baja pero significativa homología con la enzima "lumazina sintetasa" de otros organismos (Goldbaum 1999). En estudios iniciales de identificación estructural de P18, se encontró que su PM estimado a partir de una cromatografía de exclusión molecular era de 90 kDa (Goldbaum 1999). El PM calculado de ese modo resultaba compatible con un ordenamiento pentamérico de los monómeros de 18 kDa. Este tipo de estructura cuaternaria se encuentra en otras lumazinas sintetetas provenientes de diferentes organismos. En el mismo trabajo se vio que P18 tenía una actividad de lumazina sintetasa reducida en comparación con enzimas provenientes de diferentes organismos. Sin embargo en estos estudios enzimáticos preliminares no se logró comprender la causa de su baja actividad catalítica.

**Biosíntesis de riboflavina.**

La vitamina B2 ó riboflavina (**10**, Figura 3) es el precursor de la flavina-mononucleótido (FMN) y de la flavina- adenina-dinucleótido (FAD), cofactores esenciales para múltiples y variadas enzimas redox involucradas en numerosos procesos fisiológicos (Massey 2000). Estos cofactores tienen un rol central en el metabolismo aeróbico dado que poseen la capacidad de catalizar la deshidrogenación de dos electrones de numerosos sustratos y también participar en la transferencia de un electrón en varios centros metálicos (gracias a su estado de semiquinona). Debido a eso, frecuentemente forman parte de centros enzimáticos multirredox tales como succinato y NADH deshidrogenada, citocromo P450 y óxido nítrico sintetasa. A las flavinas también se las vincula en el metabolismo anaeróbico. Se sabe que la deficiencia de FMN induce el incremento de los niveles del Citocromo bd, una oxidasa terminal que se activa en condiciones microaerofílicas (Bogachev 1993; Way 1999). Ciertas flavoproteínas están implicadas en procesos de apoptosis celular y regulación del ritmo circadiano (Massey 2000). A su vez, se la vincula en varias reacciones dependientes de luz como fotosíntesis, reparación del daño del ADN y fototropismo en plantas (Massey 2000). La vitamina es biosintetizada en plantas, hongos y bacterias, sin embargo los organismos superiores deben adquirirla de su alimentación ó a partir de la flora intestinal. La ruta biosintética de la riboflavina fue muy estudiada y se detalla en la Figura 3. De manera resumida, comienza con la hidrólisis del fosfato y del pirofosfato inorgánico del GTP (**1**), catalizado por la enzima GTP-ciclohidrolasa II (paso I). El producto 2,5-diamino-6-ribosilamino-4(3H)-pirimidinona 5'-fosfato (**2**), es convertido en 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona 5'-fosfato (**5**) vía 2,5-diamino-6-ribitilamino-4(3H)-pirimidinadiona 5'-fosfato (**4**) en arqueas y hongos o vía 5-amino-6-ribosil amino-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona 5'-fosfato (**3**) en eubacterias y plantas (Figura 3, pasos II y III ó IV y V). La 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona 5'-fosfato (**5**) es desfosforilada mediante un proceso aún desconocido (Figura 1, paso VI). La pirimidina resultante, 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona (**RPD**, **6**) se transforma en 6,7-dimethyl-8-ribitilumazina (**9**) por condensación con 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato (**But-F**, **8**), la cual se obtiene a partir de rearrreglos (químicos o estructurales) de la ribulosa 5-fosfato (**7**).

Finalmente ocurre una dismutación del compuesto **9** obteniéndose la riboflavina (**10**) y regenerando el compuesto **6**. Según la bibliografía, las enzimas involucradas en la biosíntesis de la riboflavina representan potenciales blancos específicos de inhibidores de crecimiento bacteriano, dado que no están presentes en humanos o animales y en la mayoría de los casos son esenciales para el patógeno (Massey 2000; Cushman 2005; Morgunova 2005; Mack 2006). Esta teoría, junto con la necesidad de conocer



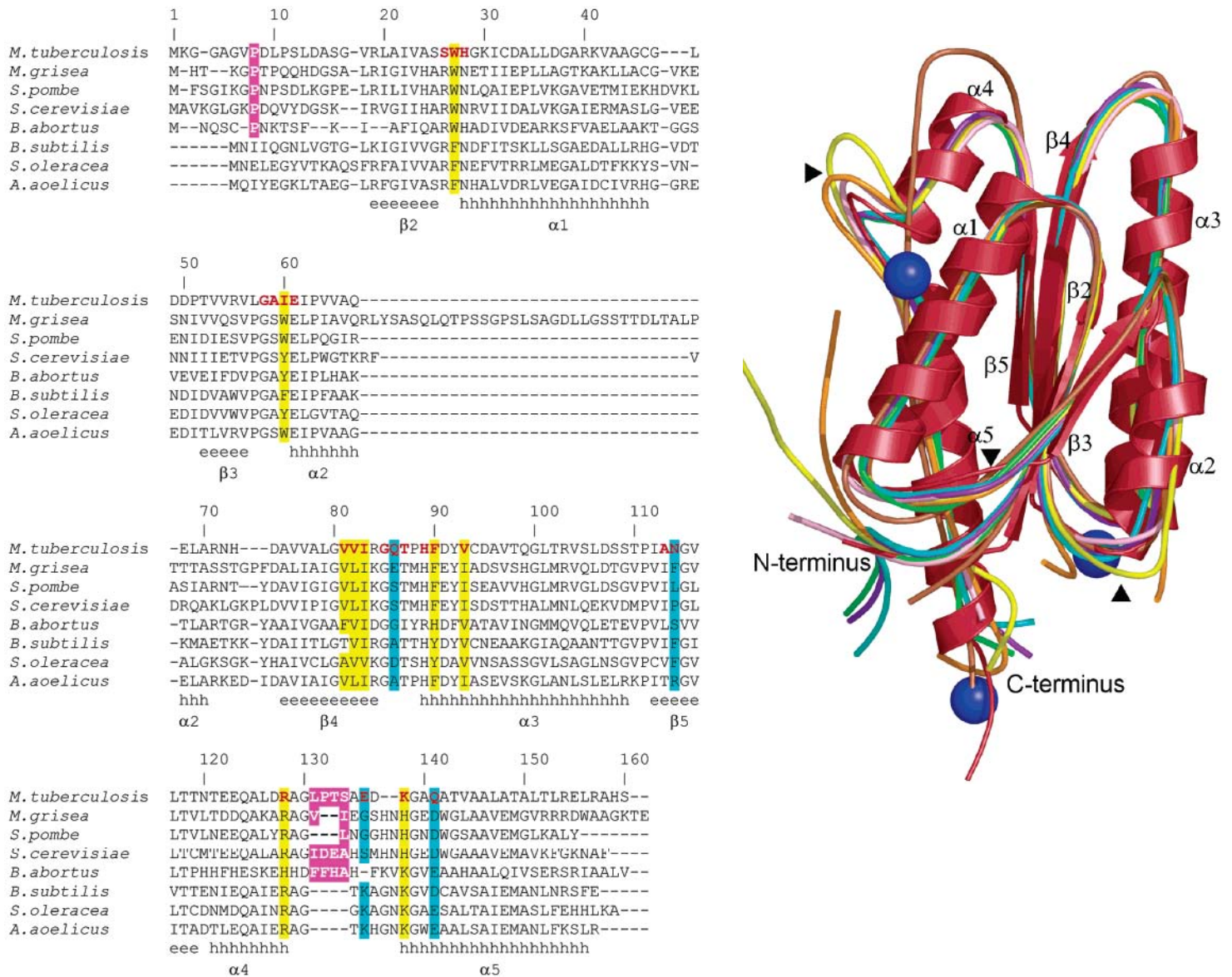
**Figura 3. Biosíntesis de la riboflavina.** Los sustratos/productos de la vía son: GTP (**1**), 2,5-diamino-6-ribosilamino-4(3H)-pirimidinona 5'-fosfato (**2**), 5-amino-6-ribosil amino-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona 5'- fosfato (**3**), 2,5-diamino-6-ribosilamino-4(3H)- pirimidinadiona 5'- fosfato (**4**), 5-amino-6-ribosilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona 5'- fosfato (**5**), 5-amino-6-ribosilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona (**RPD**, **6**), ribulosa 5-fosfato (**7**), 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato (**But-F**, **8**), 6,7-dimethyl-8-ribitilumazina (**9**) y riboflavina (**10**). Las enzimas involucradas: (**paso I**) GTP-ciclohidrolasa II; (**paso II**) 2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinona 5'-fosfato deaminasa; (**paso III**), 5-amino-6-ribosilamino-2,4 (1H,3H)-pirimidinedione 5'-fosfato reductase; (paso IV) 2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinone 5'-fosfato reductasa; (**paso V**), 2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinadiona 5'-fosfato deaminasa; (**paso VI**) hipotética fosfatasa; (**paso VII**) 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintetasa; (**paso VIII**) 6,7-dimethyl-8-ribitilumazina sintetasa; (**paso IX**) riboflavina sintetasa; (**paso X**) riboflavina quinasa; (**paso XI**), FAD sintetasa.

en detalle los mecanismos de síntesis de cofactores importantes, motivó el estudio de las enzimas involucradas en esta ruta metabólica con un abordaje tanto enzimático como estructural.

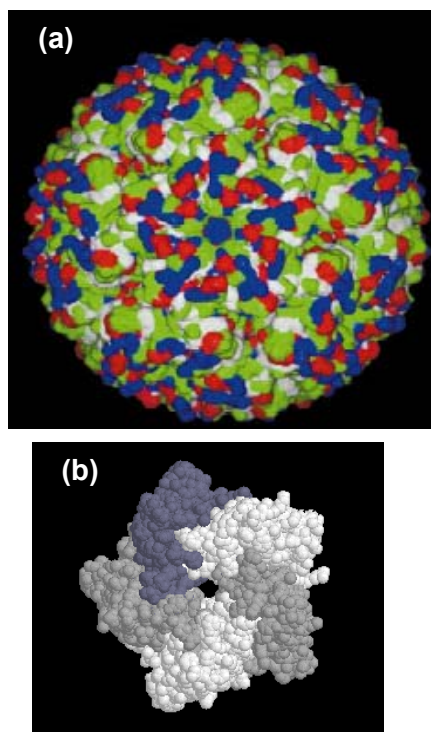
Muchos de estos trabajos se centraron en el estudio particular de las enzimas que catalizan los últimos dos pasos de esta ruta metabólica: la 6,7-dimethyl-8-ribitilumazina sintetasa (LS ó lumazina sintetasa, VIII) y la riboflavina sintetasa (RB, IX). Hasta el momento se conoce la estructura, obtenida por cristalografía de rayos X, de nueve LS las cuales provienen de eubacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus* y *Aquifex aeolicus*), arqueas (*Methanococcus jannaschii*), hongos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Magnaporthe grisea*) y plantas (espinaca) (Ladenstein 1988; Goldbaum 1993; Ladenstein 1994; Mortl 1996; Persson 1999; Meining 2000; Zhang 2001; Fischer 2002; Gerhardt 2002; Haase 2003; Zhang 2003; Koch 2004; Morgunova 2005). Pese al gran conocimiento general que se tiene hoy en día de las LS y al descubrimiento de inhibidores específicos para la misma, los resultados de la utilización de los mismos en quimioterapias aún son controversiales. Sin embargo, los estudios estructurales de las LS revelaron una característica llamativa de esta enzima: la divergencia estructural existente en los diversos organismos.

### ***Divergencia estructural de las LS.***

Las cadenas polipeptídicas de LS conocidas hasta el momento, provenientes de distintos organismos, se pliegan presentando una estructura terciaria altamente conservada a pesar de la relativamente baja homología de secuencia primaria existente entre las mismas (Figura 4). Sin embargo, la disposición espacial de los monómeros, o dicho de otra forma, la estructura cuaternaria de las distintas LS presenta cierta diversidad (Figura 5). Los grupos de trabajo encabezados por Bacher, A. , Ladenstein, R. y Fischer, M., basándose en un análisis estructural, propusieron la existencia de dos clases de LS: las LS icosaédricas y las LS pentaméricas (Figura 5). En ambos casos las cadenas polipeptídicas que conforman dichas enzimas se disponen formando



**Figura 4. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de diferentes LS y superposición de los monómeros.** A la izquierda se muestra el alineamiento de ocho LS diferentes de estructura conocida. En rojo se señalan los residuos que forman parte del sitio activo. En magenta, la inserción presente en las LS que no son icosahédricas. Abajo se muestran los elementos de estructura secundaria. A la derecha se muestra una representación del plegamiento de cada uno de los monómeros de LS superpuestos. *M. tuberculosis* (MbtLS) (rojo), *S. pombe* (rosa), *S. cerevisiae* (amarillo), *B. abortus* (marrón), *M. grisea* (naranja), *B. subtilis* (violeta), *A. aeolicus* (cian), y *Sp. oleracea* (verde). Los elementos de estructura secundaria fueron asignados respecto a MbtLS, la estructura e identificaciones acorde a la LS de *B. subtilis*. Figura adaptada de (Morgunova 2005).



**Figura 5.** Diferentes tipos de orden cuaternario encontrados en las proteínas pertenecientes a la familia de LS. **(a)** LS icosaédrica, **(b)** LS pentamérica. (Persson 1999)

homopentámeros con el sitio catalítico comprendido invariablemente en la interfaz de contacto entre sus monómeros. Por ejemplo, la LS de *B.subtilis* es una proteína de tipo icosaédrica (Figura 5a), en la que 12 homopentámeros se asocian formando una cápside de simetría icosaédrica, en total 60 monómeros constituyen la partícula formando 60 sitios catalíticos. Dentro de la cápside se asocian tres subunidades de la enzima riboflavina sintetasa (Ladenstein 1988; Ladenstein 1994; Ritsert 1995), conformando el complejo enzimático LS/RB sintetasa. Otras LS con estructura similar se encuentran en *E. coli*, *A. aeolicus* y *S. oleracea* (Mortl 1996; Persson 1999; Zhang 2001), con la diferencia que en ellas la asociación entre LS y RB no está presente. La segunda clase de LS, fue encontrada en *M. grisea*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, (Persson 1999; Meining 2000; Fischer 2002) y más recientemente en *M. tuberculosis* (Morgunova 2005). Se trata de partículas homopentaméricas equivalentes a las partículas que conforman la cápside, sólo que éstas no se asocian en forma icosaédrica sino que permanecen como pentámeros aislados (Figura 5b). En el intento de comprender las ventajas adaptativas de una u otra clase de LS, se propuso para la LS icosaédrica proveniente de *B.subtilis* un mecanismo catalítico llamado “channeling” de sustrato (Kis 1995a; Spivey 1999). En dicho trabajo, Kis *et al.* postuló que el producto naciente de la LS es rápidamente utilizado por la RB (que en esta bacteria forman el complejo LS/RB) aumentando la velocidad de la reacción, ya que se crea una concentración local mayor de productos y reactivos, y un microambiente que favorece la estabilización de los mismos. Por consecuencia, este complejo favorecería la actividad catalítica. Sin embargo, en el trabajo de Kis *et al.* quedaron establecidas ciertas dudas sobre la validez de tal mecanismo enzimático; si bien fue demostrado para otras enzimas (como la triptofano sintetasa, (Ovadi 1991)), la existencia del mismo en las LS de tipo icosaédricas no fue probada hasta la fecha.

Por otro lado, desde hace tiempo se intenta encontrar cuáles son los patrones estructurales determinantes para la formación de una u otra clase de LS, tema que persiste aún en estudio y discusión (Mortl 1996; Persson 1999; Braden 2000; Meining 2000; Zhang 2001; Gerhardt 2002; Haase 2003).

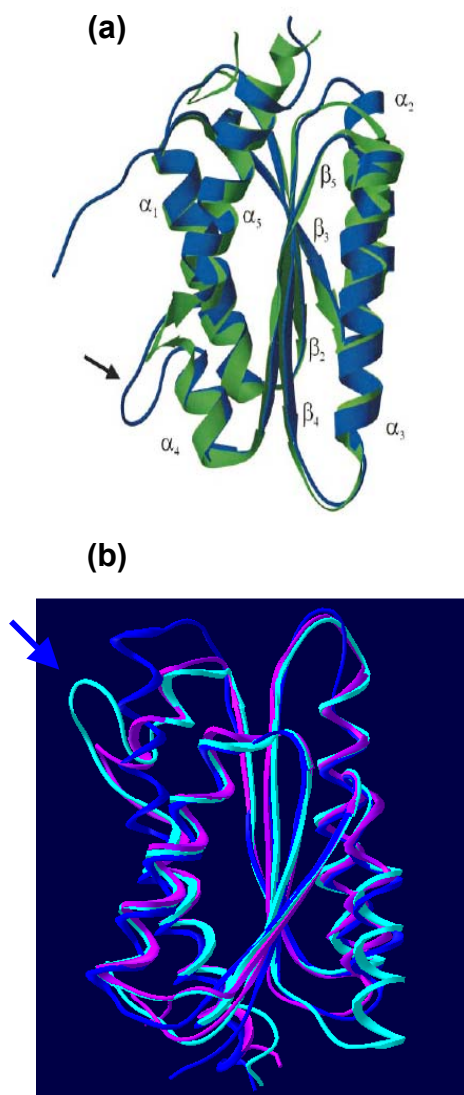
### **Características estructurales de P18.**

En el trabajo realizado por Braden *et al.* (Braden 2000) se logró cristalizar y obtener patrones de difracción de P18 con una resolución de 2,7 Å.

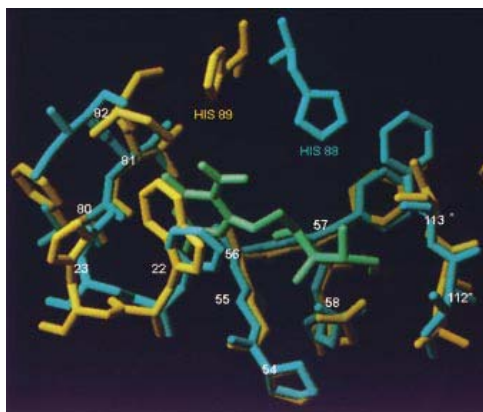
Este trabajo permitió caracterizar estructuralmente al pentámero y a las interfases de contacto existentes entre los monómeros y comparar la estructura de P18 con una lumazina sintetasa ya caracterizada como la de *B.subtilis*. En este estudio se encontraron varias características sobresalientes de P18. En primer lugar, se vio que P18 no formaba una partícula icosaédrica como sí lo hacía la LS de *B.subtilis*. En este sentido los autores del trabajo propusieron la existencia de una secuencia altamente conservada en todas las LS icosaédricas, presente en una región cercana al C-terminal, comprendida entre las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$  y compuesta por cinco residuos (GT(G)KAG). Estos residuos están involucrados en la estabilización de los contactos pentámero-pentámero durante la formación de la cápside. Se propuso que aquellas proteínas que no contuviesen tal secuencia serían incapaces de formar una estructura icosaédrica, permaneciendo los monómeros de LS unidos en forma pentamérica y sin un mayor grado de polimerización (como en el caso de las LS pentaméricas). Sumado a esto, la LS pentamérica de *S. cerevisiae*, (Meining 2000), presentaba en la misma región una inserción de 4 residuos, que aportaban un bucle de mayor longitud entre las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$  (Figura 6a), dificultando la asociación entre los pentámeros.

La particularidad que se observó en P18 fue que si bien presentaba una inserción en aquella región del monómero, ésta no formaba un bucle (como ocurría en sus homólogas pentaméricas) sino que los residuos que formaban parte de dicha inserción contribuían al establecimiento de una hélice  $\alpha_4$ - $\alpha_5$  continua, o dicho de otro modo una hélice  $\alpha_4$  extendida (Figura 6b). En la Figura 6b se puede observar que dicha región de P18 resultó ser no superponible con la de una LS pentamérica ó icosaédrica.

Por otro lado, se analizó la estructura terciaria de los sitios activos de P18 (Braden 2000). Se encontró que la proteína de *B. abortus* tenía altamente conservado el sitio de unión del sustrato RPD (compuesto 6), ya que este sitio se superponía perfectamente bien con el de *B.subtilis* (Figura 7). Sin embargo, P18 no tenía conservado el residuo His 88, el cual se encontraba presente en todas las LS conocidas hasta ese momento. Se conocía que éste residuo cumplía un rol catalítico importante, ya que actuaba como el aceptor de un protón durante la remoción del fosfato de la But-F (segundo sustrato, compuesto 8). La Figura 7 muestra una comparación entre el sitio catalítico de la LS de *B. subtilis* y el presente en P18. Notablemente, en P18 la His 88 se encuentra desplazada una posición (His 89) y a su vez adquiriendo una orientación



**Figure 6.** (a) Superposición del monómero de la LS tipo icosaédrica de *B. subtilis* (verde) con la LS pentamérica de *S. cerevisiae* enzyme (azul). Notar la diferencia en el bucle entre las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$  (flecha) (Meining 2000). (b) Superposición del monómero de P18 (azul) con el de una LS icosaédrica (violeta) ó pentamérica (celeste). La flecha indica la región no superponible. Notar que P18 en dicha región presenta una hélice extendida.



**Figura 7. Superposición de los sitios de unión de los sustratos de la LS.** LS de *B. subtilis* (celeste) y P18 (amarillo). Notar la orientación de la His 89 en P18. En verde se muestra al análogo de sustrato RPD: (5-nitro-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinediona, **NRP**). Los residuos 112\* y 113\* están formando parte del monómero vecino (Ritsert 1995).

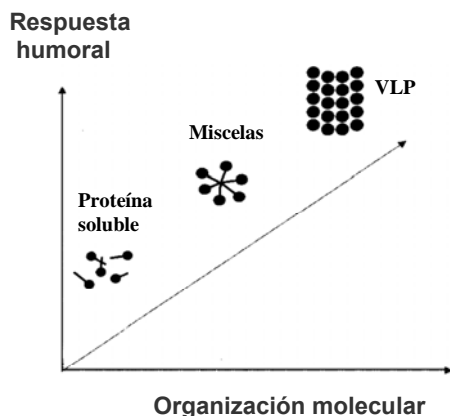
diferente, inadecuada para tal función catalítica. En el trabajo descrito quedaron planteadas las diferencias estructurales de P18 en comparación con las LS tanto icosaédricas como pentaméricas. Por otro lado, el impacto de estas particularidades en la actividad biológica de P18 no pudo ser elucidado, lo cual abrió nuevos interrogantes que fueron esclarecidos a lo largo de mi trabajo de tesis.

### ***Inmunogenicidad de P18.***

Varios trabajos demostraron que P18 es un inmunógeno potente (Goldbaum 1999; Baldi 2000; Velikovskiy 2000; Velikovskiy 2002; Berguer 2006). Sueros de animales infectados con las distintas especies de *Brucella* presentan una alta reactividad contra la proteína (Goldbaum 1993; Goldbaum 1999; Baldi 2000). La inmunización experimental (en modelo murino) con P18 recombinante produce una alta y perdurable respuesta inmune humoral, aún cuando se inmuniza en ausencia de adyuvantes. La utilización de adyuvantes puede modular al sistema inmune de manera de inducir una respuesta celular. Por ejemplo, la utilización del adyuvante MPL/TDM resulta en una fuerte respuesta celular antígeno específica (Baldi 2000; Velikovskiy 2000). También fue ensayada la inmunización con ADN, utilizando un vector viral portador del gen que codifica para P18. Los ratones inyectados desarrollaron una fuerte respuesta humoral y celular específicas, y resultaron parcialmente protegidos contra la infección experimental con *B. abortus* (Velikovskiy 2002). Recientemente se encontró que P18 es capaz de activar a células dendríticas (CD), tanto en modelos de exposición antígeno-célula *in vitro* como al inmunizar a ratones con bajas dosis de la proteína recombinante (Berguer 2006). Las CD son células presentadoras de antígeno especializadas fundamentales durante la iniciación y regulación de la respuesta inmune. La activación de CD mediada por P18, ocurre a través del receptor TLR4, el cual se postuló que está involucrado tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa (Berguer 2006). En este último sentido, la vía de señalización en la que los TLR4 están involucrados deriva finalmente en la activación, expansión y diferenciación de células T (Barton 2002; Underhill 2002).

Por otro lado varios trabajos sugieren la existencia de una relación entre la estructura de un antígeno y su inmunogenicidad (Dintzis 1976; Man 1989; Bachmann 1999; St Clair 1999; Korematsu 2000; Nieba 2000; Fraser 2003). Los estudios de Bachmann M. F., y Zinkernagel R. M., demostraron que la proteína





**Figura 8. Correlación entre el grado de repetitividad, organización del antígeno y la eficiencia de inducción de respuesta B**

VSV-G: Glicoproteína de la envoltura del virus de estomatitis vesicular (Nieba 2000).

de cápside viral purificada del virus de la estomatitis (VSV-G) puede ordenarse de tres maneras diferentes: 1) formando una envoltura viral hueca cuasi cristalina de aproximadamente 22 nm (VLPs); 2) micelas de estructura variable o 3) como monómeros solubles (Figura 8) (Bachmann 1993; Bachmann 1995; Nieba 2000). Los autores demostraron que la repetitividad y ordenamiento de los epitopes es fundamental para determinar el grado de respuesta inmunológica: cuanto mayor es el grado de organización estructural y repetitividad del epítope, mayor es la respuesta humoral inducida (Figura 8). Estos estudios conformaron la base para el desarrollo de vacunas acelulares con proteínas de cápside viral. Se ha postulado que el orden molecular y repetitividad de un antígeno afecta su inmunogenicidad en al menos tres formas relacionadas entre sí. Primero, por la alta capacidad de estas estructuras de promover el entrecruzamiento de receptores y la transducción de señales mediada por los receptores de las células B (Bachmann 1995; Sulzer 1997). Segundo, una proteína con estructura polimérica ordenada generalmente implica una mayor estabilidad molecular del polímero y mayor tiempo de vida media del antígeno. Esto probablemente aumente la eficacia de estimulación de los linfocitos B específicos. En tercer lugar, la capacidad de las partículas poliméricas de inducir fuertes respuestas inmunológicas sugiere que éstas pueden impactar células presentadoras de antígeno, particularmente a las CD a través de sus receptores (como los TLR), los cuales reconocen patrones estructurales definidos (Underhill 2002).

En este sentido las evidencias experimentales indican que la alta inmunogenicidad de P18 estaría relacionada a su organización polimérica. Si bien se demostró la capacidad de P18 de inducir una alta respuesta inmunológica (tanto humoral como celular) y que al menos parte de esta respuesta se debe a que es capaz de activar a las CD, no se conoce aún de qué manera cambios en la estabilidad global de la proteína modifican sus propiedades inmunológicas. Dicho de otra manera, queda aún por explorar la relación estructura/estabilidad/inmunogenicidad de P18.

#### ***Utilización de P18 como carrier inmunológico.***

Los datos cristalográficos de P18 mostraron que los 10 residuos del extremo amino terminal de cada cadena polipeptídica no presentan densidad electrónica definida, indicando una alta flexibilidad en esta región y sugiriendo que estos

residuos no aportan contactos que contribuyan a la estabilización de la estructura del estado nativo (Braden 2000; Meining 2000). Por otro lado, las propiedades estructurales e inmunológicas de P18 la convierten en una herramienta útil para su uso como carrier de péptidos foráneos, contra los cuales se quiera obtener anticuerpos específicos. Dadas las características de su extremo amino terminal, éste sería un buen sitio para la inserción de los mismos. Los trabajos realizados en el laboratorio en los últimos años demostraron que es posible obtener proteínas quimeras, las cuales poseen el extremo amino terminal reemplazado por algún péptido de interés, sin modificar la estabilidad estructural de P18 (Laplagne 2004; Craig 2005). En estos trabajos se demostró que P18 posee propiedades adyuvantes cuando un antígeno foráneo, o bien un dominio proteico foráneo, es insertado en la porción amino terminal. La mezcla de los péptidos (o dominios proteicos) y P18 por separado no producen dicho efecto.

Los estudios funcionales y estructurales presentados hasta aquí proporcionan un conocimiento básico sobre P18. Sin embargo resta profundizar en algunos aspectos importantes, tales como la estructura cuaternaria de P18, la estabilidad conformacional de la molécula, las bases estructurales de su función catalítica y la relación estructura/inmunogenicidad. Estos conocimientos podrán ser aplicados al desarrollo de vacunas acelulares utilizando a P18 como plataforma ó carrier de inmunógenos, y en una posible utilización de P18 como blanco terapéutico.

## Capítulo I:

“Caracterización estructural de una  
proteína antigénica de *Brucella*  
*abortus*”

## **Parte A**

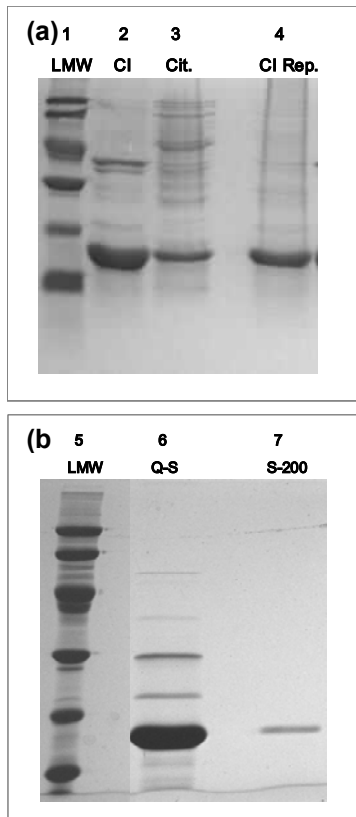
# **“Estado nativo y mecanismo de desplegamiento de P18”**

Los estudios estructurales preliminares de P18 determinaron que el PM de la misma en solución era de 90 kDa, compatible con una asociación pentamérica de sus monómeros. Estas determinaciones fueron realizadas utilizando cromatografía de exclusión molecular, técnica que ocasionalmente puede resultar inapropiada para tal propósito. Sumado a ésto, los estudios cristalográficos descartaron la posibilidad de que P18 formase una partícula icosaédrica, y a su vez revelaron ciertas características estructurales de la proteína que la convertían en una LS singular. Debido a que hasta ese momento solamente se encontraban descritas las LS de tipo icosaédrico o pentamérico, se clasificó a P18 como una partícula pentamérica. No obstante existían numerosas razones por las que parecía necesario realizar un estudio estructural más detallado de la molécula: 1). P18 presentaba una hélice continua  $\alpha 4\alpha 5$ , inexistente en las proteínas homólogas. Esta región conformaba un determinante estructural de todas las LS, por lo que la diferencia encontrada en P18 merecía ser estudiada. 2). P18 presentaba algunas variaciones importantes en los sitios catalíticos, conservados en el resto de las LS. Por ejemplo no poseía la His en la posición 88 y existía una His en vez de arginina en la posición 127. Los resultados enzimáticos preliminares demostraron que P18 catalizaba la formación de 6,7-dimethyl-8-ribitillumazina de un modo notablemente menos eficiente que lo reportado para otras LS. Sin embargo no existían evidencias experimentales que relacionasen las particularidades de P18 con su actividad catalítica. 3). P18 es una proteína altamente inmunogénica. Su estructura polimérica la convertía en un sistema modelo para el estudio de la relación entre estructura ó estabilidad molecular e inmunogenicidad. 4). Dado que era posible utilizar a P18 como portadora de péptidos foráneos en su extremo amino terminal y de ese modo obtener una respuesta inmune específica contra dichos péptidos, ésta podría ser utilizada en la formulación de vacunas acelulares.

Por lo tanto, las particularidades inmunológicas y los interrogantes estructurales y funcionales suscitados, resaltaban la importancia de ampliar los conocimientos generales sobre P18. La primera parte de mi tesis consistió en la caracterización de P18 desde un enfoque principalmente biofísico.

*Los objetivos puntuales de esta parte de la tesis son:*

- ***Determinar el estado de polimerización de P18.*** Para ello se utilizarán diversas técnicas espectroscópicas (por ejemplo Static Light Scattering, Dicroísmo circular, Fluorescencia intrínseca), y se realizará una reevaluación de la estructura cristalográfica de la misma.
- ***Estudiar la estabilidad conformacional de P18.*** En este sentido, se quiere determinar el mecanismo termodinámico de desplegamiento de P18. En este estudio se intentará desplegar a la proteína mediante diferentes agentes desnaturalizantes, caracterizar intermediarios de plegamiento y medir los parámetros termodinámicos asociados a dicho fenómeno. A su vez nos proponemos realizar un estudio sobre la estabilidad térmica de P18.
- ***Desarrollar un método para la obtención de quimeras de P18 portadoras de péptidos foráneos.*** Se tomará como base el mecanismo de desplegamiento de P18 para desarrollar una estrategia racional para la obtención de este tipo de moléculas.



**Figura 9. Purificación de P18.**

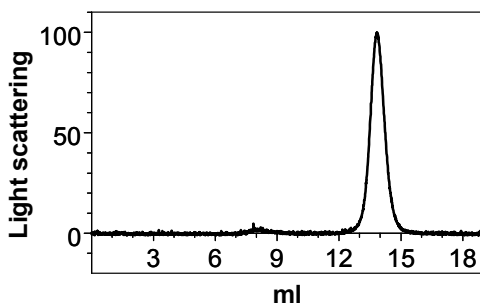
**(a)** SDS-PAGE al 15% en el que se sembraron las fracciones correspondientes a los cuerpos de inclusión (calle 2), citoplasma (calle 3) o fracción soluble del repliegado de los cuerpos de inclusión (calle 4), todas provenientes de un ensayo de sobreexpresión de P18. **(b)** SDS-PAGE en el que se corrieron muestras de los diferentes pasos de purificación de P18, realizada a partir de los cuerpos de inclusión repliegados. Pico mayoritario de una corrida de mono-Q eluido al 30% de buffer B (calle 6). Esta muestra fue posteriormente inyectada en una columna S-200 (tamiz molecular) en la cual se colectó el pico proteico mayoritario (calle 7). Las calles 1 y 5 de los geles corresponden a los marcadores de peso molecular. Notar que P18 corrió entre los marcadores de 14 y 20 kDa, compatible con el PM de un monómero de P18 (18 kDa).

### **Obtención de P18 y características del estado nativo.**

Inicialmente se realizó la puesta a punto de la expresión y purificación de P18. Brevemente, se utilizó un plásmido pET11a-P18, el cual poseía el gen que codifica para la proteína P18, previamente clonado a partir del genoma de *Brucella abortus* (Goldbaum 1998). Este vector fue utilizado para transformar células *E. coli* competentes. Se trabajó con dos tiempos diferentes de inducción de las células transformadas. A tiempos cortos (4 h), se logró una mejor sobreexpresión de la proteína en el citoplasma bacteriano, mientras que tiempos largos de inducción aumentaron la proporción de P18 en los cuerpos de inclusión (CI) de la bacteria (Figura 9a). El material proteico obtenido a partir de los CI fue solubilizado con 8M urea durante 48 h, luego sometido a una diálisis y centrifugado a fin de remover agregados insolubles. Posteriormente la muestra (proveniente del citoplasma ó de los CI) fue sometida a dos pasos de purificación (Figura 9b): primero un intercambio iónico (mono-Q) y luego un tamiz molecular (S-200). Finalmente se obtuvo a P18 recombinante altamente purificada con un rendimiento aproximado de 45 mg por litro de cultivo. P18 posee un residuo de cisteína en el extremo amino terminal (C7) el cual, como se nombró en la Introducción, permanece expuesto al solvente. A causa de esto, la muestra proteica tiende a agregar (por la formación de múltiples puentes disulfuro), lo cual se revierte con el añadido de algún agente reductor (como por ejemplo, 1 mM DTT). Para evitar conservar a la muestra proteica en presencia de reductor, una vez concluida la purificación de P18, se trató con Iodoacetamida a la proteína, bloqueando de esta manera su cisteína terminal. Caso contrario se trabajó con el agregado de 1 mM DTT.

El conocimiento del PM de una proteína o complejo proteico en solución representa en muchos casos un paso elemental para el entendimiento de su función biológica. Muchos trabajos en la literatura basan la determinación del peso molecular de una proteína según la medición de su volumen de elución utilizando una columna de exclusión molecular (SEC) y un detector de absorbancia-UV acoplado (Wen 1996). Sin embargo esta técnica presenta algunas desventajas: una de ellas es que el volumen de elución de una muestra no sólo depende del PM de la misma sino que también de su forma; otra es que algunas proteínas pueden tener una tendencia a interactuar con la matriz de la columna. Esto hace que en muchos casos la determinación del PM de una proteína basado solamente en esta técnica sea incorrecto (Wen

1996). Por otro lado, las técnicas de Light scattering (dispersión de luz) han sido ampliamente aplicadas en el estudio de la masa, forma y agregación de proteínas en solución (Velez 1998; Banachowicz 2006). Una de éstas se conoce como “Static Light Scattering” (SLS) e involucra la medición de la intensidad de luz dispersada como función de la concentración de partículas dispersantes (Banachowicz 2006). Generalmente esta técnica se aplica en condiciones de equilibrio para la determinación de la masa y tamaño de proteínas, o se la utiliza comúnmente en el estudio de interacciones intermoleculares en función por ejemplo de la fuerza iónica (Velez 1998). Esto último facilita el hallazgo de las condiciones óptimas de cristalización (Wilson 2003). Una manera factible, precisa y confiable de determinar el PM de una proteína en solución es la combinación de SEC con un detector de absorbancia UV, índice de refracción y SLS (SEC-SLS/IR/UV) (Wen 1996). Esta metodología permite estimar el PM de la proteína independientemente de su volumen de elución pero conserva la ventaja de separar la muestra de interés de los posibles contaminantes o agregados.

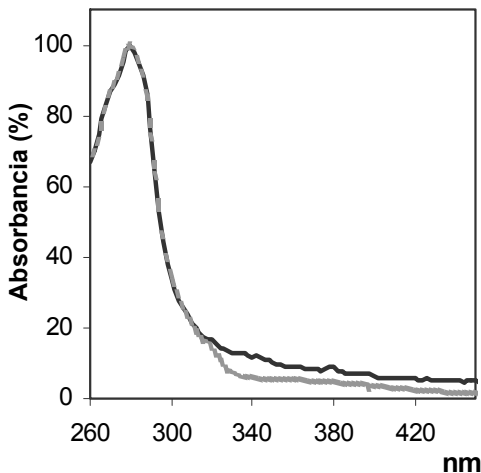


**Figura 10. Determinación de PM de P18.** Corrida de una muestra de P18 purificada (200  $\mu$ g) por una columna SEC (S-200) en buffer 50 mM fosfato, 1mM DTT, pH 7,0, acoplada en serie a los detectores de SLS/IR/UV. Se graficó la señal de SLS en función del volumen de elución.

Teniendo esto en cuenta, una muestra purificada de P18 fue sometida a una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna (S-200), acoplada a detectores de SLS/IR/UV dispuestos en serie. Como se puede ver en la Figura 10, P18 eluyó como único pico cuyo PM resultó ser 180 kDa. Este valor corresponde a diez veces el PM de un monómero, sugiriendo que los mismos permanecen asociados en solución, conformando una partícula decamérica. El radio hidrodinámico calculado de P18 fue de 4,5 nm (45Å), consistente con el radio de una partícula globular decamérica. El PM de P18 obtenido mediante esta técnica resultó inesperadamente mayor al reportado anteriormente mediante el uso de SEC bajo las mismas condiciones experimentales. No obstante, la utilización de SLS para la determinación del PM de una partícula en solución está ampliamente aceptado en la literatura y en este caso no parecía ser un error metodológico. Este resultado posteriormente fue corroborado por difracción de Rayos-X.

Continuando con la caracterización del estado nativo de P18, se realizaron determinaciones de la fluorescencia intrínseca de la proteína y de su actividad óptica. El fluoróforo natural más sensible de una proteína es el triptofano, seguido de la tirosina y por último la fenilalanina (Lakowicz 1999; Lakowicz 2002; Buchner 2005). Cada monómero de P18 posee un solo residuo de triptofano (el de la posición 22), 7 tirosinas y 10 fenilalaninas.

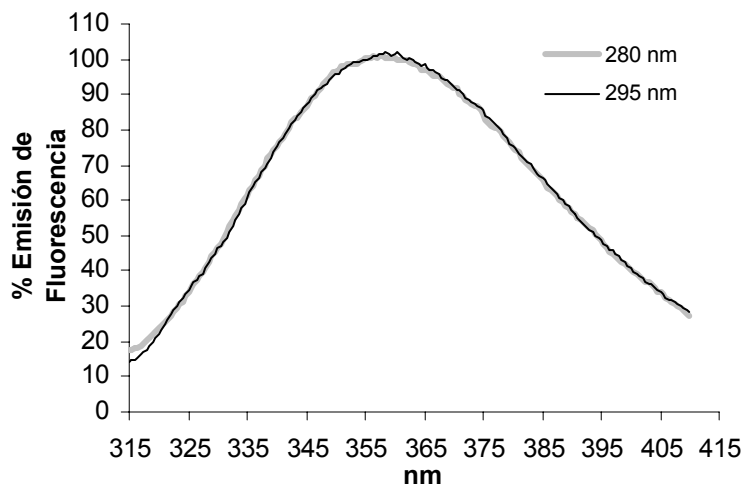




**Figura 11. Absorbancia de P18.** Espectro de absorción UV de una muestra purificada de P18.

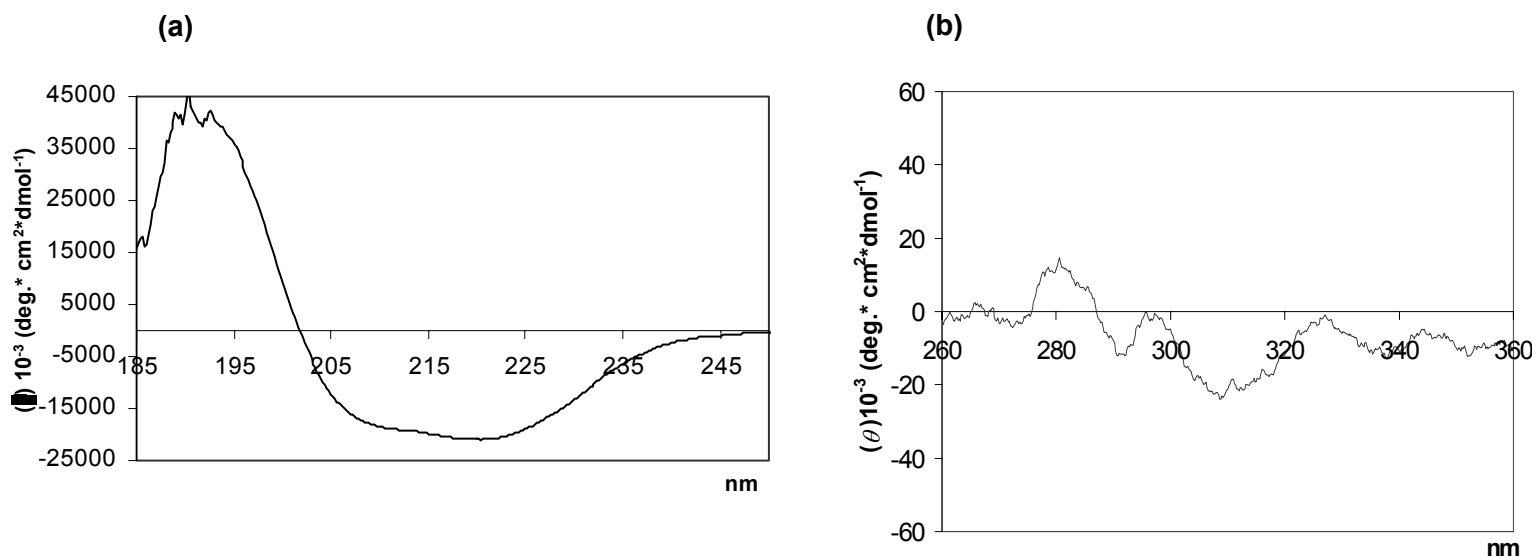
La absorbancia máxima de la proteína reside en la región aromática del espectro (entre 250 y 295 nm; con un máximo a 280 nm) (Figura 11). Es por ello que se emplearon en los ensayos de fluorescencia intrínseca las longitudes de onda de excitación de 280nm, u ocasionalmente de 295 nm cuando resultaba preciso excitar específicamente al triptofano. Como se puede observar en la Figura 12, el espectro de emisión de fluorescencia de P18 presentó un máximo de emisión a los 358 nm, independientemente de la luz de excitación (280 nm ó 295 nm). Según este resultado, la predominancia de la luz emitida es debida al triptofano y no a las tirosinas que también absorben luz a los 280 nm pero prácticamente no lo hacen a longitudes de onda mayores de 290 nm (Schmid 1997; Lakowicz 1999). Generalmente en proteínas nativas que poseen los dos tipos de fluoróforos, el espectro de emisión de fluorescencia intrínseca está dominada por el triptofano, siendo la emisión de las tirosinas apenas detectable (Eftink 1995; Schmid 1997; Lakowicz 1999). Este efecto es debido a que la absorbancia y rendimiento cuántico del triptofano es mayor que el de la tirosina y a que en proteínas nativas pueden ocurrir procesos de transferencia de energía desde las tirosinas a los triptofanos (Eftink 1995; Schmid 1997). Por otra parte, es sabido que el valor máximo de emisión del triptofano, si el mismo está presente en un ambiente no polar como lo es dentro del núcleo proteico (ocultos al solvente), se ubica cercano a los 340 nm (Teale 1960; Schmid 1997). Sin embargo, tal como se observó en la Figura 12, el máximo de emisión de fluorescencia intrínseca de P18 se presentó en longitudes de onda mayores

**Figura 12. Espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de P18.** Una muestra de P18 (10  $\mu$ M de monómeros) en buffer 50 mM fosfato, 1mM DTT, pH 7,0 fue excitada a 280 nm ó 295 nm y se midió su emisión de fluorescencia entre 300 y 410 nm.



(corrimiento hacia el rojo). Este fenómeno indica que el triptofano 22 presenta un alto grado de exposición al solvente cuando la proteína se encuentra en su estado nativo; resultado coincidente con la posición del residuo en la estructura cristalina de la proteína. Existen ejemplos en la literatura de proteínas con un comportamiento similar, las cuales también presentaban un triptofano expuesto al solvente en la estructura nativa (Kundu 1999; Dubey 2003; Duy 2006).

La estructura nativa de P18 en solución también fue estudiada mediante la técnica de dicroísmo circular (DC). El dicroísmo circular es una medida de la actividad óptica de moléculas asimétricas en solución y refleja la diferente absorción de la luz circularmente polarizada hacia la izquierda o la derecha (Fasman 1996). Las señales espectrales de DC de una proteína entre las longitudes de onda de 180 y 300 nm están compuestas por la contribución de los elementos de estructura secundarias y los aminoácidos individuales. La región de DC UV-lejano (180-250 nm) está dominada principalmente por la absorberancia de las uniones peptídicas y refleja cambios en la estructura secundaria. La región de DC UV-cercano (250-300 nm) está dominada por la contribución de los aminoácidos aromáticos y refleja la asimetría del entorno del



**Figura 13. Espectros de dicroísmo circular de P18. (a)** Espectro CD UV-lejano de una muestra de P18 (10  $\mu\text{M}$  de monómero) en buffer 50 mM fosfato, 1mM DTT, pH 7,0. Se graficó la elipticidad molar de la proteína en función de la longitud de onda. **(b)** Espectro CD UV-cercano de P18 (200  $\mu\text{M}$  de monómero = 3,6 mg/ml) en buffer 50 mM fosfato, 1mM DTT, pH 7,0.

residuo (Eftink 1995; Schmid 1997). La Figura 13a muestra el espectro de DC-UV lejano de P18 el cual mostró dos bandas negativas predominantes (a 222 y 208 nm) y otra positiva (entre 190-195 nm). Este tipo de espectro es característico de proteínas correctamente plegadas con una estructura  $\alpha\beta$ , como lo es P18 (Figura 4 y 6), en el cual la contribución al espectro de las  $\alpha$  hélices es predominante (Venjaminov 1996). La Figura 13b, muestra un espectro de DC-UV cercano de P18, como se puede apreciar la proteína no presentó una señal importante, pese a haber realizado la medición con una concentración de la muestra de 10 a 50 veces mayor que la utilizada para el DC-UV lejano. Se sabe que la señal y magnitud de los residuos aromáticos no pueden ser calculadas dado que dependen de la estructura cercana y del entorno electrónico de los cromóforos asimétricos (Buchner 2005). Por lo tanto, el resultado obtenido puede deberse a varias causas, principalmente a que el triptofano no se encuentra en un entorno asimétrico en la estructura nativa de P18, semejante a lo observado por emisión de fluorescencia intrínseca. Otras causas pueden ser: la baja absorbancia de las tirosinas, un efecto de anulación de sus señales (en el caso que algunas contribuyan positivamente y otras negativamente), que las mismas no se encuentren en un entorno asimétrico, o bien a la combinación de todas estas posibilidades.

El tipo de asociación de monómeros de P18 sugerida por el resultado de SLS/IR/UV no tenía precedentes dentro de la familia de las lumazina sintetasas. Por lo tanto resultaba importante profundizar en la caracterización estructural de esta proteína. La caracterización estructural de una proteína implica entre otras cosas, tener conocimiento sobre la ruta de plegamiento de la molécula, identificar posibles intermediarios y conocer la estabilidad termodinámica de la misma. A su vez la estabilidad de una proteína es función de variables externas como el pH, temperatura, fuerza iónica y composición del solvente, dado que éstas alteran diferentes tipos de uniones que pueden ser responsables de la estabilidad intrínseca de la molécula. Por lo tanto para conocer las fuerzas responsables de la estabilidad conformacional de una proteína es necesario realizar un análisis cuantitativo del rol de estas variables en la formación de su estructura. Una metodología para dichos estudios consiste en el monitoreo de los cambios conformacionales debidos a la perturbación de la molécula proteica por diferentes agentes. En este trabajo se evaluó la estabilidad conformacional termodinámica de P18 frente a urea, cloruro de guanidinio y pH, así como su termoestabilidad. Los efectos de los diferentes agentes desnaturizantes sobre

P18 fueron estimados utilizando variadas técnicas de estudio conformacional de proteínas: fluorescencia intrínseca del triptofano (FT), dicroísmo circular y Static Light Scattering. Por otro lado se reanalizó la estructura cristalina ya descrita y se llevaron a cabo en el laboratorio nuevos experimentos cristalográficos.

### ***Estabilidad termodinámica de P18.***

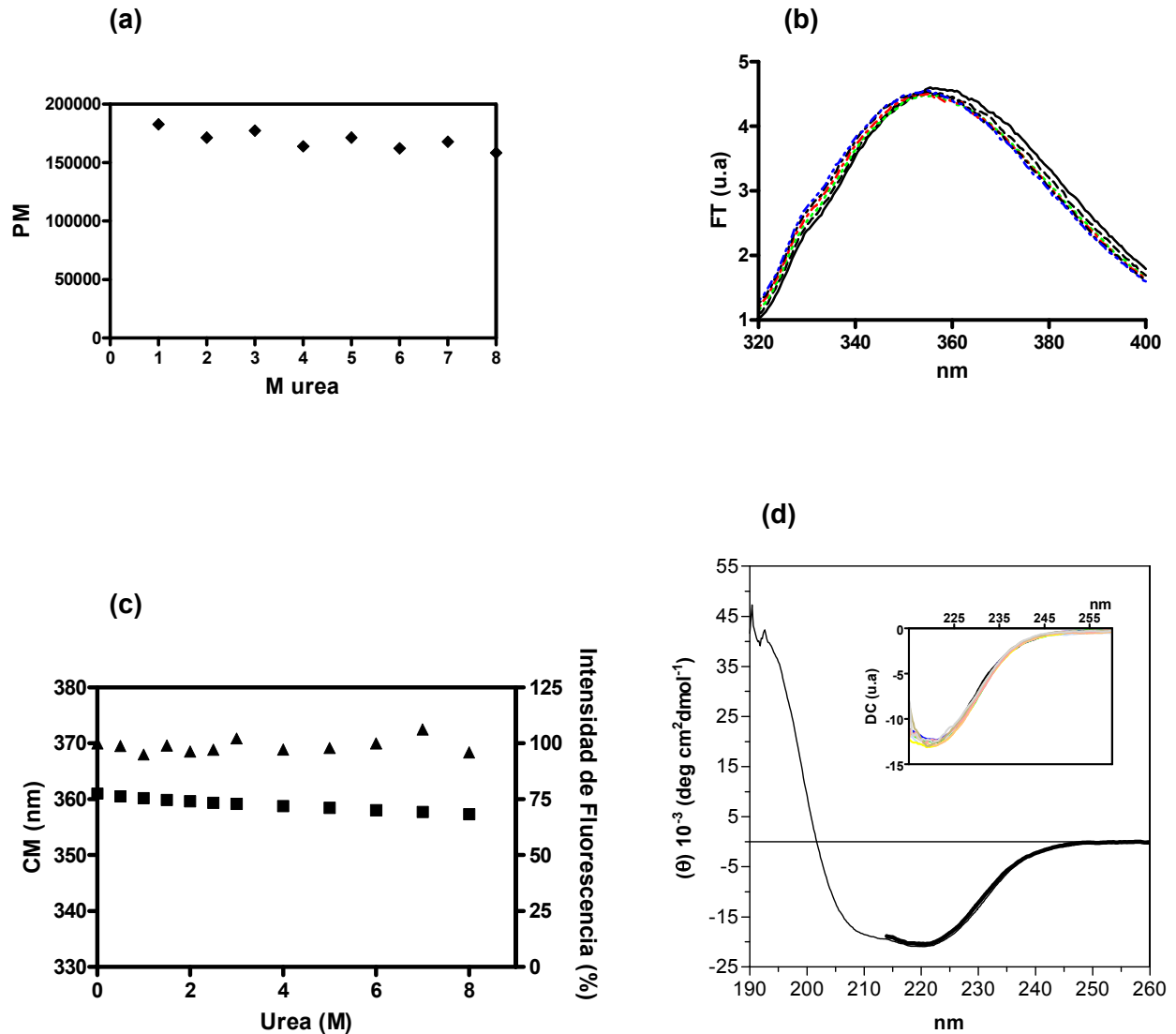
#### ***1). Urea***

En primer lugar, y con el fin de estudiar el efecto de la urea en la estructura cuaternaria de la proteína, se realizaron determinaciones de SLS/IR/UV de P18 incubada en diferentes concentraciones del agente desnaturizante. Todas las mediciones se realizaron luego de un período de incubación de las muestras (2 h) en las diferentes condiciones de buffer, de manera de asegurar condiciones de equilibrio. Para este tipo de mediciones se utilizó una columna G-25 acoplada a los diferentes detectores. Estas columnas, a diferencia de la S-200, no permiten una separación por tamaño de las moléculas, por lo tanto en los experimentos se evaluó el cambio del PM promedio de la muestra. En este caso resultaba ventajosa la utilización de éste tipo de columna dado que permitía realizar un mayor número de mediciones en tiempos más cortos. En la Figura 14a se ve que el PM promedio de la muestra permaneció constante independientemente de la concentración de urea ensayada y el mismo equivalió al PM de una partícula decamérica. Este resultado indica que P18 no sufre un cambio en su estructura cuaternaria general debido a la urea. Dicho de otro modo, la estructura cuaternaria de P18 es altamente estable a juzgar por el efecto que en ella tiene la urea. Posteriormente, se evaluó el efecto de la urea sobre la estructura terciaria y secundaria de P18, para lo cual, se midió la fluorescencia intrínseca de la proteína y su señal de DC al ser incubada con concentraciones crecientes del desnaturizante.

Es de esperar que cuando una proteína se despliega, sus residuos aromáticos pasen a estar más expuestos al solvente de los que se encontraban en el estado nativo. Estos cambios conformacionales generalmente son los responsables de importantes modificaciones en la emisión de fluorescencia de una proteína (Schmid 1997). Tanto la intensidad de fluorescencia como la posición del máximo de intensidad de un triptofano pueden variar durante el desplegamiento de una proteína (Schmid 1997). Por lo tanto es necesario evaluar ambos parámetros al analizar el efecto de un desnaturizante sobre la

estructura de una proteína. La Figura 14b muestra los espectros de FT obtenidos para P18, los cuales fueron analizados según se detalla en materiales y métodos, obteniendo el gráfico de la Figura 14c. Según los resultados, la intensidad de fluorescencia, así como el centro de masa permanecieron prácticamente constantes en todas las concentraciones de urea ensayadas. Como se mostró anteriormente, la proteína nativa presentó una señal de fluorescencia intrínseca característica de un triptofano expuesto. Por lo tanto, a partir de este resultado no se puede discriminar si la urea no produjo importantes cambios en el entorno del triptofano o bien si el triptofano 22 es incapaz de sensor dichos cambios debido a su ubicación espacial dentro de la proteína.

Por último se analizó el estado de la estructura secundaria de P18 en presencia de urea. La Figura 14d muestra los espectros de DC obtenidos de la proteína nativa o incubada con 8 M urea (en el detalle se grafican algunos de los espectros tomados). Se puede notar que el contenido de estructura secundaria de P18 en presencia de 8 M urea es idéntico al existente en la proteína nativa (buffer fosfato, pH 7). A partir de estos resultados, se puede concluir que P18 es una proteína resistente al desplegamiento inducido por urea, conservando estable su estructura cuaternaria y secundaria aun en presencia de altas concentraciones de tal desnaturizante. El grado de compactación de la proteína o su estructura terciaria no pareció afectada por el agregado de urea, esto es cierto siempre y cuando consideremos que el triptofano refleja toda perturbación producida por el agente desnaturizante en la molécula.

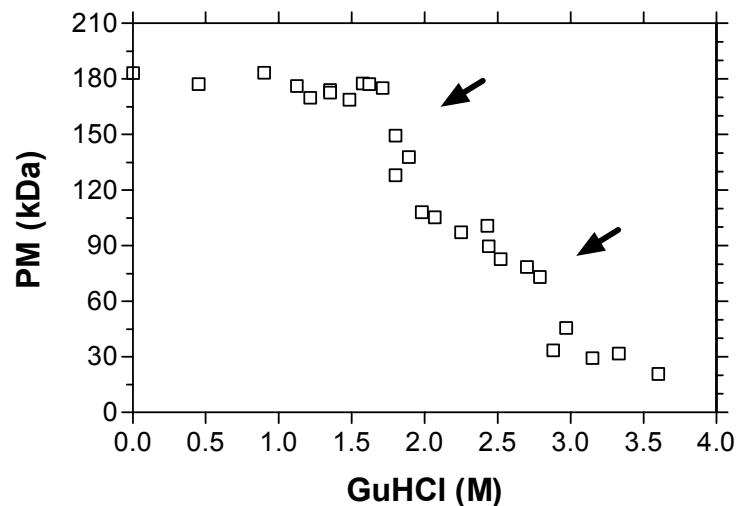


**Figura 14. Efecto de la urea en la estructura de P18.** (a) *Efecto de la urea en el grado de polimerización de P18.* Muestras de proteína (50  $\mu\text{g}$ ) en buffer 50 mM fosfato, 1mM DTT, pH 7,0 fueron incubadas con concentraciones crecientes de urea. Luego de 2 h de incubación fueron corridas por una columna G-25 preequilibrada en el mismo buffer en el que se encontraba la proteína y acoplada a los detectores de SLS/IR/UV. Todos los PM fueron determinados por triplicado y según se explicó en materiales y métodos. Se utilizó una muestra de BSA como proteína control. (b) *Efecto de la urea en la estructura terciaria de P18.* Muestras de proteína (10  $\mu\text{M}$  de monómero) en buffer 50 mM fosfato, 1mM DTT, pH 7,0 fueron incubadas con concentraciones crecientes de urea. Luego de 2h. de incubación se excitó a las muestras (280 o 295 nm) y se midieron los espectro de emisión de las mismas (de 300 a 400 nm). La misma curva se repitió con diferentes concentraciones de proteína. (c) Centro de masa (CM) e intensidad de fluorescencia de P18 en función de la concentración de urea, calculadas a partir de los espectros de emisión. El CM se calculo mediante la ecuación 2 (ver materiales y métodos). (d) *Efecto de la urea en la estructura secundaria de P18.* Las muestras de P18 preparadas de la misma manera que para el ensayo de fluorescencia, fueron monitoreadas por CD UV-lejano. Se muestran espectros de la proteína nativa y de la incubada con 8M urea. En el detalle se muestran espectros de DC de las muestras de P18 incubadas en las diferentes concentraciones de urea. En todos los casos se trabajo con una solución madre de urea fresca, la cual fue preparada en el mismo buffer de la muestra proteica.

**II). Cloruro de guanidinio (GdnHCl).**

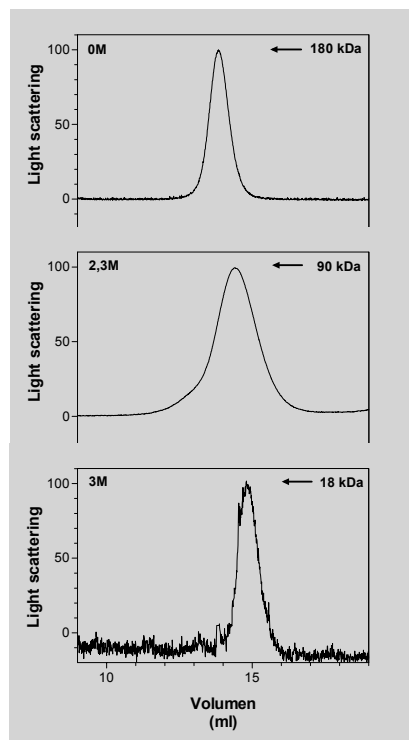
De un modo similar a los ensayos realizados con urea, se midió el efecto del GdnHCl en la estructura cuaternaria (PM) de P18. Para ello se acopló una columna G-25 a los detectores de SLS/IR/UV y se calculó el PM promedio de las muestras eluidas, previamente incubadas y equilibradas con concentraciones crecientes de GdnHCl. Como se observa en la Figura 15, la variación del PM de P18 en función del agregado de GdnHCl siguió un comportamiento bifásico, sugiriendo la presencia de un intermediario de plegamiento. Una de las transiciones observadas tuvo lugar entre 1,5M - 2 M y la otra entre 2,3M - 3M de GdnHCl (señaladas con una flecha sobre la Figura 15). En la primera transición, ocurrió una disminución cooperativa de la señal de intensidad de SLS, equivalente a una reducción del PM de la proteína a la mitad del valor obtenido en condiciones nativas, esto es de 180 kDa a 90 kDa. Este fenómeno fue interpretado como una disociación de la estructura nativa decamérica (180 kDa), en pentámeros de un PM correspondiente a la mitad del valor (90 kDa). Este resultado, nos aportó una información complementaria importante sobre la estructura de P18: El arreglo decamérico de la proteína se debe a la unión de dos partículas pentaméricas, capaces de disociarse en concentraciones intermedias de GdnHCl. En la segunda transición (2,3M - 3M), se evidenció una reducción de 5 veces la señal de SLS, equivalente a un

**Figura 15. Efecto del cloruro de guanidinio en el grado de polimerización de P18.** Muestras de P18 (50 µg) en buffer 50 mM fosfato, 1mM DTT, pH 7,0 fueron incubadas con concentraciones crecientes de cloruro de guanidinio. Luego de 2 h. de incubación fueron corridas por una columna G-25 preequilibrada en el mismo buffer en el que se encontraba la proteína y acoplada a los detectores de SLS/IR/UV. Todos los PM fueron determinados al menos por triplicado. Se trabajó con una solución madre fresca de cloruro de guanidinio la cual fue preparada en buffer 50 mM fosfato, 1mM DTT, pH 7,0.



cambio del PM de 90 a 18 kDa. Este equilibrio fue interpretado como la disociación del pentámero (90 kDa) en sus 5 monómeros constituyentes (18 kDa).

Como se aclaró anteriormente, la utilización de una columna G-25 acoplada al detector de SLS/IR/UV solamente permite determinar el promedio del PM de todas las especies coexistentes en una determinada muestra. A partir de estos datos no es posible discriminar si en una determinada condición de desnaturizante existe un equilibrio entre moléculas de variados PM o bien una población de moléculas homogéneas. Por lo tanto, resultaba interesante aislar las especies existentes antes y después de cada una de las transiciones y calcular el PM de las mismas. Para ello, se acopló a los detectores SLS/IR/UV una columna S-200 preequilibrada (al igual que la muestra proteica que se sembró) con diferentes buffers de interés: 50 mM buffer fosfato (para la condición nativa); 2,3M GdnHCl ó 3M GdnHCl. Como muestra la Figura 16, en cada condición eluyó de la columna un único pico cuyo PM resultó ser: 180 kDa, 90 kDa ó 18 kDa respectivamente. Éstos ensayos indicaron que concentraciones intermedias de GdnHCl (2,3M) estabilizan a un intermediario pentamérico, por ello en dicha condición existe una predominancia de una sola población de 90 kDa. Sumado a esto, nos permitió pensar a P18 en solución como una partícula decamérica, mejor descrita como un dímero de pentámeros. Cabe aclarar que la información que aportó la técnica de SLS/IR/UV por sí sola, no nos permitió inferir sobre el estado conformacional del intermediario de 90 kDa o sobre la conformación de la partícula de 18 kDa. Es decir si conservan o no cierta estructura terciaria y/o secundaria .



**Figura 16. Obtención del intermediario pentamérico de P18.** Se incubó a 50  $\mu$ g de P18 (en buffer 50 mM fosfato, 1mM DTT, pH 7,0) con 2,3 o 3M cloruro de guanidinio (preparado en el mismo buffer) y se inyectó a cada muestra en la columna S-200 previamente estabilizada en el buffer correspondiente (0M, 2,3M o 3M Cloruro de guanidinio). Se determinó el PM del pico eluído y se graficó la señal de SLS en función del volumen de elución para cada condición de incubación.

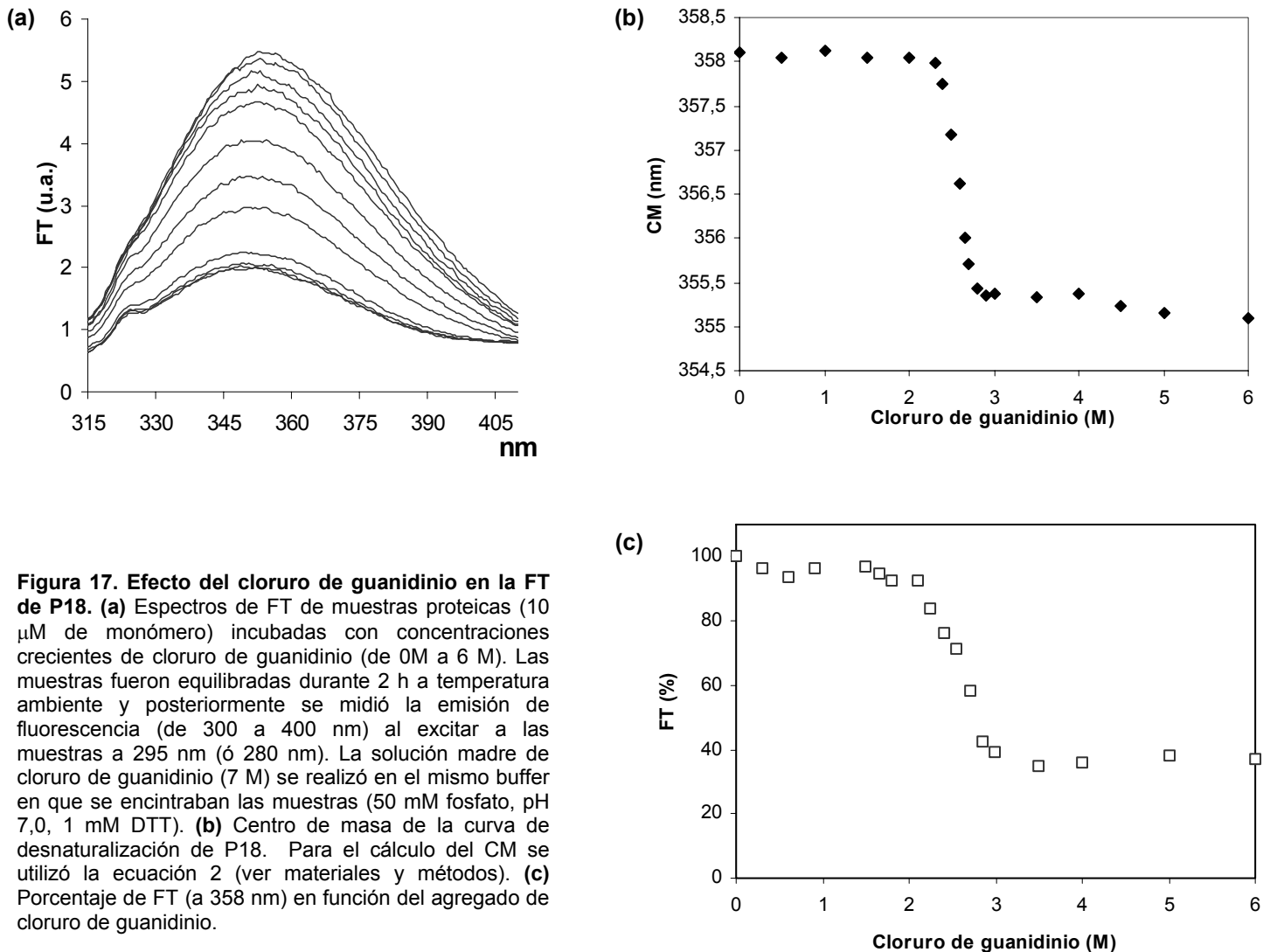
Con la intención de evaluar el efecto del GdnHCl sobre la estructura terciaria y secundaria de P18, se incubaron las muestras proteicas con buffers de concentraciones crecientes del desnaturizante y se midieron los cambios producidos en la fluorescencia intrínseca o en la señal de DC. La Figura 17a muestra como ejemplo los espectros obtenidos de FT. Se pudo lograr una mejor interpretación de los datos al graficar la evolución del centro de masa en función de la concentración de GdnHCl (Figura 17b) o bien el porcentaje de intensidad de fluorescencia a una longitud de onda fija (Figura 17c). El primer fenómeno que surge de observar la curva, es que fue posible obtener un cambio en la señal de FT en función del agregado de GdnHCl no obstante P18 en estado nativo presenta un triptofano bastante expuesto al solvente. Por otra parte, como se puede apreciar, esta curva mostró una sola transición que tiene



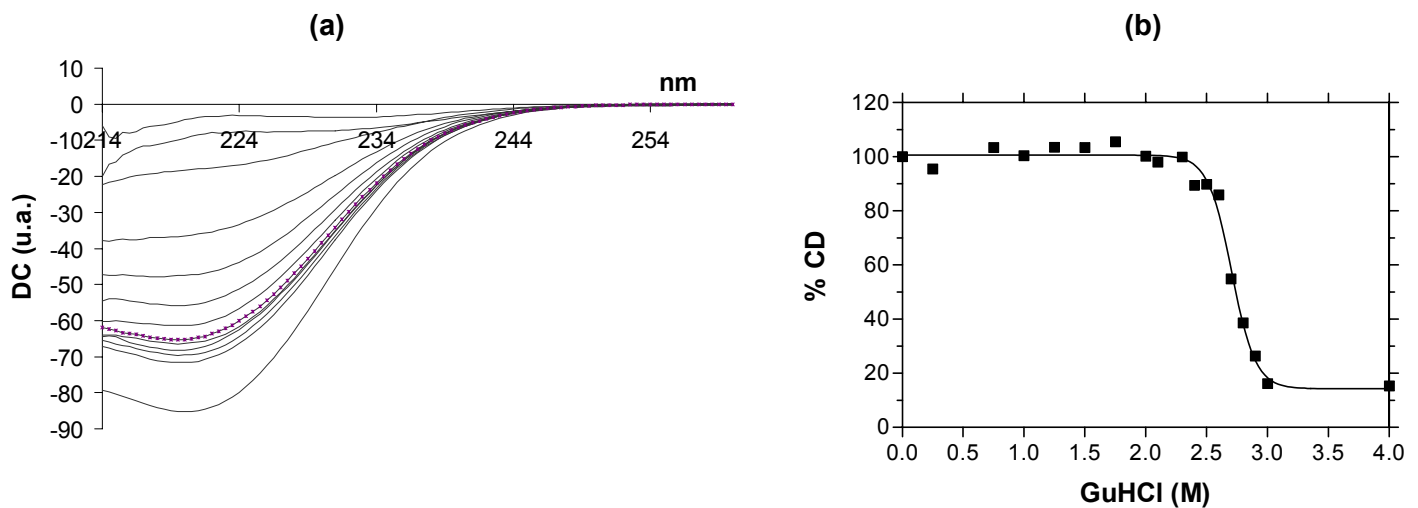
lugar en un rango de concentraciones entre 2,3 M y 3 M de desnaturalizante. En este equilibrio la proteína perdió más del 60% de su emisión de fluorescencia total, indicando que ocurrió una importante modificación en el entorno del triptofano, propio de un desplegamiento de la cadena polipeptídica. Es importante resaltar que en este mismo rango de concentraciones de GdnHCl, (entre 2,3 y 3 M) se determinó mediante SLS/IR/UV que la proteína sufrió un cambio de un estado pentamérico a otro monomérico (Figura 15, segunda transición). Adicionalmente, el resultado de FT sugiere que durante dicha transición existe un fenómeno de desplegamiento de P18.

Llamativamente, al desplegarse P18 la intensidad máxima de emisión de fluorescencia sufrió un corrimiento hacia longitudes de onda menores (de 358 nm a 353 nm). Este fenómeno no coincide con lo reportado en la literatura para la mayoría de las proteínas durante el desplegamiento de sus cadenas polipeptídicas. Está comprobado que al excitar a un triptofano presente en un entorno no polar, el mismo emite fluorescencia en una longitud de onda cercana a los 320 nm (grupo indol en ciclohexano). Por el contrario, cuando se excita a un triptofano expuesto a un solvente polar, éste emite a mayores longitudes de onda (350-360 nm). Por esto se espera que durante el desplegamiento de una proteína ocurra un corrimiento del máximo de emisión de fluorescencia intrínseca de 320 nm a 360 nm (Schmid 1997). Esto es válido para proteínas que en estado nativo presenten un triptofano oculto al solvente, pero es lo contrario de lo observado para P18. Por lo tanto, el corrimiento anómalo de la emisión de fluorescencia durante el desplegamiento de P18 está relacionado con el entorno del triptofano en uno u otro estado. Aparentemente, cuando la proteína se encuentra plegada, su triptofano presenta mayor accesibilidad al solvente y un menor micro ambiente no polar que el existente cuando la proteína se encuentra desplegada. Existen algunos trabajos en la bibliografía en los que también se observó un corrimiento anómalo del máximo de emisión de fluorescencia intrínseca de una proteína; en estos trabajos se demostró que eran debidos a una causa similar a la postulada por nosotros (Dubey 2003; Duy 2006).

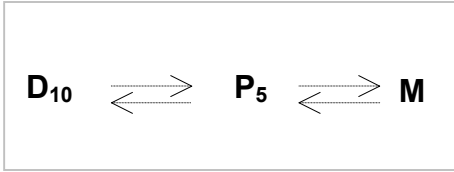
Es oportuno aclarar que si bien sólo se observó una única transición en la señal de FT durante el desplegamiento de P18, no se puede descartar la posibilidad de que existan intermediarios los cuales no fueron detectados por esta técnica. Esto es debido a la posición del único triptofano de P18, el cual no necesariamente refleje toda perturbación ocurrida en la estructura terciaria de la molécula proteica durante su desplegamiento.



Para completar el estudio conformacional de P18, fue necesario analizar el efecto del GdnHCl en su estructura secundaria. En la Figura 18a se puede apreciar la pérdida de señal de DC al preincubar y equilibrar a P18 con concentraciones crecientes de GdnHCl. En la Figura 18b se graficó el porcentaje de cambio de elipticidad molar a 222 nm en función de la concentración del desnaturalizante. Se puede observar que el GdnHCl provocó una pérdida cooperativa de la estructura secundaria de P18. En presencia de altas concentraciones del agente desnaturalizante, la pérdida de estructura secundaria fue prácticamente total (mayor al 80%). Al igual que lo observado mediante FT, el cambio cooperativo tuvo lugar en un rango de concentraciones de GdnHCl entre 2,3 M y 3 M. Según los datos obtenidos por S-200-SLS/IR/UV, al comienzo de ésta transición (2,3M) el PM de P18 correspondía al de una partícula pentamérica y hacia el final de la misma (3M de GdnHCl) al de una monomérica. Sumado a esto, los datos de DC indicaron que a 2,3 M de GdnHCl la proteína conservó totalmente su contenido de estructura secundaria mientras que a 3M de GdnHCl la misma perdió más del 80%. Asociando los datos, se deduce que el estado conformacional de P18 previo a la transición observada por FT o DC (2,3M GdnHCl) es el de un pentámero plegado (intermediario de 90 kDa) mientras que al final de la transición (3M GdnHCl) el estado conformacional de P18 es monomérico y desplegado.



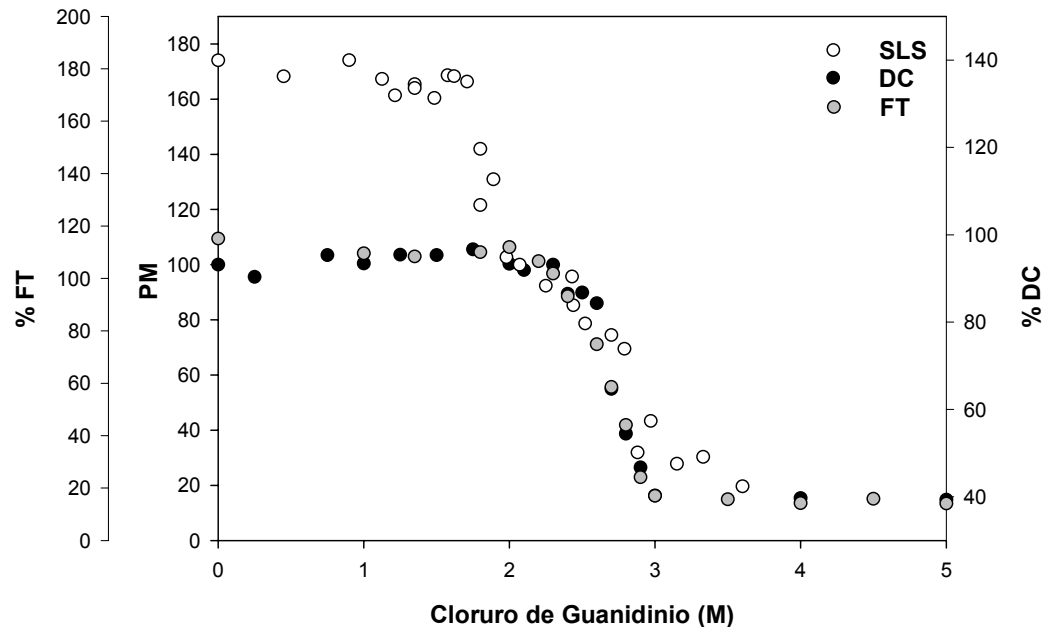
**Figura 18. Efecto del GdnHCl en la estructura secundaria de P18.** (a) Espectros de DC UV-lejano de muestras proteicas (  $10 \mu\text{M}$  de monómero) incubadas con concentraciones crecientes de GdnHCl (de 0M a 6 M). Las muestras fueron equilibradas durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se midió el espectro de DC (de 260 a 200 nm). La solución madre de GdnHCl (7 M) se realizó en el mismo buffer en que se encontraban las muestras (50 mM fosfato, pH 7,0, 1 mM DTT). (b) Porcentaje de DC a 222 nm en función del agregado de GdnHCl.



**Figura 19.** Esquema de disociación y desplegamiento de P18 inducido por GdnHCl. D= decámero, P= pentámero, M= monómero.

Superponiendo las curvas de SLS/IR/UV, FT y DC se logró comprender en conjunto el mecanismo de desnaturalización de P18 inducido por GdnHCl (Figuras 19 y 20): La proteína en estado nativo es decamérica y puede ser disociada en sus constituyentes pentaméricos, al ser incubada con concentraciones intermedias del desnaturalizante. Dado que durante este equilibrio las señales de FT o DC permanecieron constantes en el rango de concentraciones de 1 a 2,3M GdnHCl, se deduce que el pentámero disociado permaneció plegado sin pérdida de estructura secundaria (con respecto a su estructura terciaria vale la aclaración realizada anteriormente). A mayores concentraciones de GdnHCl (entre 2,3 y 3M) ocurre una disociación de los pentámeros y desplegamiento de los monómeros. La coincidencia de las señales de SLS/IR/UV, FT y DC indican que estos dos eventos ocurren de manera concertada, sin encontrarse evidencias de la existencia de un intermediario monomérico plegado o de algún otro tipo de intermediario durante tal equilibrio.

**Figura 20.** Superposición de las curvas de desplegamiento de P18 inducido por cloruro de guanidinio y monitoreada por SLS/IR/UV, FT y DC.



*Estabilidad termodinámica de P18 medida por desnaturalización química.*

Las dos transiciones descritas para la disociación y desplegamiento de P18 inducida por cloruro de guanidinio resultaron ser reversibles. Esto se comprobó dializando una preparación proteica previamente incubada y equilibrada con 6M GdnHCl hasta alcanzar una concentración del agente desnaturalizante nula y posteriormente analizando a la muestra mediante diferentes técnicas. Las muestras replegadas recobraron los valores normales de las medidas de SLS/IR/UV, FT y DC (resultado no mostrado). Resultaba importante estimar ciertos valores termodinámicos de P18 a partir de las curvas de desnaturalización por GdnHCl seguidas mediante SLS/IR/UV, FT y DC. Los dos equilibrios fueron evaluados separadamente, de ésta manera se lograron calcular los parámetros termodinámicos que caracterizan por un lado la disociación del decámero y por el otro el desplegamiento de los pentámeros (Figura 19). Los valores de SLS/IR/UV obtenidos para la disociación de P18, en el rango de concentración de GdnHCl de 1,5-2,3M fueron ajustados a un modelo de "dos estados" (decámero  $\leftrightarrow$  2 pentámeros) (ver materiales y métodos). Se estimó la energía libre de disociación ( $\Delta G_d$ ) por el método de extrapolación lineal (LEM). Este método permite estimar la estabilidad conformacional de una proteína asumiendo que la dependencia entre la energía libre ( $\Delta G$ ) y la concentración del desnaturalizante se mantiene lineal hasta 0M de dicho agente (Greene 1974; Pace 1986). La diferencia de energía libre asociada a la disociación de P18 fue de  $90 \pm 20$  kJ/mol de decámero. A partir del dato de energía libre, se obtuvo una constante de disociación  $K_D = 2,48 \cdot 10^{-16}$  M (ver apéndice), indicando que en las condiciones de trabajo y en condiciones fisiológicas (nano-micro molar) el equilibrio de disociación de P18 se encuentra muy favorecido hacia su forma decamérica. Por el mismo método se obtuvo la pendiente de la transición  $m = 20$  kJ/mol\*M, que representa una medida de la dependencia del  $\Delta G$  con la concentración del desnaturalizante y está linealmente relacionada con el cambio de superficie accesible durante la disociación. La misma será útil en estudios conformacionales posteriores.

Por otro lado, el segundo equilibrio observado, interpretado como la transición de un pentámero plegado a un monómero desplegado es un proceso que pudo ser detectado mediante múltiples metodologías al incubarse a la muestra con concentraciones mayores de GdnHCl (Figura 20). Independientemente de la metodología utilizada, este equilibrio fue siempre detectado en un mismo rango de concentraciones de GdnHCl (2,3-3,0M), lo cual indica que la pérdida de

Proteína ( $\mu\text{M}$ )	<sup>a</sup> D <sub>(50)</sub> (M)	<sup>b</sup> $\Delta\text{G}$ (kJ/mol)
0.25	2,55	322 $\pm$ 30
0.5	2,6	334 $\pm$ 27
5	2,65	337 $\pm$ 28
25	2,88	320 $\pm$ 30

**Tabla 3.** Parámetros termodinámicos del desplegamiento de los pentámeros de P18 (segunda transición) en función de diferentes concentraciones de proteína. <sup>a</sup> concentración media de GdnHCl, <sup>b</sup> diferencia de energía libre asociada al desplegamiento del pentámero. Ver materiales y métodos para más detalle.

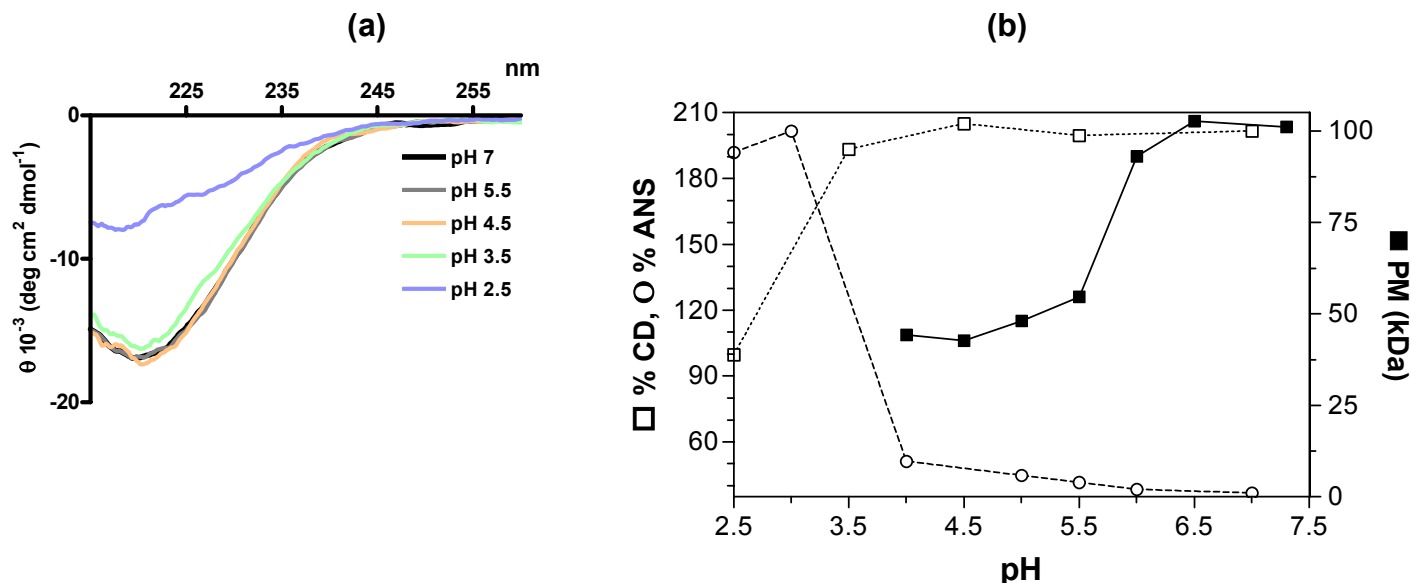
estructura cuaternaria, terciaria y secundaria ocurrió de manera concertada. Los valores obtenidos por DC y FT en el rango de GdnHCl mencionado fueron analizados mediante una ecuación matemática considerando que se trata de un equilibrio de "dos estados" entre una partícula pentamérica y cinco monómeros desplegados (pentámero  $\leftrightarrow$  5 monómeros) (ver materiales y métodos, Figura 19). En éste análisis no se utilizaron los valores obtenidos mediante SLS/IR/UV, dado que el número de determinaciones realizadas era menor a las aconsejadas para calcular fehacientemente el valor de energía libre. A partir del ajuste matemático, se obtuvo un valor de  $\Delta\text{G}_u$  (diferencia de energía libre asociada al desplegamiento de P18) de  $320 \pm 30$  kJ/mol de pentámero (Tabla 3) y una pendiente de 68 kJ/mol\*M. Las mismas determinaciones de FT y DC se repitieron para diferentes concentraciones iniciales de proteína y los parámetros termodinámicos resultantes se resumen en la Tabla 3. Se puede observar que el valor de D<sub>50</sub>, medida de la concentración media de cloruro de guanidinio necesaria para desnaturalizar el 50% de las moléculas (ver materiales y métodos), resultó dependiente de la concentración de proteína utilizada. Esto representa otra evidencia de la existencia de un fenómeno de disociación durante el equilibrio evaluado (Pace 1986). Por otro lado, la pendiente de la curva de desnaturalización así como el valor de energía libre, no mostraron relación con la concentración de proteína utilizada, reforzando la precisión con la cual se determinaron dichos parámetros. Teniendo en cuenta los valores de  $\Delta\text{G}$  de la primera y segunda transición, se puede concluir que P18 es una proteína termodinámicamente muy estable cuyo valor de energía libre asociada al desplegamiento total de la partícula decamérica es de aproximadamente 730 kJ/mol ( $90 \text{ kJ/mol} + 2 \cdot (320 \text{ kJ/mol})$ ) (disociación + desplegamiento).

### III). pH

Resultaba interesante determinar el efecto del pH sobre la estabilidad conformacional de P18. Para ello, se diluyó a una muestra concentrada de P18 en buffer citrato 50 mM desde pH 6 hasta 2,5 o bien en buffer fosfato 50 mM pH 7,5 ó 6,0. Luego de dos horas de incubación de las muestras a temperatura ambiente se realizaron determinaciones de SLS/IR/UV y DC de las mismas (Figura 21). El punto isoeléctrico (pI) de P18, determinado experimentalmente (no se muestra) es 6,6, coincidente con el pI teórico. En el rango de pH entre 6,5 y 5,5 se pueden notar dos fenómenos diferentes: Por un lado se produjo un cambio de la señal de Static Light Scattering a la mitad (correspondiente a una disminución del PM al medio), característico de un proceso de disociación

(Figura 15). Por el otro lado, en el rango evaluado, el contenido de estructura secundaria de P18 permaneció invariable (Figura 21). Estos resultados indican que una disminución del pH levemente por debajo del pI de P18 (entre 6,5 y 5,5), induce la disociación del decámero. A su vez los pentámeros disociados mantienen el contenido de estructura secundaria inalterado (en comparación con los mismos asociados).

Un modo original de evaluar el impacto del pH en la estructura terciaria de P18, o bien evidenciar la existencia de un intermediario de tipo “glóbulo fundido”, es a través de la medición de la capacidad de unión de la proteína al ANS en función del pH de incubación de la muestra. El ANS es capaz de unirse con alta afinidad sobre superficies hidrofóbicas expuestas (parches hidrofóbicos) comúnmente encontrados en intermediarios proteicos parcialmente plegados (glóbulos fundidos); mientras que no presenta gran afinidad de unión por proteínas nativas o en estado totalmente desplegado (Daniel 1966; Semisotnov 1991; D'Alfonso 1999). Esta interacción resulta en un incremento en la emisión de la fluorescencia del ANS en comparación con la emisión del ANS libre. Como se ve en la Figura 21, a pH neutro el ANS no presentó afinidad por P18, propio de un estado nativo compacto de la proteína. En el rango de pH que ocurrió la disociación de P18 (entre 6,5 y 5,5) se vio una pobre unión del ANS a la proteína, indicando que no se expusieron regiones hidrofóbicas durante éste proceso o, dicho de otro modo, el pentámero resultante presenta una estructura terciaria compacta. A pH menores de 4,0 (entre 4,0 y 3,0) ocurrió un importante aumento de la señal de fluorescencia del ANS, concomitantemente la proteína comenzó a perder señal de elipticidad molar a 222 nm. Este proceso fue interpretado como el desplegamiento de los pentámeros, lo cual implica una importante exposición de regiones hidrofóbicas originalmente ocultas. En el mismo pH en el que comenzó a ocurrir la pérdida de estructura secundaria de P18 (pH menores a 4,0), se observó una importante tendencia de la proteína a agregar (resultado no mostrado). Esto imposibilitó monitorear cambios en las señales de SLS/IR/UV a pH menores de 4,0. A diferencia de lo observado en el desplegamiento del intermediario pentamérico con altas concentraciones de GdnHCl, el inducido por pH menores a 4,0 resultó ser irreversible. A partir de estos resultados se puede deducir que el estado decamérico posiblemente se encuentre estabilizado por una red de interacciones en que participan, entre otros, algunos residuos que al variar sus cargas inducen un cambio global del estado cuaternario de P18 (disociación). Entre estos residuos podrían participar histidinas cuyo pKa (del grupo imidazol) es alrededor de 6,0, coincidente con el



**Figura 21. Efecto del pH en la estructura de P18.** (a) Espectros de DC UV-lejano de P18 incubada en buffers de diferentes pH. Las muestras proteicas ( $10 \mu\text{M}$  monómero) fueron diluidas en buffers de diferentes pH (entre 7,5 y 2,5). Luego de 2 h de incubación se tomaron los espectros de DC UV-lejano. (b) Superposición de las curvas de DC (señal a 222 nm), SLS/IR/UV y unión a ANS de muestras incubadas con buffers de diferentes pH (entre 7,5 y 2,5). El PM se calculó utilizando una columna G-25 acoplada a los detectores de SLS/IR/UV previamente equilibrada en el mismo buffer que la muestra proteica. A las mismas muestras que se les midió la señal de DC UV-lejano, se les adicionó una cantidad de ANS ( $100 \mu\text{M}$ ), luego se midió la emisión a 470 nm (excitación a 360 nm). Los buffers utilizados fueron: 50 mM citrato, 1 mM DTT, (pH 6,0-2,5) ó 50 mM fosfato, 1 mM DTT, (pH 7,5-7,0)

pH en el cual P18 se disoció. No es posible descartar un efecto del pH en alguna otra región de la proteína (además de la interfaz de contacto entre pentámeros) que participe en tal fenómeno. El efecto de la disminución del pH por debajo de 4, condición en la cual la proteína se encontraría mayoritariamente protonada, conduce a un cambio radical en la estructura del intermediario pentamérico induciendo su desplegamiento y agregación de manera irreversible.

Cabe destacar que tanto la disociación inducida por GdnHCl como por pH ácido, no produjeron modificaciones en el contenido de estructura secundaria de P18. Sin embargo puede ser que el intermediario pentamérico estabilizado por una u otra condición no necesariamente sean conformacionalmente iguales. Para afirmarlo sería necesario realizar estudios estructurales específicos (como por ejemplo RMN), los cuales no forman parte de los objetivos de esta tesis.



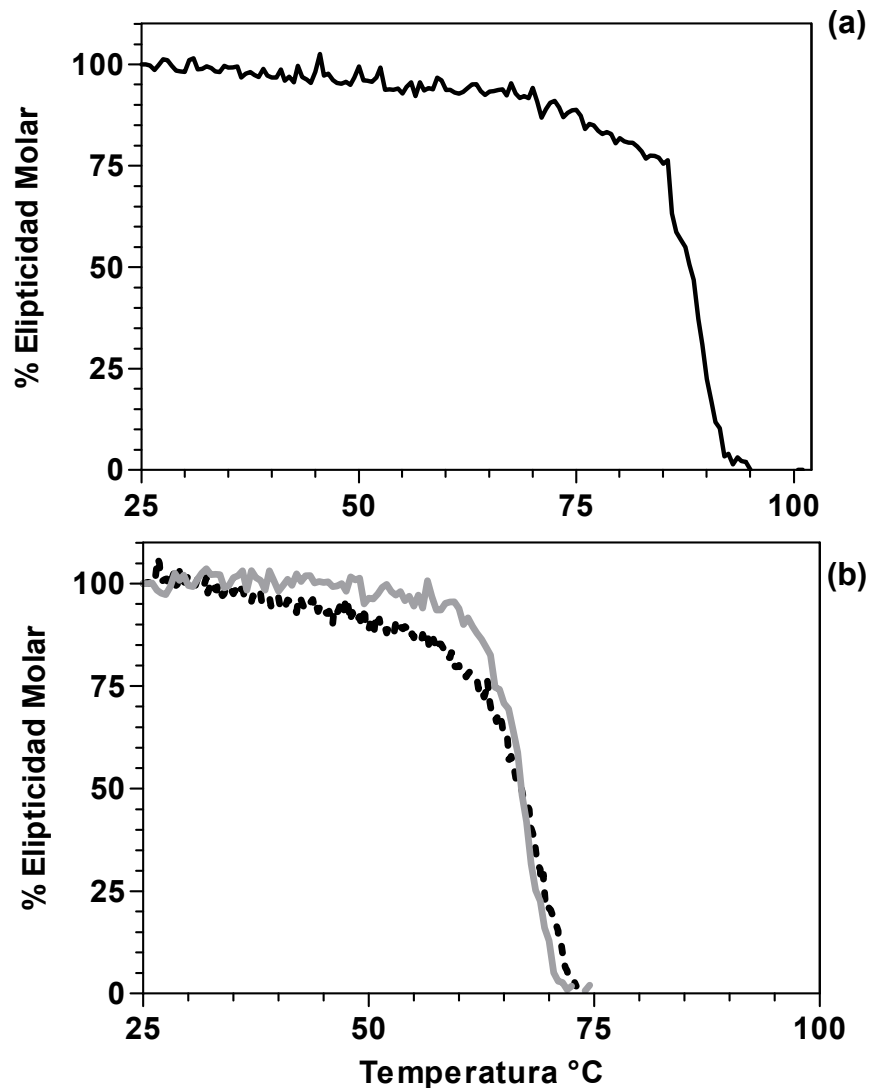
**IV). Estabilidad térmica de P18.**

La estabilidad térmica de P18 fue analizada monitoreando el cambio de la señal de elipticidad molar de la proteína a 222 nm en función del aumento de la temperatura. La Figura 22a muestra una curva típica de desnaturalización térmica de P18 en la que se observa una pérdida importante y cooperativa de elipticidad molar entre 85 °C y 95 °C. La desnaturalización térmica de P18 resultó ser totalmente irreversible. Se observó una importante tendencia de la proteína a la agregación al ser sometida a altas temperaturas, posiblemente relacionado con la irreversibilidad del proceso. Está reportado en bibliografía que la incubación de una muestra proteica con bajas cantidades de urea o cloruro de guanidinio produce una disminución de la temperatura de desnaturalización de la molécula y favorece la reversibilidad del proceso (Buchner 2005). Esto es debido a que estabilizan y aumentan la solubilidad del estado desplegado de la proteína. Teniendo esto en cuenta, se incubó a P18 con pequeñas cantidades de urea o cloruro de guanidinio previo a su desnaturalización térmica. Pese a los esfuerzos realizados, no fue posible encontrar una condición tal que favoreciese la reversibilidad de la transición analizada. Por este mismo motivo, no fue posible determinar el mecanismo específico por el cual P18 se despliega al aumentar la temperatura como así tampoco calcular los parámetros termodinámicos propios de esta reacción. Sin embargo es posible considerar al parámetro  $Tm_a$  (temperatura media aparente de desnaturalización) como indicador de la estabilidad térmica de P18. La  $Tm_a$  de P18 obtenida fue de 89°C, temperatura elevada si consideramos que se trata de una proteína proveniente de un organismo mesofílico.

Resultó interesante obtener el valor de  $Tm_a$  del intermediario pentamérico obtenido mediante acidificación de la muestra proteica o por incubación de la misma con 2,3 M GdnHCl. Como se observa en la Figura 22b, en dichas condiciones, las  $Tm_a$  disminuyeron notablemente. Coincidentemente, en ambos casos se obtuvo un valor de  $Tm_a$  de 69 °C ( $\Delta Tm_a = 20$  °C). Analizando con mayor profundidad este resultado y relacionándolo con los obtenidos anteriormente, se barajaron dos posibilidades: La primera, es que la asociación de los pentámeros en una estructura de mayor tamaño contribuye a la estabilidad global de P18. Con esto estamos asumiendo que las diferencias observadas en la estabilidad térmica ( $\Delta Tm_a = 20$  °C) se debieron al aporte de los contactos que se establecen durante la asociación de los pentámeros. La segunda alternativa es que la disminución en la  $Tm_a$  observada sea a causa del efecto de los desnaturalizantes (pH ácido o GdnHCl) sobre los pentámeros

libres, afectando la estabilidad conformacional de los mismos. Existen algunos datos experimentales que sustentan la primera de las posibilidades, entre ellos, la coincidencia de los valores de  $T_{m_a}$  de los intermediarios pentaméricos; otro dato es que los pentámeros libres estabilizados en una u otra condición, poseen el contenido de estructura secundaria inalterado en comparación a cuando formaban parte del decámero (Figuras 18 y 21). Sería necesario evaluar la estructura terciaria de cada uno de los pentámeros a fin de poder concluir al respecto.

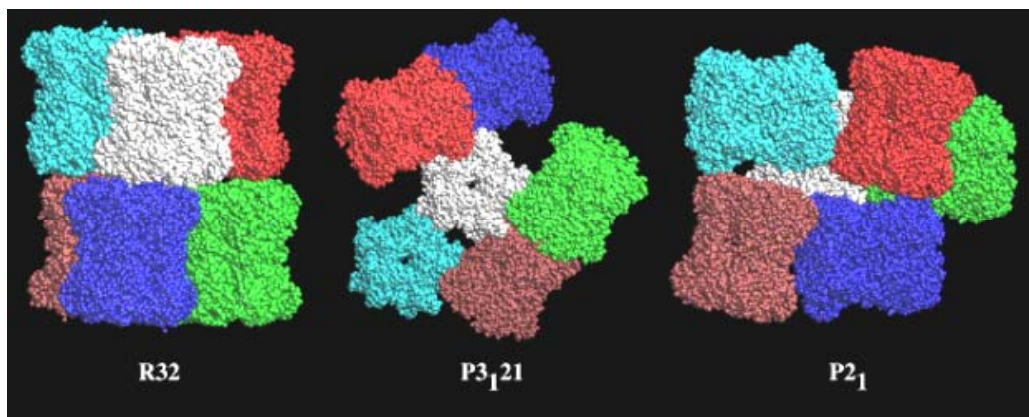
**Figura 22. Estabilidad térmica de P18 y del intermediario pentamérico.** (a) Estabilidad térmica de la proteína nativa (en PBS ó buffer fosfato pH 7,0). Se midió la variación en la señal de DC UV lejano (a 222 nm) en función del incremento de temperatura (de 25 a 100°C a una velocidad de 4 °C/min). Se tomaron medidas de DC cada intervalo de 0,5 °C. La  $T_{m_a}$  se calculó como el punto medio de la transición. (b) Se midió la transición térmica de muestras proteicas previamente incubadas en buffer 50 mM citrato pH 5,0 ó en buffer 50 mM fosfato, pH 7,0 conteniendo 2,3 M GdnHCl.



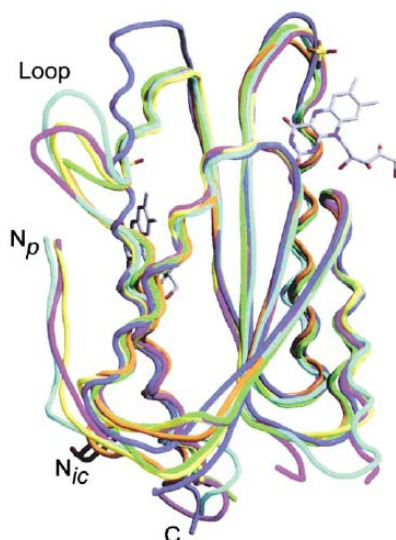
**Estudios cristalográficos de P18.**

Los estudios cristalográficos confirmaron el rearrreglo cuaternario propuesto para P18 y permitieron profundizar en la caracterización de las interfaces de contacto entre monómeros y pentámeros que la forman. P18 fue cristalizada en diversas condiciones: en buffer de pH 4,8 o pH 6,5 y en presencia o no del análogo de sustrato (5-nitro-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona: **NRP**). Independientemente de la condición de cristalización, se determinó que la estructura cuaternaria de P18 esta formada por 10 monómeros idénticos dispuestos en dos pentámeros los cuales se asocian generando la estructura decamérica nativa (Figura 23). Al superponer la estructura de un monómero de P18 con la estructura del monómero de una LS de tipo pentamérica o icosaédrica (Figura 24); se logró comprender la importancia de la región

**Figura 23. Tres formas cristalinas de P18.** En los tres tipos de grupos especiales en que P18 cristalizó (R32, P3<sub>1</sub>21, P2<sub>1</sub>), el grado de estructura cuaternaria fue el mismo. P18 se pliega como dímero de pentámeros (cada decámero se marca en un color diferentes).

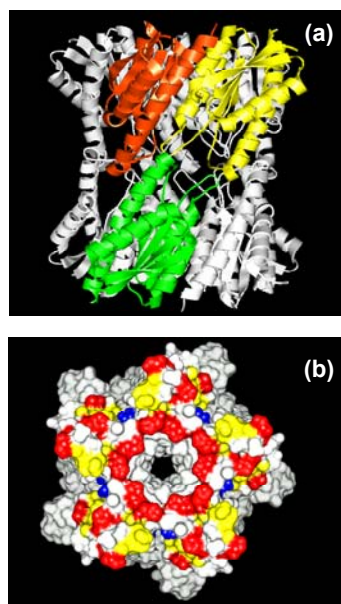


comprendida entre las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ , y su implicancia estructural. Como se mencionó anteriormente, las LS icosaédricas poseen un pequeño bucle comprendido entre estas hélices, cuyos residuos están involucrados en el contacto entre monómeros de pentámeros adyacentes, durante la formación de la estructura icosaédrica. En comparación, las LS de tipo pentaméricas poseen un bucle en esa misma región que es más protuberante, a causa de una inserción de 4 residuos, lo cual no favorece la interacción entre pentámeros. P18 también posee una inserción en esta región, pero en lugar



**Figura 24. Comparación entre monómeros de diferentes LS.** P18 (azul), LS pentaméricas (amarillo, celeste y magenta), LS icosahédricas (verde y naranja) (Gerhardt 2002).

de un bucle, los residuos presentes contribuyen en la estabilización de una hélice  $\alpha 4/\alpha 5$  continua. En dicha estructura secundaria se encuentran comprometidos 32 residuos (entre los aminoácidos 122 a 153). Los residuos que forman parte de esta hélice alargada a su vez, son los responsables en su mayoría de interactuar con residuos pertenecientes a monómeros del pentámero enfrentado (Figura 25a), estabilizando los contactos entre los mismos y colaborando en la formación del decámero. Estas observaciones indican que la particular estructura cuaternaria de P18 depende en gran parte de las características de esta zona del monómero. Analizándola con mayor detalle, se observó que está compuesta por un alto número de histidinas (7 histidinas en un segmento de 16 residuos). En la Figura 25b, se puede notar que las histidinas se ubican en la zona de contacto entre pentámeros, coronando dicha interfaz. No resultó extraño encontrar que la misma región presenta una dependencia estructural importante con el pH del buffer de cristalización: La estructura resuelta a pH 6,3 mostró que 5 de las 7 histidinas de cada monómero están involucradas en contactos con el pentámero enfrentado, mediante contactos tipo van der Waals y puentes salinos entre imidazoles. En la estructura resuelta a menores pH (menores a 6,0) se observó una pérdida de algunos de éstos contactos, adjudicada a la repulsión de las cargas entre histidinas protonadas. Este resultado explica el motivo por el cual el pH ácido induce la disociación del decámero, tal como se observó experimentalmente.



**Figura 25. Diferentes vistas del decámero de P18.** (a) Vista de frente, notar el compromiso de la hélice  $\alpha 4\alpha 5$  en el contacto entre pentámeros. (b) Vista de la cara de contacto pentámero-pentámero de P18. En rojo se señalan las histidinas y en amarillo las fenilalaninas.

Se analizó detalladamente el número y tipo de contactos que estabilizan la estructura polimérica de la proteína (Tablas 4 y 5). Según este análisis, si consideramos que cada monómero de P18 posee  $8026,8 \text{ \AA}^2$  de área de superficie total accesible al solvente (ASA: correspondiente al monómero aislado plegado en solución), al formarse la estructura pentamérica, se ocultan  $2847,7 \text{ \AA}^2$  de dicha área de superficie (corresponde a un 35,5% del área de superficie total de cada monómero). Este ocultamiento se debe a la interacción de un monómero con otros dos monómeros pertenecientes al mismo pentámero. La mayor parte del área de superficie oculta es no polar (64,8%, Tabla 4). El pentámero resultante presenta una estructura entrelazada, estabilizada predominantemente por contactos de tipo Wan der Waals (245 contactos van der Waals por monómero, Tabla 5). Cada monómero también aporta 6 puentes de hidrógeno y 1 puente salino en la estabilización del ensamblado pentamérico. Por otra parte,  $736 \text{ \AA}^2$  del área de superficie accesible de cada monómero, se oculta al formarse la estructura decamérica,

(equivalente al 9,2% del total de su ASA). La mayor parte de ese área de superficie es no-polar (61,5%) y la interacción entre pentámeros está principalmente estabilizada por contactos de tipo hidrofóbicos (92 contactos van der Waals por monómero). Cada monómero aporta 2 puentes de hidrógeno que estabilizan a la estructura decamérica. Llamativamente hay 10 grupos fosfato que forman 20 puentes de hidrógeno en la interfaz de contacto entre pentámeros. En total, cada monómero de P18 oculta un 45% de su área de superficie accesible al formar parte de la estructura decamérica, estableciendo contactos mayoritariamente de tipo hidrofóbicos tanto con monómeros de un mismo pentámero como así con monómeros pertenecientes al pentámero enfrenteado (Tabla 4). Notar que se oculta mayor área de superficie accesible de un monómero cuando éste forma la estructura pentamérica que cuando forma el decámero.

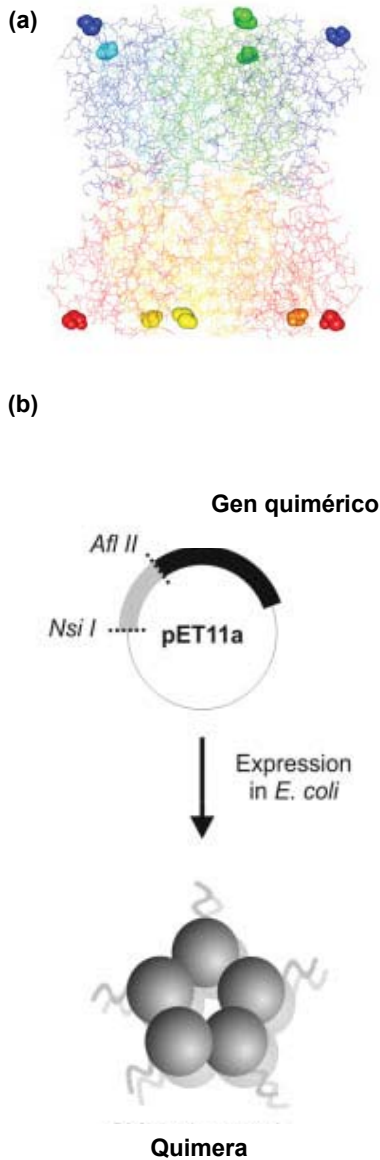
En conclusión, el análisis cristalográfico de P18 permitió por un lado, identificar algunos de los motivos estructurales íntimamente involucrados en la disposición decamérica de P18 y, por otro lado, permitió comprender a fondo las características de las interfaces de contacto entre sus subunidades. Esto último junto con los resultados del análisis conformacional y termodinámico de P18, llevó a postular un mecanismo integrado de disociación y desplegamiento de P18, el cual se detalla en la discusión de la Tesis.

	Total ASA	$\Delta$ ASA	$\Delta$ ASA	$\Delta$ ASA
	Monomero ( $\text{\AA}^2$ )	Pentámero ( $\text{\AA}^2$ )	Penta-Penta ( $\text{\AA}^2$ )	Total del decámero ( $\text{\AA}^2$ )
Área total	8026.8 (100%)	2847.7 (35.5%)	736.0 (9.2%)	3583.7 (44.6%)
Área polar	3262.8 (40.6%)	1003.2 (35.2%)	283.2 (38.5%)	1286.4 (35.9%)
Área no polar	4764.0 (59.4%)	1844.5 (64.8%)	452.8 (61.5%)	2297.3 (64.1%)

**Tabla 4. Análisis de las áreas de superficie de las interfaces monómero- monómero o pentámero- pentámero.** Se muestran las áreas de superficie ocultas polares o no polares ( $\Delta$ ASA) de un monómero en la interacción de él con otro perteneciente al mismo pentámero o de él con otro monómero del pentámero adyacente. Todos los cálculos fueron realizados utilizando una sonda de una molécula de agua de radio de 1,7Å.

	Contactos totales	P.H	Puente salino	Van der Waals	Puente Fosfato		Aguas	
					Número	P.H	Número	P.H
Interfaz								
Monómero- monómero	252	6	1	245	0	0	2/3	6
Interfaz								
Pentámero- Pentámero	94	2	0	92	10	20	0	0

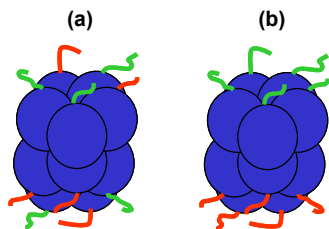
**Tabla 5. Contactos polares y no-polares, puentes iones fosfatos y moléculas de agua en interfaces monómero-monómero o pentámero-pentámero.** Se tomó a un átomo aceptor o dador de unión puente de hidrógeno cuando la distancia entre ellos no superó los 3,4 Å, con un ángulo mayor a 90°. Se definió a un puente salino cuando los átomos cargados estaban en una distancia entre ellos menor o igual a 3.9 Å. Todos los contactos no-polares fueron calculados usando un cut-off de 4,0 Å.



### Obtención de quimeras mixtas según el modelo de desplegamiento de P18.

Según se mencionó en la Introducción de ésta tesis, P18 es un potente inmunógeno cuando es utilizado como antígeno soluble o bien como vacuna a ADN (Velikovsky 2000; Velikovsky 2002). Por otra parte, varios estudios preliminares demostraron que era posible insertar péptidos foráneos en el extremo amino terminal de P18 sin modificar la estructura y estabilidad general de la proteína (Braden 2000, Laplagne 2002). Estas dos características de la proteína, junto con los resultados presentados hasta el momento respecto a la estabilidad conformacional de P18 y su novedosa estructura cuaternaria, constituyeron la base de la investigación sobre la utilización de P18 como carrier de péptidos foráneos (variantes quiméricas de P18). Una quimera de P18 es una proteína la cual tiene reemplazado el propio extremo amino terminal por una secuencia polipeptídica foránea de especial interés, principalmente inmunológico (Figura 26). Como parte de estos estudios resultaba interesante obtener una molécula que presente simultáneamente diferentes péptidos foráneos. La disposición combinada de distintos péptidos de interés inmunológico bajo un mismo andamiaje (P18), le conferiría a esta molécula (denominada quimera mixta) una capacidad polivalente, combinando los efectos individuales de cada uno de ellos (por ejemplo utilizando epitopes T junto con péptidos troyanos). Esto último podría representar una gran ventaja en el desarrollo de vacunas acelulares y en otras aplicaciones biomédicas, aportando un modo de regular la respuesta inmune. La estrategia general utilizada para la obtención de las quimeras consistió en la modificación, por técnicas de biología molecular, de la secuencia codificante de P18, clonada en el vector pET11a. En ella, se reemplazó el extremo correspondiente al amino terminal de la proteína (SNQSCP) por una secuencia de 42 ó 81 nucleótidos que codificaba para un péptido llamado Ketc1 ó Omp31, respectivamente. La metodología empleada para la obtención de las quimeras se describió en detalle en la Tesis de licenciatura del Lic. Diego Laplagne (Laplagne 2002, Laplagne 2004), y brevemente en la leyenda de la Figura 26. Los dos péptidos seleccionados para realizar los primeros ensayos representaban posibles epitopes protectivos contra la infección causada por el parásito *Taenia solium* (Ketc1: APMSTPSATSVRGS) o por la bacteria *Brucella melitensis* (Omp31: NAGYAGGKFKHPFSSFDKEDNEQVSGS). A su vez se diferenciaban en tamaño y punto isoelectrónico (pI), características ventajosas como se verá más

**Figura 26.** (a) Estructura de P18 en la que se marca (esferas de colores) el sitio en el que se ubica el extremo C-terminal del péptido foráneo. (b) Esquema de la estrategia utilizada en la construcción de las quimeras. Se diseñó un vector conteniendo un cassette que permite insertar diferentes oligos que codifican para los péptidos de interés. Para ello, en el extremo N-terminal del gen de P18 se insertaron las secuencias de sitio de corte para Nsi I y Afl II. Los oligos de interés se enviaron a sintetizar conteniendo las mismas secuencias en sus extremos. Posteriormente se utilizó este plásmido para la expresión recombinante de la proteína quimera (Laplagne 2002).



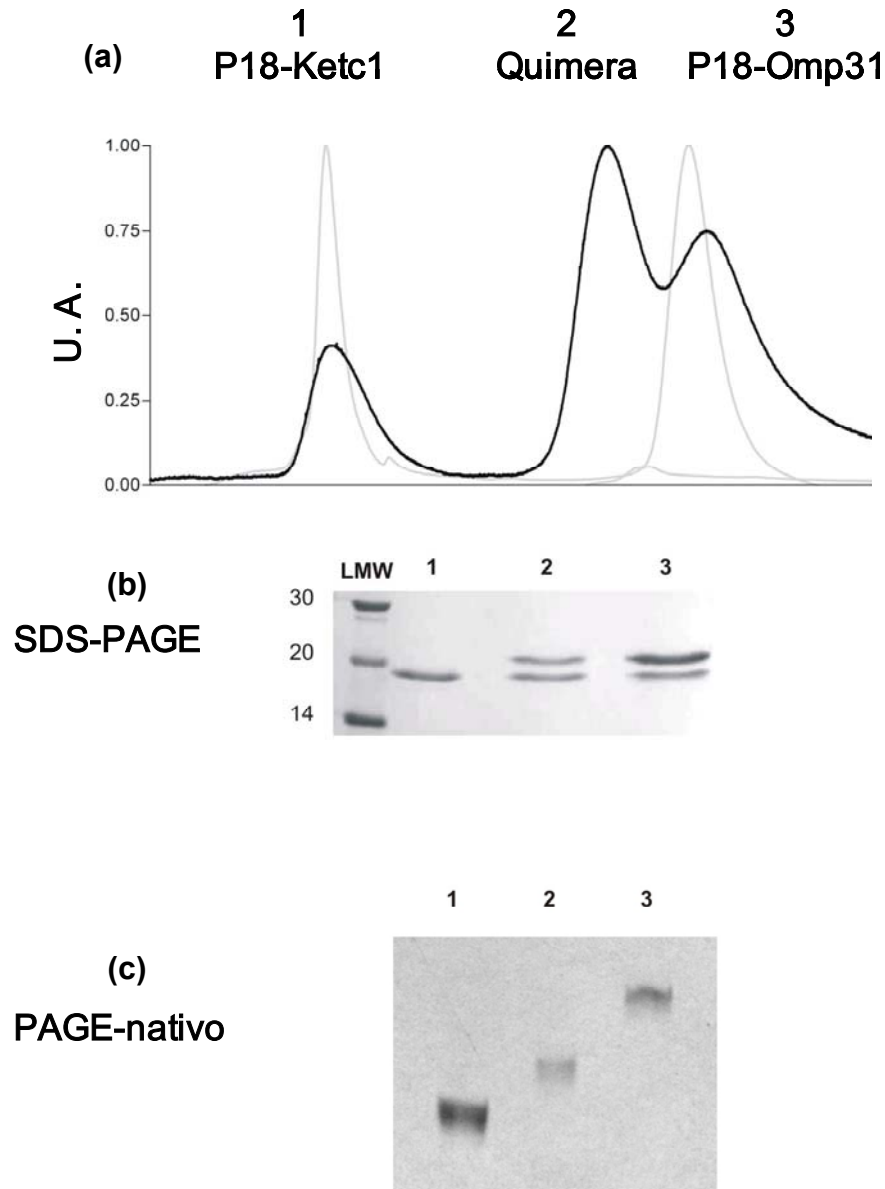
**Figura 27. Esquematización de las quimeras mixtas tipo I ó tipo II.**

**(a)** Las quimeras mixtas tipo I se logran desnaturalizando por completo a cada una de las quimeras de P18 (agregando 3 M de cloruro de guanidinio), y luego realizando el repliegamiento conjuntamente. Así se obtienen decámeros con diferentes proporciones de cada uno de los monómeros. **(b)** Las quimeras mixtas tipo II se logran disociando a cada una de las quimeras (agregando 2,3 M GdnHCl), luego mezclando a los pentámeros (estos no se disocian) y dializando contra buffer nativo (PBS ó 50 mM fosfato, pH 7,0). En verde se esquematiza un tipo de péptido y en rojo el otro.

adelante. El vector pET11a-P18-Ketc1 ó pET11a-P18-Omp31, fue empleado para transformar bacterias competentes *E. coli* DE3. Luego se procedió a la sobreexpresión y purificación separadamente de cada quimera de P18 (P18-Ketc1 ó P18-Omp31), de la misma manera que se reportó para la proteína salvaje. Posteriormente se comprobó que la termoestabilidad y estabilidad termodinámica de las quimeras coincidía con la reportada para la proteína salvaje (Laplagne 2004). Es decir, la presencia de los péptidos foráneos no modifica la estabilidad conformacional de P18. Una vez obtenidas y caracterizadas estructuralmente cada una de las quimeras, se procedió a generar las quimeras mixtas. El conocimiento del mecanismo de desplegamiento de P18 inducido por GdnHCl, permitió pensar en diferentes estequiometrías y orden espacial posibles de los péptidos en el carrier, dicho de otro modo, diferentes tipos de quimeras mixtas (Figura 27). Por ejemplo, un tipo de quimera mixta resultaría de desplegar por completo cada una de las quimeras de P18, agregando altas concentraciones de GdnHCl, y en estado desplegado realizar una mezcla equimolar (o no) de ellas, para luego replegar. De este modo se podría obtener una clase de quimera mixta (tipo I) compuesta por una mezcla de diferentes proporciones y ordenamiento en la partícula decamérica de cada uno de los monómeros de P18-Ketc1 y P18-Omp31 (Figura 27a). En el trabajo que mostraré a continuación, se pensó en diseñar otro tipo de quimera mixta. Teniendo en cuenta el mecanismo de desplegamiento de P18 inducido por GdnHCl, se incubó por separado a cada una de las quimeras de P18 con 2,3 M del desnaturalizante, induciendo la disociación de las partículas decaméricas (Figura 19). Posteriormente se realizó la mezcla equimolar proteica y la renaturalización por diálisis contra buffer PBS. La muestra replegada en teoría tendría que estar formada por tres diferentes poblaciones: decámeros formados por la asociación de una sola clase de pentámeros (P18-Ketc1 ó P18-Omp31) y quimeras mixtas (tipo II), formadas por ambos tipos de pentámeros asociados (esquematizado en la Figura 27b). Es importante aclarar que según los valores termodinámicos de los equilibrios de disociación y desplegamiento de P18, y dadas las concentraciones de desnaturalizante y proteína en que se trabajó, resultaba improbable encontrar una quimera mixta en la cual coexistiesen en un mismo pentámero diferentes tipos de subunidades. Las diferentes poblaciones presentes en la mezcla de repliegamiento fueron separadas por una columna de intercambio iónico (mono-Q), previamente equilibrada con buffer A (50 mM Tris, pH 8,5). En paralelo se corrieron bajo las mismas condiciones, muestras de cada una de las quimeras (muestras control)



(Figura 28a). En la corrida de la muestra proveniente del replegamiento, se pudieron distinguir tres picos proteicos: El primero (pico 1) eluyó a menores concentraciones de buffer B (50 mM Tris, 1M ClNa, pH 8,5) y coincidió con el pico de P18-Ketc1. El segundo (pico II) eluyó a concentraciones intermedias de buffer B y estuvo ausente en la corrida de las muestras control. El tercero (pico III) correspondió con el pico de P18-Omp31 (presentó contaminación del pico anterior). Las diferencias en los porcentajes de buffer B requeridos para la elución de que cada quimera se relacionó con sus diferencias en los  $pI_s$ , ( $pI = 7,2$  para P18-Ketc1 ó  $pI = 6,35$  para P18-Omp31). Coincidiendo con nuestra suposición, solamente se observó una fracción intermedia, lo cual indica que durante la diálisis ocurrió una combinación de pentámeros y que los mismos en ningún momento sufrieron una disociación y reasociación de sus subunidades. Las muestras eluidas de la columna fueron colectadas y analizadas por electroforesis con geles de poliacrilamida desnaturalizantes (Figura 28b, SDS-PAGE) o nativos (Figura 28c, PAGE-nativo). Como se puede ver en la Figura 28b, la fracción que eluyó en condiciones intermedias (pico II, calle 2) estaba compuesta estequiométricamente por subunidades de dos tamaños diferentes: la más pesada corresponde a P18-OMP31 (197,780 Da), y otra de un tamaño menor coincidente con el PM de las subunidades de P18-Ketc1 (182,220 Da). El análisis de la misma fracción (pico II, Figura 28c, calle 2), mediante PAGE-nativo reveló que se trataba de una sola especie molecular, ya que corría como una única banda intermedia entre una partícula decamérica de P18-Omp31 y otra de P18-Ketc1. Es decir, el decámero reconstituido estaba formado por dos pentámeros, cada uno presentaba homogéneamente un péptido foráneo distinto. Por lo tanto, según la condición de disociación inicial y la metodología separativa posteriormente implementada, fue posible generar y aislar esta clase de quimeras mixtas. Independientemente de los múltiples usos inmunológicos ó tecnológicos que se les pueden atribuir a estas moléculas, los resultados obtenidos validan el mecanismo de disociación y desplegamiento propuesto para P18, presentando una manera distinta de evidenciar la existencia del intermediario pentamérico de P18 y a su vez otorgando una metodología para la preparación de las quimeras mixtas.

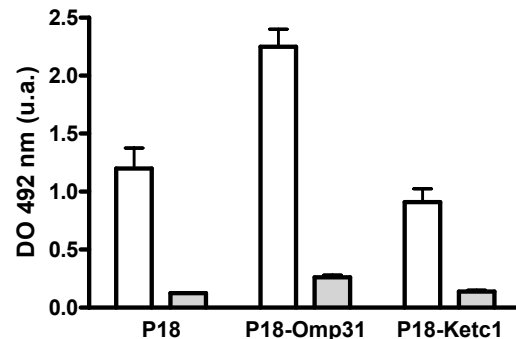


**Figura 28. Obtención de quimeras polivalentes (quimeras mixtas tipo II).** (a) Cromatogramas obtenidos de tres corridas de mono-Q superpuestas. En negro se muestra el cromatograma de la muestra de quimeras disociadas, mezcladas y reasociadas. El pico II corresponde a la fracción de quimeras mixtas. En gris se muestra los cromatogramas de cada una de las quimeras por separado (control). El buffer de siembra fue 50 mM tris, pH 8,5 (buffer A) y el buffer de elución fue el mismo con el agregado de 1M ClNa (buffer B), se utilizó un gradiente lineal (de 0 a 100% de B en 30 min). (b) Análisis por SDS-PAGE del pico de quimeras mixtas (pico II). LMW, representa los PM de los marcadores de peso molecular (c) Análisis del pico II en un PAGE nativo. Calles 1, 2 y 3 corresponden a P18-Ketc1, quimera mixta y P18-Omp31, respectivamente.

Por último se realizó una inmunización murina con la quimera mixta de tipo II. La Figura 29 muestra los resultados de un ELISA, utilizando sueros

provenientes de ratones inmunizados (3 dosis) con una muestra proteica correspondiente al pico de elución intermedio (pico II, Figura 28a). Sobre la placa de ELISA se adsorbieron los péptidos Ketc1, Omp31 o bien la proteína P18; de manera de cuantificar los anticuerpos contra cada uno de los péptidos o carrier, específicamente. Se puede ver claramente que la inmunización con la quimera mixta promovió una respuesta fuerte contra los dos tipos de péptidos insertados. Posteriormente se comprobó que esta respuesta se logra aún en ausencia de adyuvante (resultados no publicados). Cabe resaltar que la inmunización con los péptidos (Ketc1 ó Omp31) no provoca respuesta inmunogénica alguna. Es decir, a partir de este resultado también se puede demostrar la capacidad adyuvante del propio carrier. Por otra parte, se confirmó que P18 como carrier es capaz de presentar simultáneamente al sistema inmunológico dos epitopes peptídicos foráneos distintos. Como se observa en la Figura 29, los sueros presentaron a su vez una alta respuesta contra la proteína carrier. Los resultados de este trabajo alentaron a continuar con investigaciones sobre la utilización de P18 como carrier de múltiples péptidos e incluso dominios proteicos enteros, presentados al sistema inmunológico de manera polivalente (Laplagne 2004; Craig 2005). Estos trabajos constituyeron la base para el desarrollo de un método novedoso de vacunación acelular.

**Figura 29. Inmunogenicidad de las quimeras mixtas P18-OMP31-Ketc1.** En una placa de ELISA se inmovilizaron muestras de P18 ó de los péptidos Omp31 ó Ketc1. Posteriormente se ensayaron los sueros de ratón inmunizados con P18-Omp31-Ketc1 en adyuvante completo de Freund (muestra obtenida del pico II de la corrida de mono-Q) (barras vacías). Como control se utilizó suero normal de ratón (barras grises). En todos los casos se utilizó una dilución de los sueros de 1/100.



## **Parte B**

**“Mutantes de estabilidad  
conformacional reducida y de  
triptofano”**

Ciertos resultados obtenidos en el laboratorio (Goldbaum 1999; Baldi 2000; Craig 2005; Berguer 2006) sugerían que el arreglo polimérico de P18 estaría directamente relacionado con su alta inmunogenicidad y capacidad adyuvante. Los resultados presentados en la primera parte de esta tesis mostraron que P18 es una proteína conformacionalmente muy estable. Valiéndonos de los conocimientos estructurales adquiridos, nos preguntamos si era posible modular la respuesta inmunológica de P18 modificando su estabilidad conformacional. Para ello, se pensó en diseñar racionalmente diferentes mutantes puntuales de la proteína, sustituyendo en cada una un residuo implicado en múltiples contactos entre subunidades. De la misma manera que se realizaron los estudios conformacionales de la proteína salvaje, se buscó analizar el impacto de cada una de las mutaciones en la estabilidad conformacional de P18. Es de esperar que alguno de los cambios realizados altere la estabilidad estructural de P18, pero no su plegamiento general. Aquellas variantes de P18 que presenten una estabilidad conformacional reducida serán evaluadas en un futuro respecto a su capacidad inmunogénica o de carrier de péptidos.

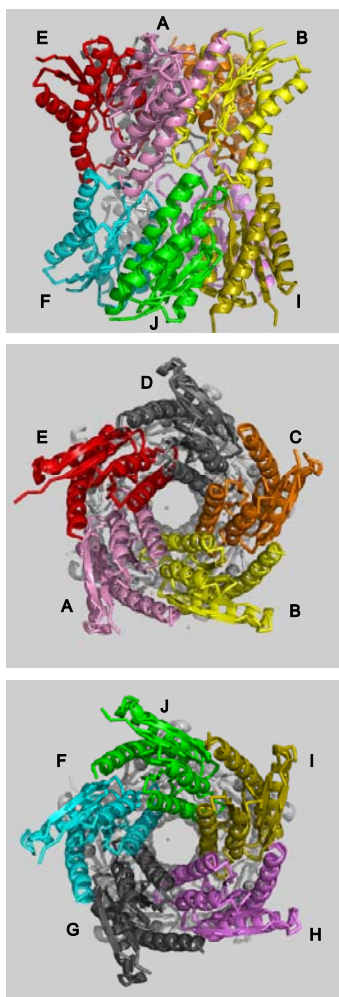
A su vez, el análisis estructural detallado de las diferentes mutantes puntuales nos permitirá conocer la contribución de cada uno de los contactos removidos en la estabilidad general de P18, y de cómo estos influyen sobre los demás componentes no modificados.

Por otra parte, según el análisis mostrado en la Parte A, durante la disociación de P18, el contenido de estructura secundaria permanece invariable y sólo el monitoreo del PM de la proteína permite identificar al intermediario pentamérico estabilizado por GdnHCl. No fue posible evidenciar la disociación del decámero mediante técnicas fluorimétricas, dada la ubicación del único triptofano de P18. Sin embargo, el conocimiento de la naturaleza de los residuos que están presentes en las interfaces de contacto entre las subunidades, nos persuadió de generar variantes de P18 con un cromóforo en una ubicación estratégica que permitiese monitorear la disociación del decámero así como el desplegamiento de los pentámeros por técnicas de fluorescencia intrínseca del triptofano. Una técnica fluorimétrica tiene la ventaja de permitir realizar los experimentos en tiempos más cortos y generalmente constituye una metodología de mayor precisión y sensibilidad que la técnica de SLS, permitiendo utilizar menores cantidades de proteína para cada ensayo. La obtención de una proteína con dichas características también abriría la posibilidad de realizar ensayos cinéticos de disociación y desplegamiento de P18 (por ejemplo “Stopped-flow”), y serían

*de gran utilidad por ejemplo en el mejoramiento de la metodología de obtención de las quimeras mixtas. Con respecto a esto último, permitiría emplear presión atmosférica junto con el monitoreo de la fluorescencia (técnica desarrollada por Gregorio Weber) para obtener dichas moléculas.*

*Los objetivos puntuales de esta parte de la tesis son:*

- ***Realizar un estudio de las interfaces de contacto entre monómeros de P18 a partir de mutagénesis sitio dirigida.*** Se generarán diversas mutantes y se caracterizará la estabilidad conformacional de ellas en comparación con la estabilidad de la proteína salvaje.
- ***Desarrollar un modelo de estudio de la relación entre estabilidad conformacional e inmunogenicidad.*** A partir del estudio estructural de las diversas mutantes de P18 se seleccionarán aquellas que presenten una estabilidad conformacional reducida. Se planteará la evaluación de ellas en cuanto a su capacidad de inducir respuesta inmunogénica o como adyuvante de péptidos foráneos.
- ***Generar una mutante de P18 capaz de sensor cambios en la fluorescencia intrínseca durante la disociación del decámero.*** Para ello, se seleccionarán algunos residuos presentes en la interfaz de contacto pentámero-pentámero y se medirán las señales espectroscópicas de las mismas durante la disociación.

**I). Mutantes de estabilidad conformacional reducida.****Obtención y caracterización de mutantes de interfaz de contacto.**

**Figura 30. Denominación de los monómeros que conforman a la estructura decamérica de P18** (Figura superior). Los monómeros A (rosa), B (amarillo), C, D y E (rojo) conforman un pentámero (Figura medio) y los monómeros F (celeste), G, H, I y J (verde) del pentámero enfrentado (Figura inferior).

Con el fin de obtener mutantes puntuales de estabilidad conformacional reducida, se postuló el siguiente criterio de selección de los residuos a sustituir: En primer lugar, se analizaron tanto la superficie de contacto entre pentámeros como entre monómeros de un mismo pentámero. De todos los residuos presentes en dichas superficies, se seleccionaron aquellos involucrados en múltiples contactos. De este modo, la sustitución de alguno de estos residuos producirá una disminución del área de superficie de contacto entre subunidades. Se optó por comenzar a estudiar el efecto de la pérdida de los contactos generados por los residuos: Y57, L61, Y87, F91, M101, L105, H119, H120, H134 y I153. En cada caso se realizaron sustituciones por alanina (alanine-scanning), anulándose así los contactos efectuados por la cadena lateral de dicho aminoácido seleccionado (a partir del carbono beta). A fines prácticos, nombraremos como A, B, C, D y E a los monómeros que forman parte de un mismo pentámero, y F, G, H, I y J a los monómeros que constituyen el pentámero enfrentado (Figura 30). En la Tabla 6 se resume el área de la superficie de contacto que se afecta en teoría para cada mutante de P18, calculada por monómero. Este valor fue computado en forma teórica (utilizando el software CSU), a partir de la estructura tridimensional de la proteína, tomando al monómero “A” como modelo y considerando que los otros monómeros que conforman a la proteína perderán la misma área de superficie de contacto que el monómero de estudio. Según este análisis, algunas de las mutantes perderán contactos entre monómeros de un mismo pentámero (A-B) y/o contactos entre pentámeros (A-J ó A-F) (Figura 30). Por ejemplo, en teoría el monómero A de la variante P18-L105A, tendrá  $109,3 \text{ \AA}^2$  menos de área de superficie de contacto con el monómero B en comparación con el mismo en la proteína salvaje. Si consideramos a la partícula decamérica, esta variante de P18 podrá tener  $1093 \text{ \AA}^2$  menos de área de superficie de contacto que la proteína salvaje. El área de superficie afectada en esta mutación representa sólo entre un 4 y 5% del total de área de superficie que se oculta durante la asociación de los monómeros en una estructura pentamérica ( $2847,7 \text{ \AA}^2$ , Tabla 6). En el caso del monómero A de la variante P18-H120A, hipotéticamente tendrá  $83,8 \text{ \AA}^2$  de área de superficie de contacto menos que la proteína salvaje, y perderá contactos que originalmente estabilizaban a los pentámeros entre sí (contactos A-F ó A-J). En este caso, el residuo H120 no aporta contactos para la estabilización de la interacción entre

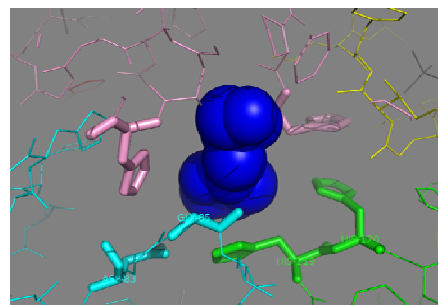
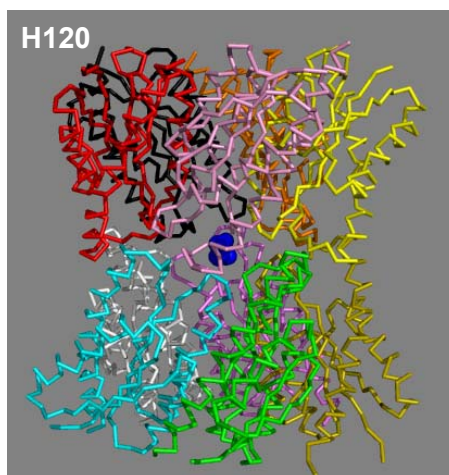
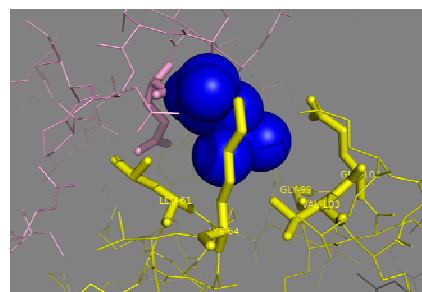
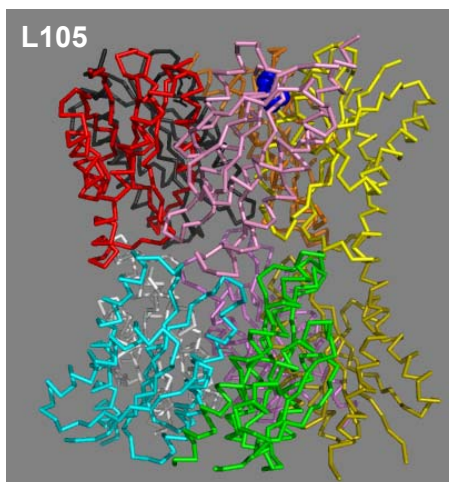
monómeros de un mismo pentámero, y por lo tanto el área de superficie que se afecta representa un 11% del área de superficie total ocluido durante la formación del decámero ( $736\text{Å}^2$ , Tabla 6). La Figura 31 muestra los residuos L105A y H120A pertenecientes al monómero A (éstos se repetirán en cada uno de las subunidades) y una ampliación en la que se muestran los residuos con los cuales interactúan. En todos los casos hablamos de pérdidas de área de superficie teóricas, ya que cabría la posibilidad que la perturbación realizada afecte la topología de plegamiento de la proteína ó que existan cambios en la estabilidad de otros enlaces de la red de interacciones que pudieran compensar los efectos de dicha mutación.

Mutante de P18	Contactos entre monómeros ( $\text{Å}^2$ ) <sup>a</sup>	Contactos entre pentámeros ( $\text{Å}^2$ ) <sup>b</sup>	% del área ocluida en la formación del pentámero ( $2847,7\text{Å}^2$ ) <sup>c</sup>	% del área ocluida en la formación del decámero ( $736\text{Å}^2$ ) <sup>d</sup>
L61A	112,9 (A-E)	-	4	0
L105A	109,3 (A-B)	-	3,8	0
M101A	104,9 (A-B)	-	3,7	0
F91A	112 (A-E)	-	4	0
Y87A	137,2 (A-E)	-	4,8	0
I153A	101,3 (A-B)	-	3,6	0
H134A	50,6 (A-B)	40,8 (J)	1,8	5,5
H120A	0	14,5 (A-F) + 69,3 (A-J)	0	11,4
H119A	112,3 (A-B)	19,4 (J)	4	2,6

**Tabla 6. Cálculo de las áreas de superficie de contacto de las diferentes mutantes de P18.** a) área de superficie de contacto que aporta el residuo correspondiente, en la interacción entre monómeros pertenecientes a un mismo pentámero (la misma representa en teoría el área de superficie que se perderá en la mutante). b) área de superficie de contacto que aporta el residuo correspondiente, en la interacción entre pentámeros c) porcentaje que representa el área de superficie de contacto que aporta cada residuo sobre el total de área de superficie ocluida durante la formación del pentámero. d) porcentaje que representa el área de superficie de contacto que aporta cada residuo sobre el total de área de superficie ocluida durante la formación del decámero. Los valores de área de superficie para cada mutante fueron calculados según el programa LPC/CSU (Sobolev 1999), utilizando el PDB: 1T13, 1XN1 ó 1DI0.



**Figura 31. Ubicación de los residuos L105 y H120 en la estructura tridimensional de P18.** Los residuos de interés fueron indicados sobre el monómero A (rosa) en color azul (estilo esfera). Se utilizó la misma denominación que la implementada en la Figura 30. Se incluyó una ampliación en la que se muestran los residuos con los cuales la L105 ó H120 realizan contactos (trazo grueso).



La técnica por la cual se generaron las mutantes puntuales se describe en materiales y métodos. En todos los casos se verificó la sustitución por secuenciación de los plásmidos empleados para la transformación de las bacterias competentes en los ensayos de sobreexpresión de las proteínas. Las variantes de P18 fueron obtenidas y purificadas de la misma manera que la proteína salvaje, sin tener mayores dificultades durante estos procedimientos. En la generalidad de los casos la masa total de proteína obtenida fue aproximadamente de 35 mg por ml de cultivo, exceptuando los casos de las mutantes L105A y M101A en las que la masa obtenida fue bastante menor (entre 4 y 10 mg/ml de cultivo). Seguidamente, las proteínas fueron evaluadas

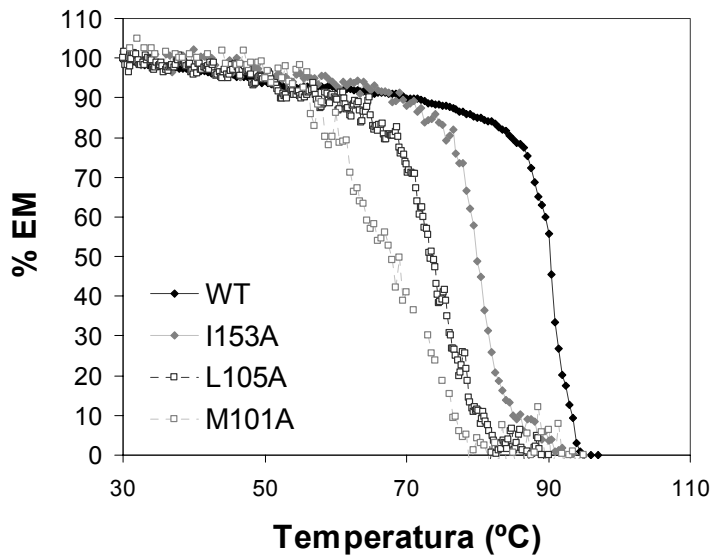
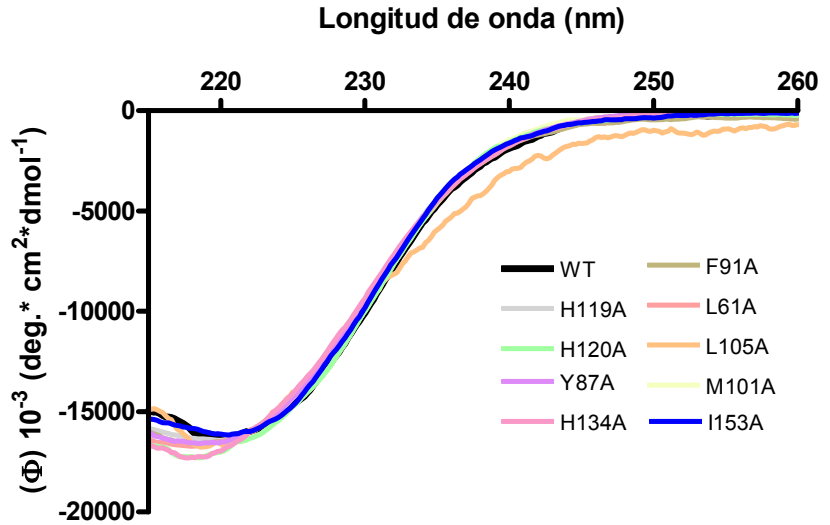
por SLS/IR/UV a fin de determinar el PM de las mismas. En todos los casos el PM calculado de las variantes de P18 coincidió con el valor del PM de la proteína salvaje (resultado no mostrado). Esto indica que las mutaciones realizadas en P18 no afectaron la capacidad de formación de la partícula decamérica, lo cual resulta un control importante, principalmente para aquellas mutantes en las que se modificaron residuos importantes de contacto entre pentámeros. Por el alto número de interacciones que estabilizan la interfaz de contacto entre pentámeros, es de esperar que se necesite más de una modificación para interferir en la formación del decámero. Lo mismo se supone con la formación de los pentámeros. A juzgar por los espectros de DC UV-lejano, todas las mutantes de P18 presentaron un grado de estructura secundaria comparable con el de la proteína salvaje (Figura 32). Este resultado muestra que las diversas modificaciones no interfirieron en la polimerización ni en la formación de la estructura secundaria, es decir sólo se esperan cambios marginales en la estabilidad conformacional de las proteínas a causa de las mutaciones introducidas.

#### ***Estabilidad conformacional de las mutantes de P18.***

Como se mostró anteriormente, la determinación de la  $Tm_a$  de una muestra es una mediada útil a fin de detectar cambios en la estabilidad conformacional de P18 (ver Figura 22). Por lo tanto como primera medida de la estabilidad conformacional de las mutantes puntuales, se midió la temperatura de desnaturalización ( $Tm_a$ ) de las mismas. La Tabla 7 resume los valores de  $Tm_a$  obtenidos (cabe aclarar que al igual que lo observado para la proteína salvaje, todas las transiciones resultaron ser irreversibles). Según éstos resultados, las sustituciones de los residuos M101 ó L105 por alanina afectaron significativamente la estabilidad conformacional de P18. En estas proteínas se registró una disminución importante de la  $Tm_a$  alcanzando los 13 ó 15 °C de diferencia con respecto a la proteína salvaje (para L105A ó M101A respectivamente) (Figura 33). Las proteínas en las que se sustituyeron los residuos L61, F91 ó I153 por alanina también mostraron una menor estabilidad conformacional, registrándose variaciones en la  $Tm_a$  entre 6 y 7 °C respecto a la proteína salvaje. En el caso de las variantes Y87A, H134A y H119A la modificación introducida produjo leves variaciones en la  $Tm_a$ . La variante H120A presentó la misma estabilidad térmica que la proteína salvaje. No se encontró una relación directa entre el área de superficie afectada en cada mutante ( $\text{Å}^2$ ) con la variación en la estabilidad térmica de las mismas. Es decir,

la disminución en la estabilidad conformacional se relaciona con la calidad de

**Figura 32. Espectros de CD UV-lejano de las diferentes mutantes de P18.** Se graficó la elipticidad molar de cada proteína (calculada según la ecuación 1, ver materiales y métodos) en función de la temperatura. Todas las proteínas se encontraban en el mismo buffer (50 mM fosfato, pH7,0, 1mM DTT)



Mutante de P18	T <sub>m<sub>a</sub></sub> (°C)	ΔT <sub>m<sub>a</sub></sub> (°C)
L61A	81 ± 1*	7
Y87A	86 ± 1*	2
F91A	82 ± 1*	6
M101A	71 ± 1*	17
L105A	75 ± 1*	13
I153A	81 ± 1*	7
H119A	87 ± 1	1
H120A	88 ± 1	-
H134A	86,5 ± 1*	1,5
WT	88 ± 1	-

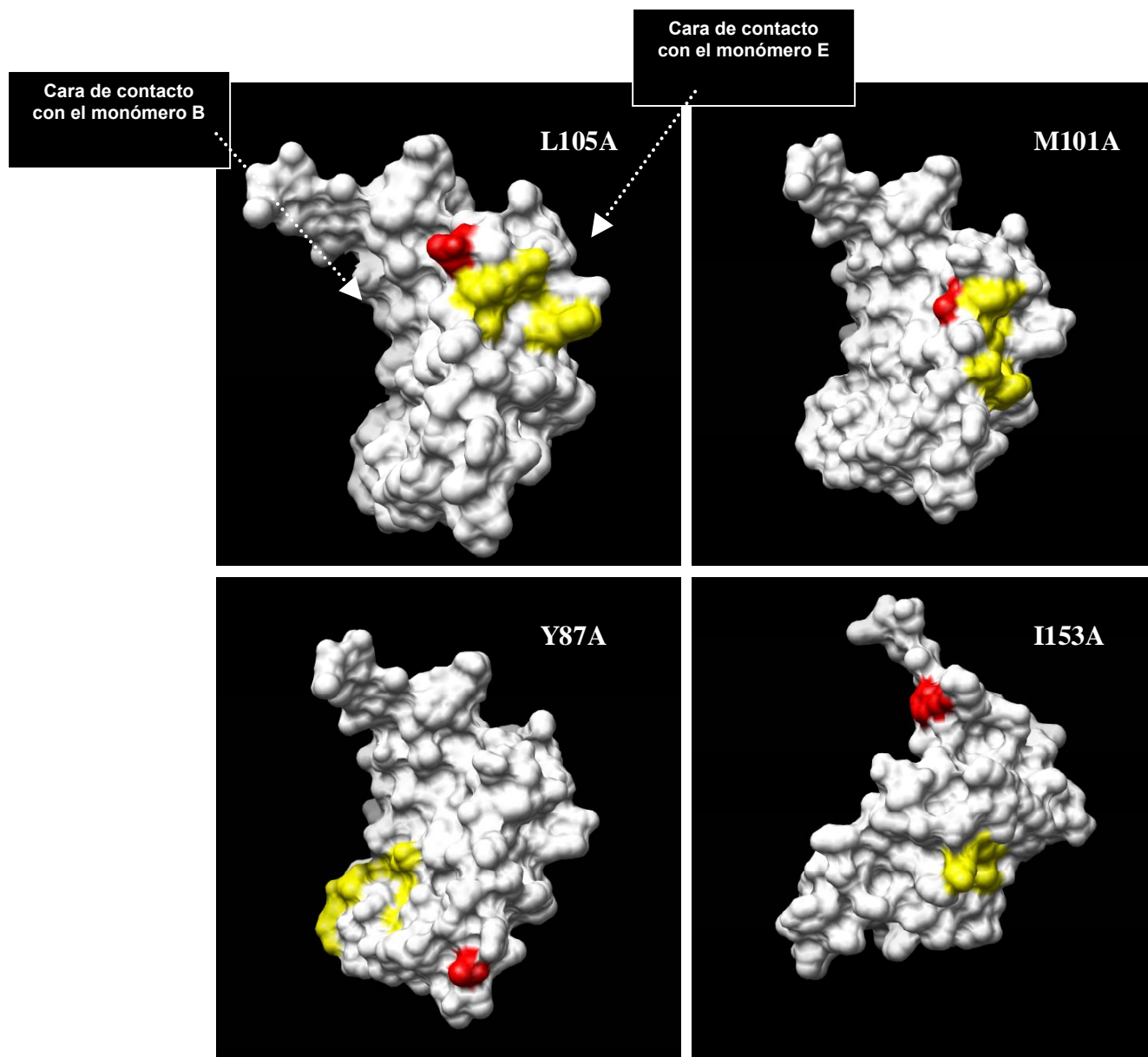
**Tabla 7. Estabilidad térmica de las mutantes de P18.** T<sub>m<sub>a</sub></sub> obtenidos mediante DC de las diferentes mutantes.

**Figura 33. Estabilidad térmica de las mutantes I153A, L105A y M101A determinado por DC.** Se graficó el porcentaje de cambio de elipticidad molar a 222 nm en función del aumento de temperatura. En todos los casos se trabajó con muestras iodoacetiladas y equilibradas en buffer 50 mM fosfato, pH 7,0.

los contactos particulares que se afectaron en cada variante y con la posición espacial en la que se encuentra el residuo y la superficie afectada dentro de la molécula proteica. En este último sentido, y analizando con mayor detalle la posición espacial de los residuos mutados, se puede ver con claridad que el residuo L105, al igual que el residuo M101 del monómero A (Figura 34, en rojo), está contiguo a los residuos del mismo monómero que contactan con el residuo L105 ó M101 del monómero E (Figura 34, en amarillo). Cada una de éstas mutaciones entonces, producirían un volumen continuo que esta siendo truncado. En el caso del resto de las mutantes (Figura 34) las zonas de contacto se encuentran alejadas con lo cual no se produciría una aditividad de los volúmenes truncados. Por lo tanto, la zona en la que están presentes los residuos L105A y M101A será considerada como “Hot Spot” para la estabilización de la estructura cuaternaria de P18. Las mutantes en las cuales se afectaron contactos que estabilizaban la superficie de contacto entre pentámeros (H119A, H120A y H134A), no mostraron grandes variaciones en la estabilidad conformacional (o ninguna en el caso de H120A), a juzgar por los valores de  $Tm_a$  obtenidos (Tabla 7). De estas tres variantes, en el caso de las mutantes H119A y H134A además se perjudicaron contactos que participaban en la estabilización de la superficie de contacto entre monómeros de un mismo pentámero (Tabla 6). Por lo tanto no es posible discriminar si la variación en la  $Tm_a$  observada para las mismas se debe principalmente a una modificación en las redes de enlaces que estabilizaban la unión de los monómeros, de los pentámeros ó por un efecto combinado.

De todas las mutantes, se seleccionaron las dos que mostraron mayor variación respecto a la salvaje (M101A y L105A) y se les midió la estabilidad termodinámica. En estos ensayos se estudió la desnaturalización de las proteínas inducida por GdnHCl, monitoreando el cambio en las señales de DC y FT. Es decir, se estudió el segundo equilibrio (desplegado y disociación concertada de los pentámeros). Las razones por las cuales no se estudió la termodinámica de la disociación del decámero de cada mutante fueron principalmente los requerimientos de las altas cantidades de proteína que se emplea en la técnica de SEC acoplada a SLS/IR/UV, (éstas fueron las mutantes de las cuales se logró purificar menor masa). Además, cada punto de una curva de SLS/IR/UV implica la estabilización de la columna de SEC con el respectivo buffer, la corrida de la muestra proteica y de la muestra control.

Esto hace que la caracterización de dicho equilibrio se vuelva engorrosa y difícil de llevar a cabo en tiempos cortos. Para las mutantes M101A y L105A, se supuso inicialmente que la modificación introducida alteraría la estabilidad



**Figura 34. Ubicación de los residuos mutados y las zonas de contacto sobre el monómero A.** En rojo se muestra el volumen del residuo analizado sobre una de las caras de contacto monómero-monómero. En amarillo, el volumen correspondiente a los residuos ubicados en la cara opuesta que están involucrados en el contacto con el mismo residuo (del monómero adyacente).

conformacional del pentámero, pero que dicho cambio no interferiría con la asociación de los mismos.

En el laboratorio se adquirió recientemente un nuevo equipo de medición de scattering de luz, de mayor sensibilidad (Nanosizer, MALVERN) y que cuenta con la ventaja adicional de poder realizar las mediciones en una cubeta, sin la necesidad de una columna separativa. Por lo tanto las mutantes M101A y L105A serán reevaluadas en un futuro mediante esta metodología a fin de confirmar dicha presunción. La Tabla 8, resume los parámetros termodinámicos obtenidos. Como puede apreciarse, las dos mutantes presentaron un cambio de energía libre asociada al desplegamiento de los pentámeros ( $\Delta G_u$ ) menor que al obtenido para la proteína salvaje. Lo mismo ocurrió con el valor de  $D_{50}$  y con la pendiente de la curva de desplegamiento. Como se menciono anteriormente,

Mutante de P18	$D_{50}$ (M)	m (kJ/mol*M)	$\Delta G_2$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta G_2$ (kJ/mol)
M101A	2	35	$205 \pm 25$	115
L105A	2,2	25	$200 \pm 19$	120
WT	2,75	68	$320 \pm 30$	-

**Tabla 8. Parámetros termodinámicos de la desnaturalización de las mutantes de P18, inducida por GdnHCl.** Las curvas de desplegamiento de las diferentes mutantes obtenidas mediante DC fueron analizadas de la misma manera que lo reportado para la proteína salvaje (ver materiales y métodos). En todos los casos se utilizó la misma concentración de proteína (10  $\mu$ M de monómeros).

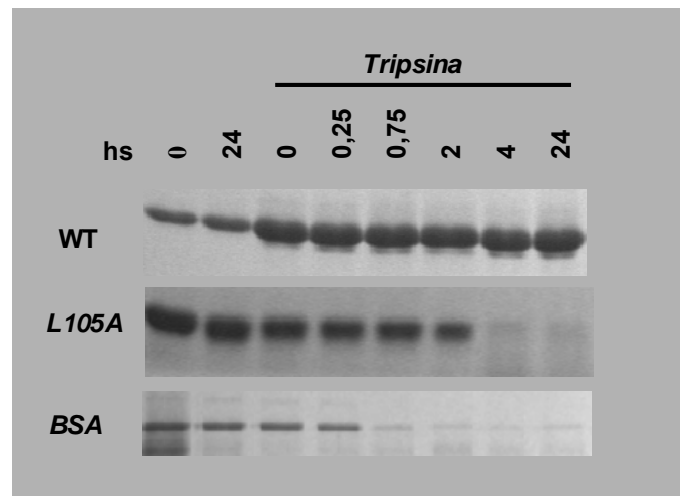
este parámetro está relacionado con el cambio en el área de superficie accesible del estado nativo y desnaturalizado (Courtenay 2000).

El hecho que las mutantes posean una pendiente de desplegamiento menor puede estar relacionado conque, en el estado nativo, las mismas presentan mayor superficie hidrofóbica expuesta en comparación con la proteína salvaje. En el futuro se evaluará la importancia de las interacciones individuales afectadas y el cambio local causado en cada una de las mutantes generadas mediante cristalografía de rayos X. Estos resultados serán relacionados con los

valores experimentales que describen la estabilidad conformacional de las mismas.

Se determinó que P18 es sumamente resistente a la proteólisis en ensayos de digestión *in vitro* utilizando diversas proteasas (papaína, tripsina, quimotripsina) (resultado no mostrado). La Figura 35 muestra un el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en el cual se puede observar que P18 es resistente a la degradación por tripsina aún luego de ser incubada durante 24 h con la enzima. En estos ensayos se utilizó a la proteína BSA como control (la misma comienza a ser degradada luego de los 45 min). En comparación con la proteína salvaje, la mutante L105A se degradó casi en su totalidad luego de dos horas de incubación con la enzima. Esta diferencia puede deberse al grado de compactación de una u otra proteína, relacionado a su vez con la estabilidad

**Figura 35. Proteólisis limitada de P18 y L105A.** Una muestra de P18, L105A ó BSA fue incubada con tripsina a 37 °C durante el tiempo indicado. Pasado dicho lapso, se tomó una fracción, incubó con buffer de corrida, calentó y se sembró en un gel de poliacrilamida al 15 % (SDS-PAGE). Una muestra de cada una de las proteínas utilizadas, fue incubada a 37 °C durante 24 h sin el agregado de tripsina a modo de descartar un evento de degradación no enzimática (ó bien por enzimas presentes en la muestra proteica). En todos los casos, la relación sustrato enzima utilizada fue de 50:1



conformacional de las mismas. Por ejemplo la mutante L105A, termodinámicamente menos estable, podría exhibir alguna secuencia específica para la proteólisis, mientras que este sitio permanecería oculto en la proteína salvaje.

En resumen, se logró obtener mediante mutagénesis sitio dirigida al menos dos variantes de P18 que presentaron la misma estructura cuaternaria global y contenido de estructura secundaria, pero con una estabilidad conformacional reducida (M101A y L105A). En el mismo análisis se identificó una región en la estructura tridimensional considerada como “Hot Spot” importante para la estabilización de la estructura cuaternaria de P18. En general, los “Hot Spot” son responsables de la mayor parte de la energía de unión de una interacción oligomérica (Ali 2005). Esto pudo ser evidenciado por el gran compromiso de estos dos residuos en la estabilidad general de P18. Las mutantes M101A y L105 serán utilizadas como antígenos en ensayos de inmunización murina a fin de evaluar su capacidad inmunogénica. Será de sumo interés determinar si la disminución en la estabilidad conformacional de estas proteínas respecto a la variante salvaje causa alguna modificación en la capacidad inmunogénica o adyuvante de las mismas. De esta manera se implementará un modelo interesante de estudio de la relación entre estructura e inmunogenicidad para un antígeno bacteriano. Adelantándome a los próximos resultados, los ensayos inmunológicos se complementarán utilizando variantes de P18 de mayor estabilidad conformacional que la proteína salvaje.

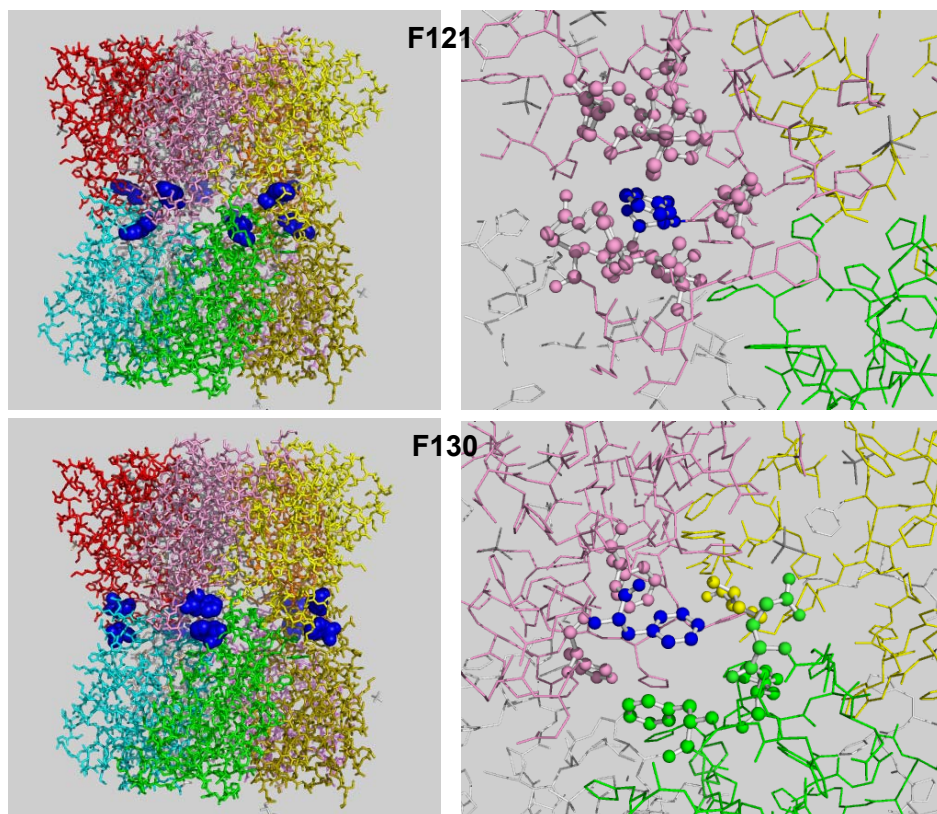


## ***II). Mutantes de triptofano.***

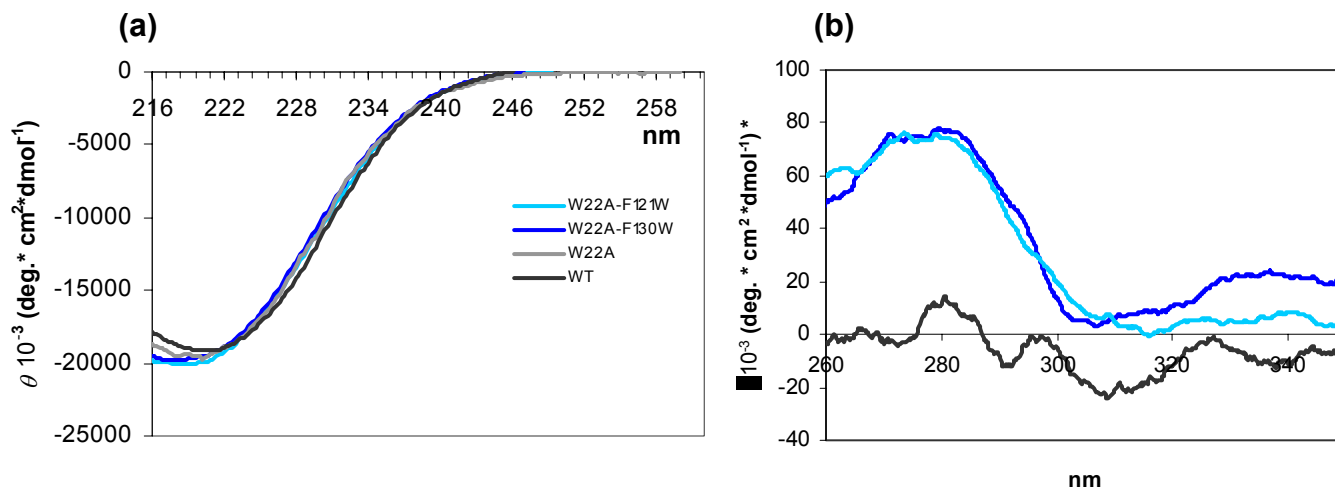
### ***Obtención de P18-W22A-F121W y P18-W22A-F130W.***

El razonamiento que se siguió en la selección de los aminoácidos a mutagenizar, consistió primero en distinguir a los residuos ubicados en la cercanía de las caras de contacto entre pentámeros y ocultos al solvente. Segundo, dado que se deseaba agregar un triptofano en las posiciones elegidas, por ser un cromóforo natural de alta sensibilidad, se tuvieron en cuenta particularmente las fenilalaninas, de manera de producir la menor perturbación posible en la estructura de P18 (mutación conservativa). De todos los residuos posibles, se seleccionaron a las fenilalaninas 121 y 130, ya que estaban comprometidas en un alto número de contactos y en teoría podrían exponerse al solvente o cambiar su orientación durante el desplegamiento de la proteína. La Figura 36, muestra la ubicación de la fenilalanina 121 ó 130 y los residuos con los cuales establecen contactos. Si tomamos como monómero de estudio a la cadena A (Figura 36), entonces la F130 (azul) realiza contactos intra-monoméricos (A-A) con tres residuos diferentes (H127, F131 y H134), contactos con el monómero contiguo (A-B) (ILE 86) y con el monómero de un pentámero enfrentado (A-J) (H127, F130 y E123) (ver denominación de los monómeros en la Figura 30). Estos mismos contactos se repiten en cada una de las subunidades de P18. Por el otro lado, la F121 (Figura 36, en azul) realiza múltiple contactos, pero solamente intra-monoméricos (A-A) (los residuos con quien contacta son: H23, I 26, F80, I 82, H122, E123, H128, F131). Luego de éste análisis, se realizaron las mutaciones puntuales sitio dirigidas en las que cada fenilalanina fue reemplazada por un triptofano y el triptofano natural de la posición 22 por una alanina generando las dos variantes proteicas P18-W22A-F121W y P18-W22A-F130W. La modificación en la posición 22 se realizó con el objetivo de simplificar el número de señales a obtener en la medición de la fluorescencia intrínseca. También se generó la mutante W22A como proteína control, a fin de evaluar una posible modificación en la estabilidad de P18 a causa de la ausencia del triptofano en dicha posición.

**Figura 36.**  
**Ubicación de las fenilalaninas seleccionadas en la estructura tridimensional de P18.** En los paneles izquierdos se muestra la posición de los residuos F121 ó F130 en cada uno de los monómeros de P18 (en azul). En los paneles derechos se muestran los residuos con los que contactan (línea y esfera).



La metodología utilizada en la generación de las mutantes fue la del “mega-cebador”, (descrita en detalle en materiales y métodos). Las proteínas fueron sobreexpresadas en *E. Coli* y purificadas a homogeneidad de la misma manera que la variante natural, obteniéndose un rendimiento aproximado de 30 mg de proteína por litro de cultivo. Seguidamente se calculó mediante SLS/IR/UV el PM de las mismas. En todas los casos fue de 180 kDa (resultado no mostrado), compatible con el PM de una partícula decamérica, indicando que las mutaciones no afectaron la dimerización de los pentámeros. A juzgar por los espectros de DC en el UV-lejano, las variantes proteicas recombinantes se encontraban correctamente plegadas, mostrando espectros superponibles con el de la proteína salvaje (Figuras 37a).



**Figura 37. Espectros de DC de la mutantes de triptofano.** (a) Espectros de DC UV-lejano de las diferentes mutantes de P18. Se graficó la elipticidad molar de las muestras (ecuación 1) en función de la longitud de onda. (b) Espectros de DC UV-cercano de las variantes W22A-F121W (celeste) y W22A-F130W (azul) en comparación con el espectro de la proteína salvaje (negro). Para este ensayo se utilizó una concentración proteica de 100  $\mu$ M de monómero.

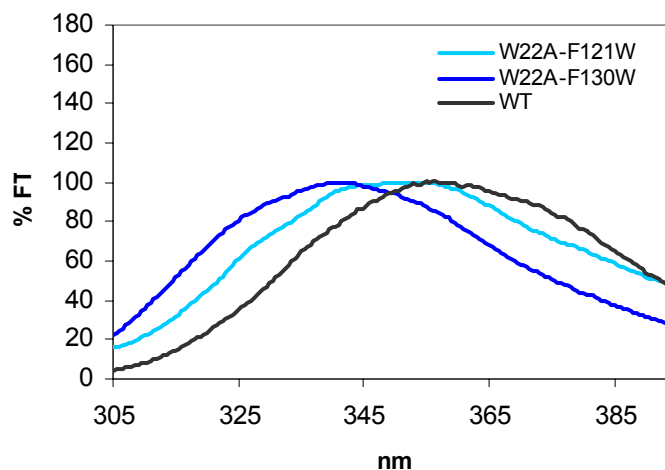
A diferencia de la proteína salvaje, P18-W22A-F121W y P18-W22A-F130W mostraron una importante señal a los 280 nm en el DC UV-cercano (Figura 37b). Esta señal pudo ser asignada al triptofano adicionado (tanto en la posición 121 como 130), indicando que este residuo se encuentra en un entorno asimétrico (oculto al solvente). Los resultados presentados hasta aquí, mostraron que las mutaciones introducidas no modificaban el plegamiento general de la proteína. Sumado a esto, P18 mostró la capacidad de ubicar al triptofano en cualquiera de las dos posiciones.

#### ***Estudios fluorimétricos y de DC de W22A-F121W y P18-W22A-F121W.***

Seguidamente, se realizaron ensayos de fluorescencia de triptofano con las diferentes variantes proteicas. La Figura 38 muestra los espectros obtenidos por FT en condiciones nativas para P18, P18-W22A-F121W y P18-W22A-F130W. Como se puede apreciar, las dos variantes presentaron un máximo de emisión de fluorescencia ubicado en longitudes de onda menores al obtenido para la proteína salvaje (máximo de 340 nm para P18-W22A-F130W, 350 nm para P18-

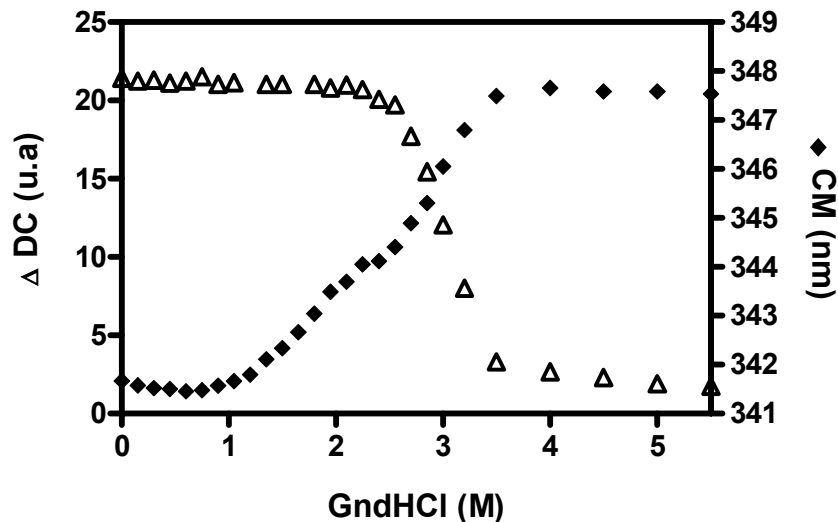
W22A-F121W y 358 nm para P18). Este fenómeno está relacionado con la posición del triptofano en cada una de las diferentes proteínas. Según este resultado, y coincidiendo con el obtenido por CD UV-cercano, los triptofanos 121 ó 130 se encuentran en un entorno más asimétrico (u ocultos al solvente) que el triptofano 22 de la proteína salvaje. Por otro lado, la diferencia en la longitud de onda del máximo de emisión observada entre la variante P18-W22A-F121W y P18-W22A-F1301W (350 nm y 341,5 nm, respectivamente), puede deberse al tipo de interacciones que realiza el triptofano y con el grado de accesibilidad al solvente en cada posición.

**Figura 38. Espectros de FT de las mutantes de triptofano.** Se midieron las señales de FT de las diferentes muestras proteicas (10  $\mu$ M de monómero) incubadas en buffer 50 mM fosfato, pH 7,0 con 1mM DTT. La longitud de onda de excitación se fijó en 295 nm y se colectó el espectro de emisión entre 300 y 400 nm.



Dado que la mutante P18-W22A-F130W muestra un mayor corrimiento hacia el azul (indicando un ambiente más hidrofóbico entorno al triptofano agregado), decidimos caracterizar en mayor detalle a esta variante. Seguidamente, se estudió el desplegamiento de P18-W22A-F130W inducido por GdnHCl. Se monitoreó su señal de FT y de DC al agregar concentraciones crecientes del agente desnaturante (Figura 39). Analizando los resultados de FT, se pudieron distinguir dos transiciones, la primera ocurrió entre 1,2 y 2,3 M GdnHCl y la segunda entre 2,6 y 3,5 M GdnHCl. La concentración de GdnHCl en la que se observó la primera transición, correlacionó con la concentración en la que

sucedió la disociación del dímero de pentámero en la proteína salvaje (observado por SLS/IR/UV, Figura 15). En este caso, el corrimiento del CM no fue anómalo, si no que a medida que se disoció la proteína su espectro de emisión de fluorescencia mostró un corrimiento hacia el rojo (triptofano más expuesto al solvente). Por lo tanto, fue posible sensar la disociación del decámero mediante técnicas fluorimétricas. Otro resultado que avala la existencia de un fenómeno de disociación de P18, es el hecho que durante este rango de GdnHCl, la proteína no sufrió pérdida de estructura secundaria (Figura 39, notar que no hay cambio en la señal de DC). La segunda transición evidenciada por FT, a mayores concentraciones de GdnHCl, correlacionó con la pérdida de estructura secundaria de la proteína, sugiriendo que se produjo el desplegamiento y disociación concertada de los pentámeros de P18-W22A-F130W. Este resultado también indica que el triptofano 130 permanece parcialmente oculto al solvente en el intermediario pentamérico, exponiéndose en mayor medida durante el desplegamiento de los mismos. Los resultados en conjunto señalan que la medición de la fluorescencia intrínseca de la mutante P18-W22A-F130W en función del agregado de desnaturizante, revela los dos equilibrios descritos para la proteína salvaje. Es decir, se logró diseñar y generar una variante de P18, capaz de ser utilizada como sonda fluorescente para la detección de diferentes transiciones estructurales de la molécula.



**Figura 39. Superposición de las curvas de desplegamiento de la variante W22A-F130W seguídas por DC y FT.** Las muestras proteicas (10  $\mu$ M de monómero) en buffer fosfato 50 mM pH 7,0, 1mM DTT fueron incubadas con concentraciones crecientes de desnaturizante, equilibradas durante 2 h y luego se midieron las señales de DC y FT. CM= centro de masa.

**Estabilidad termodinámica de P18-W22A-F130W.**

El análisis detallado de las curvas de fluorescencia y dicroísmo circular de P18-W22A-F130W en función de la concentración de GdnHCl, permitió conocer los valores termodinámicos correspondientes tanto a la disociación del decámero como a la desnaturalización de los pentámeros. Se realizó el mismo ajuste matemático que el descrito para la proteína salvaje, en el que se consideró la existencia de dos equilibrios de dos estados cada uno. Se compararon los valores de  $\Delta G$  con los obtenidos para la proteína salvaje a fin de descartar posibles variaciones en la estabilidad de la proteína producto de la misma modificación realizada. En la tabla 9 se resumen los resultados obtenidos. Los parámetros termodinámicos de las mutantes son comparables con los obtenidos para la proteína salvaje (y para la variante W22A), indicando que las mutaciones no afectaron la estabilidad global de la proteína. El valor de  $\Delta G$  de disociación ( $\Delta G_d$ ) de P18-W22A-F130W fue menor al estimado para la proteína salvaje ( $\Delta\Delta G_d^1 = 32$  kJ/mol). Si bien a partir de éste resultado se puede especular que la inserción de un triptofano en tales posiciones desestabilizaron la interfaz de contacto entre pentámeros, cabe recordar que el valor de  $\Delta G_d$  para cada proteína fue estimado mediante el ajuste de los datos adquiridos por diferentes metodologías. Es probable que el ajuste realizado a partir de los datos de FT (de la mutante) sea más preciso que el realizado a partir de los datos de SLS/IR/UV (de la proteína salvaje). Por lo tanto, también se puede pensar que el  $\Delta G_d$  calculado para la mutante P18-W22A-F130W, refleja fehacientemente la diferencia en la estabilidad conformacional de la partícula decamérica con respecto a la pentamérica. El  $D_{50}$  y la pendiente del equilibrio de disociación obtenido para P18-W22A-F130W fueron semejantes a los reportados para P18 salvaje. Pace *et al.* (Pace 1997), propuso una forma alternativa de estimar las diferencias en la estabilidad entre una proteína salvaje y mutantes puntuales de ella. Esto es a partir de un parámetro  $\Delta\Delta G$ , que resulta de la multiplicación de la diferencia entre los valores de  $D_{50}$  por el promedio de las pendientes  $m$  de la transición evaluada (Tabla 9). Si lo analizamos de este modo, obtenemos un  $\Delta\Delta G_d^2 = 0,72$  kJ/mol, lo que sugiere que ambos intermediarios pentaméricos (proveniente de P18 ó P18-W22A-F130W) son igualmente estables.

Llamativamente, la mutante P18-W22A-F130W presentó un valor de  $\Delta G$  de desplegamiento y disociación de los pentámeros ( $\Delta G_u$ ) significativamente mayor que el de la proteína salvaje, ambos calculados a partir de los datos colectados mediante la misma metodología (FT o DC) y trabajando bajo las mismas

concentraciones de proteína. El valor de  $D_{50u}$  para esta transición también fue mayor en el caso de la mutante (comparar 3,05 M con 2,65 M), mientras que la pendiente  $m_u$  no sufrió variación. Las modificaciones en la estabilidad conformacional de P18-W22A-F130W en comparación con la proteína salvaje fueron estimadas a partir de los parámetros  $\Delta\Delta G_u^1$  (-23 kJ/mol) y  $\Delta\Delta G_u^2$  (-27 kJ/mol), provenientes de la diferencia entre los  $\Delta G_u$  calculados para cada proteína ó por el método propuesto por Pace *et al.* (Pace 1997), respectivamente. Ambos valores fueron coincidentes e indicaron que el pentámero de P18 es conformacionalmente más estable cuando un triptofano en lugar de una fenilalanina ocupa la posición 130 de la cadena polipeptídica.

Disociación del decámero	$\Delta G_d$ (kJ/mol)	$D_{50d}$ (M)	$m_d$ (kJ/mol*M)	$^a\Delta D_{50d}$ (M)	$^b\Delta\Delta G_d^1$ (kJ/mol)	$^c\Delta\Delta G_d^2$ (kJ/mol)
WT	90 ± 20	1,75	20	-	-	-
W22A-F130W	58 ± 8	1,71	16	0,04	32	0,72
Desplegamiento (y disociación) del pentámero	$\Delta G_u$ (kJ/mol)	$D_{50u}$ (M)	$m_u$ (kJ/mol*M)	$^a\Delta D_{50u}$ (M)	$^d\Delta\Delta G_u^1$ (kJ/mol)	$^e\Delta\Delta G_u^2$ (kJ/mol)
WT	320 ± 22	2,65	68	-	-	-
W22A-F130W	343 ± 25	3,05	67	-0,4	-23	-27

**Tabla 9. Parámetros termodinámicos asociados al desplegamiento de la mutante W22A-F130W y de la proteína salvaje, deducidos a partir de la curva de desplegamiento inducida por cloruro de guanidinio y medida por DC y FT (y SLS en el casp de la proteína savaje).**

<sup>a</sup> Diferencia entre el  $D_{50}$  de la proteína salvaje y mutante. <sup>b</sup> Calculado como la diferencia entre el  $\Delta G_d$  de WT y mutante. <sup>c</sup> Calculado según:  $\Delta D_{50d} \times m_d$  (se tomó la pendiente promedio entre WT y mutante). <sup>d</sup> Diferencia entre el  $\Delta G_u$  de WT y mutante. <sup>e</sup> Calculado según:  $\Delta D_{50u} \times m_u$  (se tomó la pendiente promedio entre WT y mutante). Las curvas se realizaron en paralelo y por duplicado, utilizándose la misma concentración de proteína (5  $\mu$ M monómero). Los ajustes de las curvas fueron realizados según se informó en materiales y métodos.

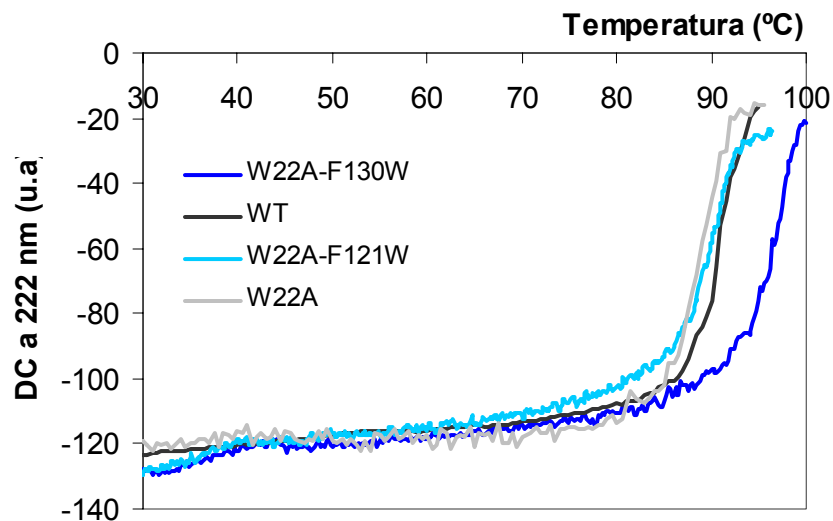
Una posible explicación para este fenómeno surge de analizar por un lado, los contactos realizados por la fenilalanina 130 en la proteína salvaje y por el otro, de estimar los contactos perdidos o ganados a causa de la sustitución de la fenilalanina por un triptofano. A partir de un modelado de la proteína en la cual se simuló la mutación F130W, se vio que el triptofano adicionado podría realizar un mayor número de contactos que la fenilalanina, los cuales estabilizarían la interfaz de contacto monómero-monómero y pentámero-pentámero. Este aumento en el número de contactos podría ser el causante del incremento en la estabilidad conformacional del intermediario pentamérico de la mutante analizada. Resulta oportuno recordar, que la curva de FT de la variante P18-W22A-F130W en función del agregado de desnaturizante (Figura 39), mostró que ésta era capaz de sentir el segundo equilibrio (desplegado y disociación de los pentámeros). Este hecho refuerza la idea que el triptofano 130 realiza contactos intra-monoméricos como los hallados en el modelado, los cuales se perderían durante el desplegamiento de la proteína. A causa de ello, el triptofano se expondría aun más al solvente; experimentalmente reflejado por una disminución de su emisión de fluorescencia.

#### **Desnaturalización térmica de P18-W22A-F121W y P18-W22A-F130W.**

Por último se estudió la estabilidad térmica de las variantes generadas. En la Figura 40 se observa una curva realizada por CD UV-lejano en función del aumento de la temperatura. La proteína P18-W22A-F121W presentó un valor de  $T_{m_a}$  semejante al obtenido para la proteína salvaje (89 °C), sin embargo en comparación, el valor de  $T_{m_a}$  obtenido para la proteína P18-W22A-F130W fue mayor en 6 °C ( $T_{m_a} = 95$  °C). El incremento en la estabilidad térmica podría estar relacionado con la contribución de nuevos contactos que aportaría el triptofano en dicha posición. Este aumento en la estabilidad conformacional, principalmente del intermediario pentamérico, se traduciría en un incremento en la estabilidad general de la proteína (tanto química como térmica).



**Figura 40. Estabilidad térmica de las mutantes de triptofano medidas por DC.** Se midió el cambio de la señal de DC UV-lejano (222 nm) en función del incremento de temperatura para las diferentes variantes de P18. Todas las curvas se realizaron con la misma concentración de proteína iodoacetilada y estabilizada en buffer fosfato 50 mM, pH 7,0.



Los resultados obtenidos en el estudio de la estabilidad térmica de la proteína salvaje (Figura 22), indicaron que la asociación de los pentámeros en una estructura decamérica contribuye a la estabilidad global de P18. Ampliando éste concepto, los resultados recientes muestran que un aumento en la estabilidad de la proteína puede ser causado por la asociación de las subunidades en una estructura polimérica y a su vez por una estabilización de las superficies de contacto entre sus subunidades (de un mismo pentámero).

Resumiendo, el reemplazo de una fenilalanina en la posición 130 de P18 por un triptofano, permitió monitorear mediante el uso de técnicas fluorimétricas el cambio en la estructura cuaternaria durante la disociación del decámero, así como la transición a un monómero desplegado. Por otra parte, la mutante generada, presentó un incremento en la estabilidad conformacional, mostrando una mayor resistencia a la desnaturalización química y térmica que la proteína salvaje. Las dos características de esta variante de P18 serán sumamente útiles en los futuros estudios cinéticos, inmunológicos, y en el mejoramiento de la técnica de obtención de quimeras mixtas. También podrán ser aplicadas en la caracterización de las mutantes de estabilidad conformacional reducida.

## Capítulo II

**“Actividad de lumazina sintetasa en  
*Brucella abortus*: Evolución de la  
familia de proteínas”**

## Parte A

**Las Lumazinas sintetasas de *B. abortus*. “Caracterización de RibH1 y divergencia evolutiva de las LS”**

*En el año 2005 fue concluida y publicada la secuencia completa del genoma de *Brucella abortus*. Un análisis detallado realizado a partir del genoma bacteriano, reveló que *B. abortus*, posee dos genes diferentes que comparten similitud de secuencia con la enzima Lumazina Sintetasa. Cada uno de los genes se encuentra ubicado en un cromosoma diferente de la bacteria. La proteína que nombramos hasta el momento como P18, caracterizada estructuralmente durante la Parte I, está codificada por el gen denominado *ribH2*, mientras que la segunda secuencia genética (denominada *ribH1*) que codifica para una proteína aún no descrita, *RibH1*, se encuentra ubicada en el cromosoma I. Este hallazgo junto con algunas otras evidencias experimentales abrió nuevas e interesantes preguntas. En el plano enzimológico resultaba interesante saber si las dos proteínas poseían actividad de lumazina sintetasa. Por otro lado nos propusimos conocer las diferencias estructurales de las dos proteínas homologas y por último nos pareció adecuado estudiar algunos aspectos evolutivos de las LS dado la gran divergencia estructural que presentan. En la segunda parte de esta tesis me propuse responder a algunos de estos interrogantes.*

*Los objetivos puntuales de esta parte de la tesis son:*

- ***Estudiar la ubicación y entornos genómicos de los genes de LS de *B. abortus*.*** Se analizarán las secuencias y entornos de los genes *ribH1* y *ribH2* de *B. abortus* y se realizará un estudio comparativo de los mismos abarcando diferentes organismos.
- ***Clonar y caracterizar estructuralmente a la proteína *RibH1* de *Brucella abortus*.***
- ***Realizar un estudio enzimático comparativo de las proteínas *RibH* de *B. abortus*.***
- ***Estudiar la evolución de las proteínas de la familia de LS.***

**Organización genómica de los genes *ribH* de *B. abortus*.**

*B. abortus* posee dos cromosomas circulares de 2,12 Mpb (cromosoma I) y 1.16 Mpb (cromosoma II) (Halling 2005). El origen de replicación (ori) del cromosoma I es uno típico bacteriano, mientras que el del cromosoma II es un ori plasmídico (Paulsen 2002; Halling 2005). Sin embargo, el contenido de C-G de los dos cromosomas es prácticamente idéntico (57,2 y 57,3%), consistente con la teoría de un evento de asimilación y estabilización ancestral del plásmido (Moreno 2002a). A partir de un estudio del genoma completo de *B. abortus*, encontramos dos ORFs que codifican para dos proteínas con similitud de secuencia primaria de entre un 20 a 30% con la enzima lumazina sintetasa (Figura 41). Este grado de similitud es el que comparte la mayoría de las enzimas pertenecientes a esta familia de proteínas cuando se las compara entre sí. Los genes en cuestión fueron llamados *ribH1* y *ribH2* y en la Figura 42, se pueden ver los entornos genómicos de los mismos en cada uno de los respectivos cromosomas. El gen *ribH2*, que codifica para la proteína RIBH2, la cual nombramos anteriormente como P18, se encuentra ubicado en el

```

A.aeolicus      ----MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGS 56
S.cerevisiae    AVKGLGKPDQVYDGSKIRVGIHARWNRVIIDALVKGAIERMASLGVEENNIIETVPGS 60
Ribh1           ----MEFLMSKHEADAPHLLIVEARFYDDLADALLDGAKAALDEAG---ATYDVVTVPGA 53
Ribh2          -----MNQSCPNKTSFKIAFIQARWHADIVDEARKSFVAELAAKTGGsVEVEIFDVPGA 54
                .. :: **:  : *  ..  :  : ***:

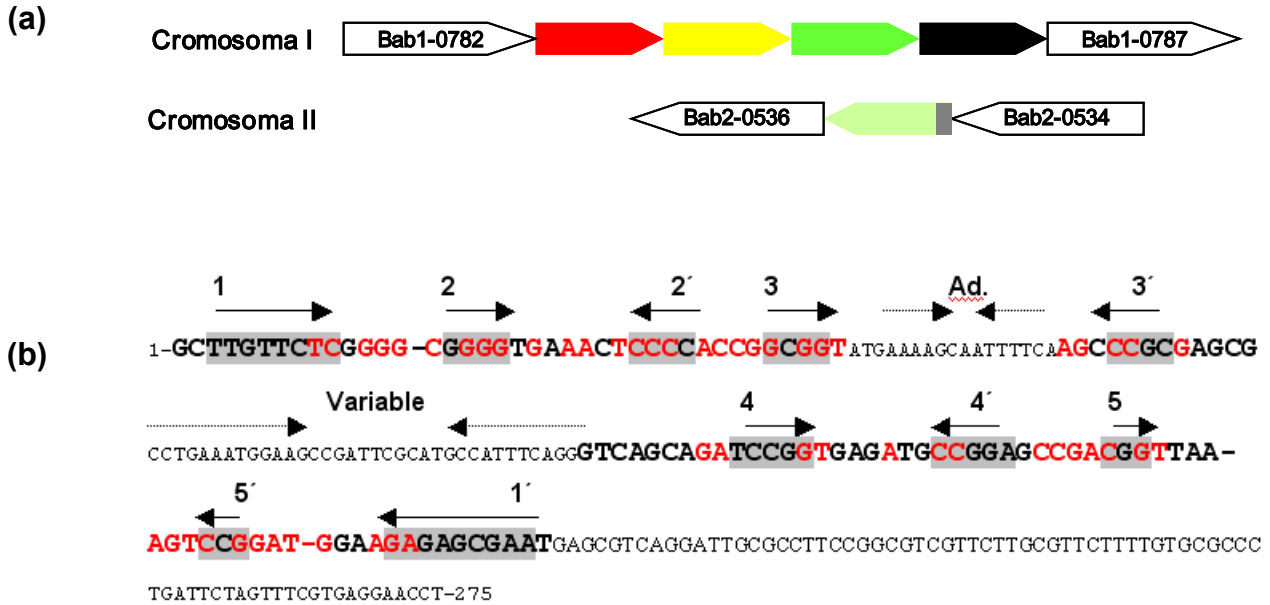
A.aeolicus      WEIPVAAGELARKED-----IDAVIAIGVLRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPI 111
S.cerevisiae    YELPWGTKRFVDRQAKLGKPLDVVIPIGVLIKGSIMHFEYISDSTTHALMNLQEKVDMPV 120
Ribh1           LEIPATISFALDGADNGGTEYDGFVALGTVIRGETYHFDIVSNESCRAITDLSVEESIAI 113
Ribh2          YEIPLHAKTLARTGR-----YAAIVGAAAFVIDGGIYRHDFVATAVINGMMQVQLETEVPV 109
                *:.*  :.  .:* *  :.: :.  .:. :. :  .:

A.aeolicus      TFGVITADTLEQAIERAGTKHG----NKGWEAALSATEMANLFKSLR--- 154
S.cerevisiae    IFGLLTCMTEEQALARAGIDEAHSMHNHGEDWGAAAVEMAVKFGKNAF-- 168
Ribh1           GNGILTVENEEQAWVHARREDK----DKGGFAARAALTMIGLRKKFGA-- 157
Ribh2          LSVVLTPHHFHESKEHHDFHFAH--FKVKGVAAHAALQIVSERSRIAALV 158
                :*:  .: :  .  .  :*  . :*: :

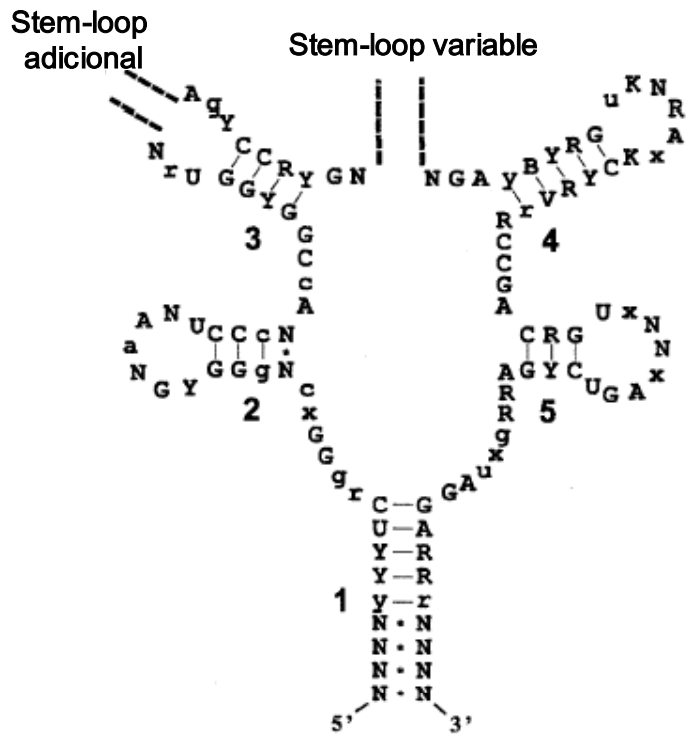
```

**Figura 41. Alineamiento de diferentes LS.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a una LS icosaédrica (*A. Aeolicus*), LS pentamérica (*S. cerevisiae*) y a las proteínas RibH1 y RibH2 de *B. abortus*. Se utilizó el programa ClustalW para realizar el alineamiento. En negro y blanco se marcan los residuos idénticos entre las cuatro proteínas, en gris los residuos idénticos entre alguna de las cuatro LS. Según el programa ClustalW “:” significa una sustitución conservativa y “.” semiconservativa.

cromosoma II y está rodeado por genes cuyos productos no están directamente relacionados con la vía biosintética de la riboflavina. Entre ellos están las proteínas: formato dehidrogenasa, FdhD (Bab2-0534), una proteína de función desconocida (Bab2-0536) y transportadores ABC de hierro (Bab2-0531/3) o de azúcares (Bab2-0537/9); en paréntesis se indica el número del locus. Estos genes a juzgar por la orientación de los ORFs y la localización de sus promotores no parecerían compartir un control transcripcional común. Un análisis de la secuencia 5' no codificante de gen de *ribH2* (5'UTR), reveló la presencia de un riboswitch, denominado "elemento RFN" (Figura 42). Los elementos RFN son secuencias de RNA mensajero altamente conservadas, como así la estructura tridimensional que adoptan y están implicadas en la regulación transcripcional de diferentes genes por un mecanismo dependiente de la concentración de flavina adenina mononucleótido (FMN) del medio (Winkler 2002). El mecanismo por el cual el riboswitch ejerce dicha regulación fue ampliamente estudiado en diferentes bacterias, y se clasificó a estos reguladores según si afectan la terminación de la transcripción o bien la traducción del gen (Nudler 2004; Tucker 2005). Un análisis teórico-estructural realizado por Vitreschak *et al.* (Vitreschak 2004) de los riboswitch que responden a la concentración de FMN en bacterias, reveló que en el caso de *B. abortus* esta secuencia estaría implicada en la regulación de la traducción del gen *ribH2*. Se cree que la alta concentración de FMN induce cambios estructurales en el elemento RFN, los cuales modifican la accesibilidad del ribosoma en la región de Shine-Dalgarno (Winkler 2002), disminuyendo la traducción del gen que se encuentra río-abajo. La secuencia hallada en la región no codificante (promotor) de *ribH2* (Figura 42 b y c), posee todas las posiciones nucleotídicas altamente conservadas para este tipo de regulación. Por lo tanto, según la alta conservación de secuencia, se podría pensar que la expresión de *ribH2* de *B. abortus* es dependiente del metabolito FMN, aunque experimentalmente esto aún no fue comprobado.



(c)

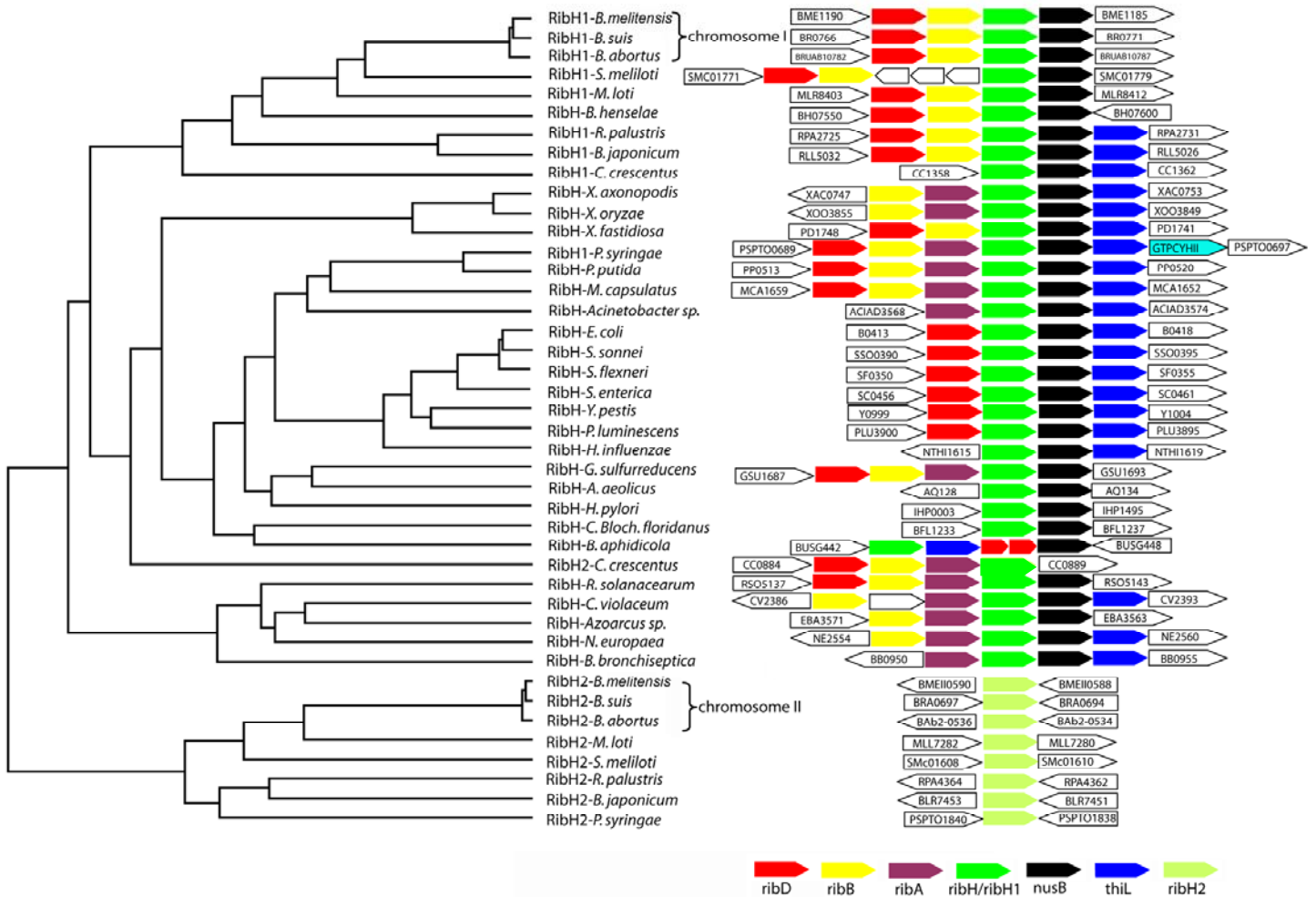


**Figura 42. Estructura conservada del 5' UTR del mensajero de RibH2 de *B. abortus*.** (a) Ubicación de los genes *ribH* en el genoma bacteriano. *ribH2* está apartado en el cromosoma II (verde claro) presentando en su 5'UTR el riboswitch que respondería a FMN (gris). *ribH1* se encuentra formando parte del operón *rib* (verde oscuro), conformado por *ribD* (rojo), *ribB* (amarillo) y *nusB* (negro). (b) 5'UTR del mensajero de RibH2. En gris se marcaron las secuencias que se aparean (1 con 1', 2 con 2', etc., según la figura (c)) y que conforman los diferentes tallos (números); los nucleótidos conservados en los riboswitch (que responden a FMN) se marcaron en rojo. Datos obtenidos de (Vitreschak 2002). (c) Estructura de un elemento RFN. Las mayúsculas indican las posiciones invariables (conservadas) y las minúsculas indican posiciones altamente conservadas. Los números indican los diferentes tallos. Líneas y asteriscos indican apareamiento obligatorio o facultativo respectivamente. Posiciones degeneradas: R = A o G; Y = C o U; K = G o U; B = no A; V = no U. N = cualquier nucleótido, X = cualquier nucleótido o deleción (Vitreschak 2002).

Al analizar el entorno genómico del gen *ribH1* presente en el cromosoma I, que codifica para la proteína aún no caracterizada RIBH1, se encontró que se encuentra formando parte de un potencial operón “rib”. Este operón comprende cuatro ORFs con similitud de secuencia a *ribD* (putativa deaminasa/reductasa bifuncional), *ribH* (putativa lumazina sintetasa), *ribB* (putativa riboflavina sintetasa) y *nusB* (putativo factor antiterminador) (Figura 43). Las tres primeras son enzimas que forman parte de la vía biosintética de la riboflavina como se ilustró en la Figura 3. El operón está precedido por un gen cuyo producto tiene una función desconocida y presenta similitud de secuencia con el gen *ycgG* de *B. subtilis*. El operón *rib* de *B. abortus* como entidad, presentó una alta similitud con los operones *rib* de varias otras eubacterias. La Figura 43, muestra la localización genómica de los genes *ribH* de una variedad de organismos. Llamativamente, existen otros organismos además de *Brucella spp.*, cuyos genomas fueron secuenciados, en los que se encontraron dos diferentes ORFs con similitud de secuencia a una lumazina sintetasa. Estos genes fueron designados como *ribH1* y *ribH2* según si codifican para proteínas con similitud de secuencia primaria a una RibH1 o RibH2 de *B. abortus*, respectivamente. Algunos de estos organismos se incluyeron en el análisis, por ejemplo: *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Pseudomonas syringae*. En la Figura 43, se esquematizó la organización genómica de los genes *ribH* provenientes de éstos organismos junto con los provenientes de algunas otras eubacterias. Aquellas proteínas presentes en organismos que solamente presentan un único ORF, se las denominó RibH. Curiosamente, en éste análisis no se detectó a ningún organismo presentando solamente el gen *ribH2*. Por el otro lado, en ningún caso se vio al gen *ribH2* formando parte de un operón. *Caulobacter crescentus*, representa el único caso de un organismo que presenta dos genes de tipo *ribH1*, ambos formando parte de un operón *rib*. Existen varios organismos, incluyendo *Brucella spp.*, en los cuales el gen *ribA* no forma parte del operón *rib*, en estos casos se encontró al mismo ubicado en otro locus dentro del cromosoma I. Otra particularidad encontrada, fue el caso de *Sinorhizobium meliloti*, en el que los genes *ribD-ribB* y *ribH-nusB* se encontraron espaciados por tres ORFs (2,555 pb) cuyas funciones son desconocidas y sus orientaciones opuestas. *Buchnera aphidicola* es el único organismo en este estudio que mostró genes separados que codifican para la deaminasa y reductasa (*ribD1* y *ribD2*), posicionados de manera contigua.



En la mayoría de los operones analizados en este estudio (32 de 33) el gen *nusB* apareció río debajo de los genes *rib* y generalmente seguido de por el gen *thiL* (codifica para una tiamina monofosfato quinasa). Los genes *rib* se encuentran invariablemente orientados en la misma dirección que *nusB* y *thiL*, sin embargo la relevancia funcional de ésta asociación es aún desconocida.



**Figura 43. Topología del operón involucrado en la biosíntesis de la riboflavina y genes *ribH2* de diversos organismos.** Las secuencias provienen de los genomas que fueron totalmente secuenciados disponibles del GenBank. La orientación de los genes está dada por las flechas (no está representado en escala). El número de acceso de los organismos es el siguiente: *Brucella meliloti* 16 M cromosoma I (NC 003317), *Brucella suis* (NC 004310), *Brucella abortus* (NC 006932), *Sinorhizobium meliloti* (NC\_003047), *Mesorhizobium loti* (NC 002678), *Bartonella henselae* (NC 005956), *Rhodopseudomonas palustris* (NC 005296), *Bradyrhizobium japonicum* (NC 004463), *Caulobacter crescentus* (NC\_002696), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (NC 003919), *Xanthomonas oryzae* (NC 006834), *Xylella fastidiosa* (NC\_004556), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (NC\_004578),

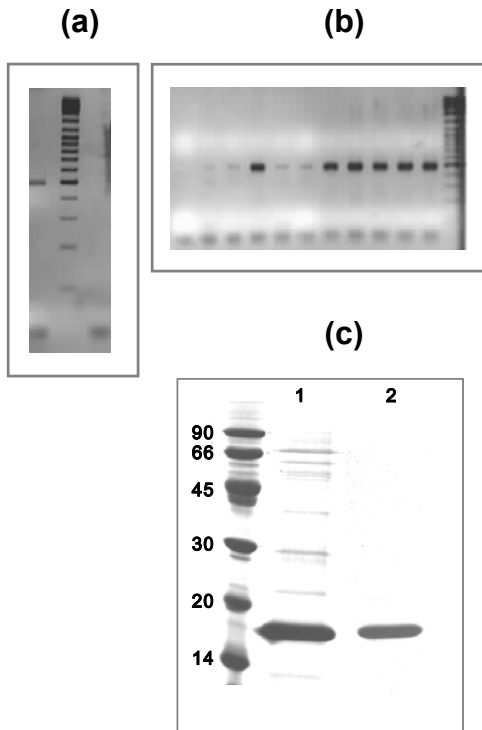
**Continuación leyenda de la Figura 43.** *Pseudomonas putida* (NC 002947), *Methylococcus capsulatus* (NC 002977), *Acinetobacter* sp. (NC 005966), *Escherichia coli* (NC\_000913), *Shigella sonnei* (NC 007384), *Shigella flexneri* (NC\_004337), *Salmonella enterica* (NC\_006905), *Yersinia pestis* (NC\_004088), *Photobacterium luminescens* subsp. *laumondii* (NC 005126), *Haemophilus influenzae* (NC\_007146), *Geobacter sulfurreducens* (NC 002939), *Aquifex aeolicus* (NC 000918), *Helicobacter pylori* (NC\_000921), *Candidatus (Blochmannia) floridanus* (NC\_005061), *Buchnera aphidicola* (*Schizaphis graminum*) (NC\_004061), *Caulobacter crescentus* (NC\_002696), *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (NC 003295), *Chromobacterium violaceum* (NC 005085), *Azoarcus* sp. *Ebn1* (NC 006513), *Nitrosomonas europaea* (NC 004757), *Bordetella bronchiseptica* (NC 002927), *B. meliloti* (NC003318), *Brucella suis* (NC 004311), *B. abortus* biovar 1 (NC 006933), *M. loti* (NC002678), *S. meliloti* (NC\_003047), *R. palustris* (NC 005296), *B. japonicum* (NC 004463), *P. syringae* pv. *tomato* (NC\_004578).

Según el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de RibH1 y RibH2 de *B. abortus* (Figura 41), las dos proteínas comparten baja identidad de secuencia (21%) entre sí. Curiosamente, RibH1 y RibH2 comparten mayor similitud en la secuencia primaria con proteínas RibH1 y RibH2 pertenecientes a otros organismos que entre ellas. Dada la baja similitud en la secuencia primaria existente entre estas dos proteínas, asumimos que la separación evolutiva de los genes *ribH1* y *ribH2* (duplicación y diferenciación) ocurrió mucho tiempo atrás o bien que uno de los genes *ribH* fue adquirido en una etapa previa a la especiación de las  $\alpha$ -proteobacterias por transferencia lateral (esto último está relacionado con el idéntico contenido G+C de los genes al igual que el de los cromosomas). Hasta el momento no hay ninguna evidencia experimental que permita discriminar entre una y otra opción.

El descubrimiento de que *B. abortus* posee dos secuencias diferentes con homología a la lumazina sintetasa fue un hallazgo intrigante, suscitándonos ciertos interrogantes tales como: ¿Es posible que la actividad de LS en *B. abortus* sea redundante, es decir que dos proteínas presenten el mismo rol biológico? ¿Qué ventajas adaptativas representa este hecho? ¿Por qué se previno la pérdida de alguna de las dos proteínas durante la especiación de las  $\alpha$ -proteobacterias?. Ciertamente, no estaba a nuestro alcance poder contestar algunas de éstas preguntas. Sin embargo, y a fin de ampliar nuestros conocimientos en el tema, nos propusimos estudiar a éstas dos proteínas, desde un punto de vista estructural y funcional en un contexto evolutivo.

#### **Clonado y caracterización estructural de RibH1 de *B. abortus*.**

Con la finalidad de comparar estructural y funcionalmente a RibH1 y RibH2, se clonó el gen *ribH1* a partir del DNA cromosómico de *B. abortus*. En la Figura 44a, se puede ver el resultado de la PCR en la que se utilizaron dos cebadores diseñados específicamente (ver secuencias en materiales y

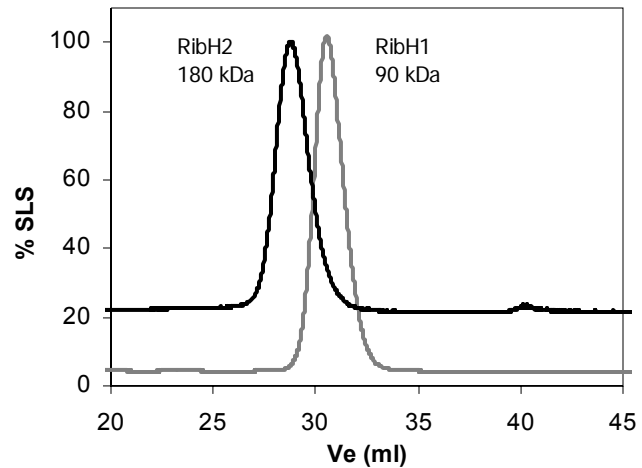


**Figura 44. Clonado y purificación de RibH1 de *B. abortus*.** (a) Clonado de ribH1 a partir del DNA de *B. abortus* y mediante la técnica de PCR. Se utilizaron cebadores específicos tal como se indica en materiales y métodos. El fragmento amplificado corrió al igual que un fragmento de tamaño de 500 pb, coincidiendo con el tamaño esperado. (b) Ensayo de detección por PCR de los clones positivos. (c) Purificación de RibH1: Gel de plocrilamida desnaturaliante al 15% (SDS-PAGE). En la calle 1 se corrió el pico mayoritario que eluyó de una columna monoQ al 50 % de buffer B. En la calle 2 se corrió el pico mayoritario eluido de una columna S-200.

métodos) de manera que se apareen con el extremo 5' y 3' del gen en cuestión. El producto de esta PCR fue clonado en un plásmido PT7-7 el cual fue utilizado para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . A partir de cultivos de éstas bacterias crecidas en presencia de Ampicilina (para asegurarnos de seleccionar colonias transformadas) se realizó un ensayo de detección por PCR utilizando los mismos cebadores específicos que los implementados durante el clonado. El resultado del mismo puede observarse en la Figura 44b. Cuatro de los clones positivos fueron seleccionados y se verificó mediante secuenciación que los mismos poseían en el sitio de clonado del vector el gen *ribH1*. Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3) con el DNA plasmídico de uno de los clones positivos y se realizaron ensayos de expresión de la proteína recombinante. La proteína RibH1 de *B. abortus* recombinante, pudo ser purificada a homogeneidad a partir de los cuerpos de inclusión de las bacterias transformadas, así como también de la fracción citosólica (Figura 44c). El peso molecular aproximado de la proteína recombinante, calculado mediante electroforesis (SDS-PAGE, Figura 44c) fue de 17 kDa, coincidente con el esperado considerando la secuencia primaria de la proteína (16,79 kDa). Se realizó una degradación de Edman del extremo amino terminal de la proteína purificada, obteniéndose la secuencia MEFLMSKHEADA, que coincide con la traducción de su ORF (Figura 41).

Con la intención de comenzar a determinar cual es el arreglo cuaternario de la proteína en estado nativo, se realizaron ensayos de medición del promedio de la masa molecular relativa de la muestra RibH1 purificada, mediante SLS/IR/UV. Dado que no se conocía el tamaño de la proteína nativa y se podía pensar que estaría comprendido entre 18 kDa y 1 Mda (considerando a una partícula pentamérica ó icosahédrica), se utilizaron dos columnas diferentes de separación por tamaño (tamiz molecular): Superdex-200 (rango de separación de moléculas entre 20 y 200 kDa) o Sephacryl-400 (hasta 1 MDa). Cada columna fue acoplada a los diferentes detectores. El perfil de elución obtenido utilizando la columna S-200 se muestra en la Figura 45 en donde se la comparó con el perfil de elución de RibH2. Independientemente de la columna utilizada, la señal de SLS/IR/UV obtenida para la proteína, según la calibración realizada, corresponde al de una partícula cuyo tamaño es de 88 kDa. Este valor coincide con una asociación pentamérica de los monómeros de RibH1 (17 kDa). Si solo nos guiáramos por éste dato, podríamos pensar que RibH1 es una proteína polimérica, cuyos monómeros

**Figura 45. Corrida S-200 acoplada a los detectores de SLS/IR/UV de las proteínas RibH1 y RibH2 de *B. abortus*.** Se graficó la señal de SLS en función del volumen de elución. Las dos proteínas fueron sembradas por separado en una columna S-200 (equilibrada en el mismo buffer que las muestras, fosfato 50 mM, pH 7,0). En el gráfico se señala el PM del pico proteico.



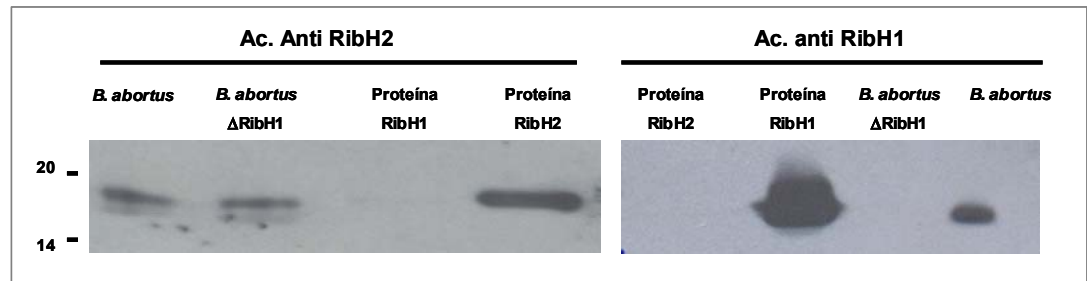
se asocian de manera semejante a como lo hacen en las LS de tipo pentaméricas.

Para confirmar este estado cuaternario, se realizaron estudios de ultracentrifugación analítica (resultado no mostrado). En primer lugar se calculó el coeficiente de sedimentación de RibH1 (una función de la masa, la densidad y la forma macromolecular), que resultó ser de 5,9 S a 20 °C. En comparación, las LS pentaméricas provenientes de *S. cerevisiae* y *S. pombe* poseen un coeficiente de sedimentación similar de 5,5 S y 5,0 S respectivamente (Mortl 1996; Fischer 2002). También se realizaron ensayos de equilibrio de sedimentación, que permiten determinar entre otras cosas, la masa molecular de las especies que sedimentan. Los ensayos indicaron que RibH1 posee una masa molecular de 88 kDa. El valor del peso molecular de cinco subunidades de 17 kDa implica un pentámero de 88 kDa, coincidiendo perfectamente con los datos experimentales obtenidos.

Recientemente, en nuestro laboratorio se logró cristalizar a RibH1. Los resultados del análisis de su estructura cristalina terminaron de confirmar que RibH1 de *B. abortus* es una proteína pentamérica, siendo éste el estado polimérico que adopta en solución (manuscrito en preparación).

#### ***Detección de RibH1 en extractos de B. abortus.***

Como se mostró anteriormente, el gen que codifica para la proteína RibH1 se encuentra formando parte del operón *rib*. Este hecho nos sugería que *B. abortus*



**Figura 46. Detección de RibH1 y RibH2 en extractos de *B. abortus*.** Se utilizaron extractos bacterianos de cepas salvaje o de una cepa la cual presenta una delección del gen *ribH1* ( $\Delta$ RibH1). Como controles positivos se sembraron en el gel muestras de las proteínas recombinantes RibH1 y RibH2. Los extracto bacterianos así como las muestras proteicas fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 15 % desnaturizante (SDS-PAGE) y transferidas a las membranas. Las membranas fueron bloqueadas ON, posteriormente incubadas con los anticuerpos anti RibH2 ó anti RibH1 según corresponde (durante 2 h) y luego con los anticuerpos secundarios. Las membranas fueron reveladas mediante autorradiografía.

expresa la proteína RibH1, resultando poco probable que sea, por ejemplo, el producto de un pseudogen. Con la intención de confirmarlo, y a fin de obtener anticuerpos policlonales anti-RibH1, se inoculó a un conejo con una preparación de RibH1 en adyuvante de Freund en forma intraperitoneal. Estos anticuerpos fueron utilizados como sonda de detección de la proteína en extractos de *B. abortus*, mediante la técnica de Western-blot. En paralelo se realizó la detección de la proteína RibH2 en los mismos extractos bacterianos, siendo este ensayo una confirmación del realizado por Goldbaum *et al.* (Goldbaum 1993). Como se observa en la Figura 46, fue posible detectar a RibH1 y a RibH2 en el extracto de *B. abortus*. Conformemente, un extracto bacteriano proveniente de una mutante de *B. abortus* la cual posee una depleción del gen *ribH1* ( $\Delta$ ribH1) (Marchesini, I., y colegas, resultados no publicados), no mostró la banda correspondiente al producto de éste gen, pero sí al producto del gen *ribH2*.

Resumiendo, hasta aquí demostramos que *B. abortus* expresa dos proteínas diferentes, ambas poseen similitud de secuencia primaria con una LS. RibH1 es una proteína de tipo pentamérica que forma parte del operón rib, ubicado en el cromosoma I. Por su parte, RibH2 está codificada por un gen aislado en el otro cromosoma bacteriano, y presentó una novedosa estructura cuaternaria la cual fue caracterizada durante el capítulo I de la presente Tesis.

**Estudios enzimáticos de RibH1 y RibH2 de *B. abortus*.**

En la Introducción de ésta Tesis, fueron descritas las reacciones enzimáticas involucradas en la biosíntesis de la riboflavina (Figura 3). En particular, la LS cataliza la condensación de sus dos sustratos: RPD (**6**) y But-F (**8**), generando el compuesto 6,7-dimetil-8-ribitillumazina (**9**). El producto de la reacción posteriormente es transformado en riboflavina, reacción catalizada por la enzima RS (Figura 3). La metodología utilizada en la medición de la actividad enzimática de la LS fue descrita hace ya varios años (Bacher 1986; Sedlmaier 1987; Richter 1992) y adaptada más recientemente por Fischer *et al.* (Fischer 2003), siendo ésta la utilizada en el presente trabajo. Para ello, se requiere contar con los dos sustratos de la enzima, los cuales son obtenidos mediante síntesis orgánica (sustrato **6**) ó enzimática (sustrato **8**) en solo muy pocos laboratorios en el mundo. Es por ello, que los estudios enzimáticos los realicé en Alemania en el laboratorio de los Dres. Bacher A., y Fischer, M., en un marco conjunto de colaboración. Se empleó una técnica espectrofotométrica para la detección del producto de la reacción enzimática (6,7-dimetil-8-ribitillumazina) tal como se detalló en materiales y métodos. Se midieron las constantes de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) para cada sustrato y las  $V_{max}$  de la reacción para las proteínas recombinantes RibH1 y RibH2 de *B. abortus* (Tabla 10). Sorprendentemente, RibH2 no mostró tener actividad enzimática detectable en las condiciones de medición. Por este motivo, fue necesario analizar distintas variables que pudieran afectar la actividad de la enzima, como por ejemplo: el pH, agregado de sal, diferentes tipos de búffer, temperatura de incubación y concentración de sustratos. En ningún caso se logró detectar el producto de la reacción, sin embargo al aumentar considerablemente la concentración de But-F (a 4 mM), se registró una moderada reacción catalítica (20 nmol/mg\*min a 37 °C). Consideramos que este valor de  $V_{max}$  calculado no representa un fiel indicador de la actividad enzimática de la proteína *in vivo*, ya que la concentración de But-F requerida para obtener dicha actividad probablemente no refleje la concentración fisiológica del mismo. Teniendo en cuenta ésto, se calculó el parámetro  $K_{cat}/K_M$ , el mismo contempla tanto la actividad catalítica de la proteína como su afinidad por cada sustrato. Como puede apreciarse, el valor de  $K_{cat}/K_M^8$  es tres órdenes de magnitud mayor que el de  $K_{cat}/K_M^6$  (1,5 M\*s<sup>-1</sup> y 600 M\*s<sup>-1</sup> respectivamente), relacionado con las diferencias en las afinidades por los sustratos.

Por otra parte, la proteína RibH1 cataliza la formación de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina a una velocidad de 18 nmol/mg\*min a 37 °C (Tabla 10). La ecuación matemática que mejor describió la dependencia de la velocidad de la reacción en función del agregado del sustrato **8** fue la ecuación de Hill:

$$V = V_{\max} * S^n / (K^n + S^n)$$

En donde V es la velocidad de la reacción,  $V_{\max}$  es la velocidad máxima, S la concentración de But-F, K la constante de reacción y n es el coeficiente de Hill. A partir de dicho ajuste, se determinó que la constante de la reacción para But-F es de  $125 \pm 10 \mu\text{M}$  (y por lo tanto  $K_{\text{cat}}/K_M^8 = 42,5 \text{ M}^*s^{-1}$ ). Notar que este valor de  $K_{\text{cat}}/K_M^8$  es significativamente mayor que al obtenido para RibH2. Los experimentos cinéticos de RibH1 en estado estacionario revelaron una disminución de la velocidad de la reacción a elevadas concentraciones de RPD. Por lo tanto, los datos de velocidad de la reacción en función del agregado de RPD fueron ajustados al modelo de inhibición representado por la ecuación:

$$V = V_{\max} * S / [K_M + S * \{1 + (S/K_s)\}]$$

Donde V es la velocidad de la reacción,  $V_{\max}$  la velocidad máxima, S la concentración de RPD,  $K_M$  la constante de Michaelis-Menten y  $K_s$  la constante de inhibición. A partir de este análisis se estimaron las constantes  $K_M^6$ ,  $K_{\text{cat}}/K_M^6$  y  $K_s$  que fueron de  $90 \pm 16 \mu\text{M}$ ,  $58,9 \text{ M}^*s^{-1}$  y  $370 \mu\text{M}$  respectivamente (Tabla 10).

La concentración celular de But-F no está reportada. Exceptuando que dicha concentración se encuentre en el orden numérico de la  $K_M$  de RibH2 (4 mM), asumiremos que la mayor parte del producto 6,7-dimetil-8-ribitillumazina en *B. abortus* será generado por la enzima que presente menor  $K_M$ , en este caso RibH1 ( $124,9 \mu\text{M}$  para RibH1 y  $4000 \mu\text{M}$  para RibH2). Aún teniendo en cuenta estas consideraciones, no se puede descartar la posibilidad que RibH2 *in vivo* presente una actividad residual de LS. Al comparar las características enzimáticas de RibH1 de *B. abortus* con la de otras LS provenientes de bacterias mesófilas o de plantas (*S. oleracea*), se pueden destacar algunas diferencias: Primero, la  $V_{\max}$  de la reacción catalizada por RibH1 es un orden de magnitud menor que la del resto de las LS. Segundo, RibH1 presenta una  $K_M$  para el sustrato **6** mayor a la reportada para otras enzimas homólogas y una afinidad por el sustrato **8** similar (Tabla 11). Un análisis de la secuencia primaria junto con un análisis estructural preliminar de RibH1 no reveló mayores modificaciones en torno a los sitios activos de la enzima, en comparación con otras LS ya caracterizadas. Por lo tanto, se puede decir que

la presión de selección que controló la ruta metabólica de las flavinas en *Brucella abortus*, favoreció la evolución de la catálisis a baja tasa de reacción (enzima RibH1). Contrariamente, al analizar la estructura de RibH2 entorno a los sitios activos, se encontraron importantes variaciones. Por lo tanto, aprovechando la existencia de esta estructura cristalina y la de otras LS, nos pareció adecuado realizar un análisis comparativo a fin de dilucidar posibles determinantes estructurales responsables en parte de tal resultado experimental.

<i>B. abortus</i>	$K_M^8$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_M^6$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (nmol/mg* min)	$K_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}/K_M^8$ ( $\text{M}^*\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}/K_M^6$ ( $\text{M}^*\text{s}^{-1}$ )
RibH2 (P18)	4000	10	20	0,006	1,5	600
RibH1	124,9	90,0	18,1	0,0053	42,5	58,9

**Tabla 10. Parámetros enzimáticos de RibH1 y RibH2 de *B. abortus*. 6 y 8** corresponden a los sustratos 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona (RPD) y 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato (But-F) respectivamente. \* Coeficiente de Hill ( $n = 2 \pm 0,3$ ).  $K_{\text{cat}} = V_{\text{max}} \cdot \text{PM monómero}/1000 \cdot 60$ .

Organismo	$K_M^8$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_M^6$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (37 °C) (nmol/mg*min)	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	55	9.0	242	(Kis 1995a)
<i>Escherichia coli</i>	62	4.2	197	(Paulsen 2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90	4.0	257	(Paulsen 2002)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	67	5.0	217	(Fischer 2002)
<i>Spinacea oleracea</i>	26	20.0	275	(Jordan 1999)

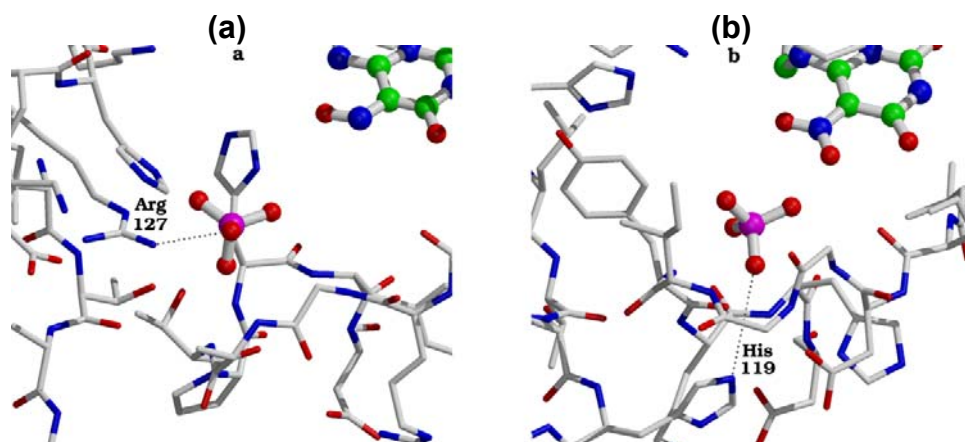
**Tabla 11. Parámetros enzimáticos reportados para LS provenientes de diversos organismos.**



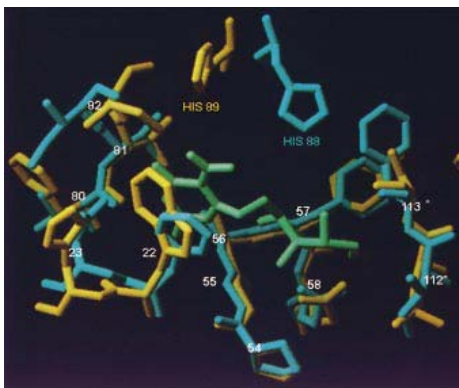
**Bases estructurales de la actividad residual de LS en RibH2 de *B. abortus*.**

Se llevó a cabo un análisis comparativo entre la estructura cristalográfica de RibH2 de *B. abortus* y la LS proveniente de *A. aeolicus*, evaluando principalmente los sitios de unión a RDP y But-F. En este estudio se comprobó que RibH2 presenta importantes modificaciones en torno al sitio de unión de la But-F, las cuales se detallan a continuación. La LS de *A. Aeolicus*, al igual que otras LS, une But-F por medio de un puente salino en el que participa un residuo muy conservado en las LS: la Arginina 127 (Figura 47a). Este residuo se ubica en el extremo de la hélice  $\alpha 4$  e inmediatamente después de él, le sigue un bucle postulado como un determinante del estado cuaternario de las LS. A diferencia de otras LS, RibH2 de *B. abortus* presentó una estructura primaria y una disposición de la cadena polipeptídica completamente distinta en esta posición. En primer lugar, el residuo equivalente a la Arginina 127, está ocupado por una Histidina (His 119, Figura 47b). En segundo lugar, en vez de un bucle, RibH2 presenta una hélice  $\alpha 4\alpha 5$  continua (Figuras 6 y 24), y

**Figura 47. Divergencia en el sitio de unión de la 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato en diferentes proteínas. (a)** LS icosaédrica proveniente de *A. aeolicus*, **(b)** RibH2 decamérica de *B. abortus*. Se muestra con línea punteada la interacción electrostática entre el fosfato y el residuo cargado.

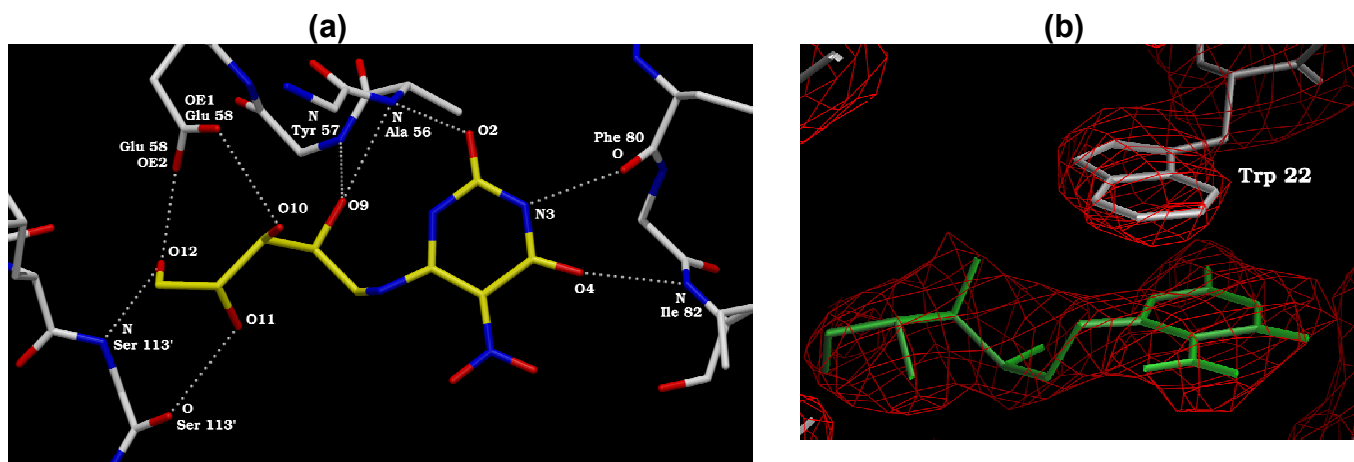


este cambio genera una modificación en la posición y orientación del residuo que hipotéticamente debería interactuar con la But-F (His 119, Figura 47). Es decir, la disposición de la cadena polipeptídica de RibH2 en esa región, se relaciona con la ausencia de un grupo cargado positivamente capaz de



**Figura 48. Superposición de los sitios de unión de los sustratos de la LS.** LS de *B. subtilis* (azul) y RibH2 de *B. abortus* (amarillo). En gris se muestra al análogo de sustrato NRP. Los residuos 112\* y 113\* están formando parte del monómero vecino (Braden 2000).

interactuar con la carga opuesta del grupo fosfato del sustrato. Sumado a esto, y tal como se detalló en el capítulo A, esta disposición espacial como así los residuos presentes en dicha región, están íntimamente relacionados con la formación de la estructura decamérica de RibH2 (Figura 25). Otro residuo que fue nombrado en la introducción como implicado en la catálisis y unión de But-F, altamente conservado en las LS, es la His 88 (tomando como referencia a la secuencia de *B. subtilis*). Como se puede notar en la Figura 48, este residuo se encuentra desplazado una posición en RibH2 de *B. abortus* (la posición 88 esta ocupada por una arginina). No solo que se encuentra desplazado, si no que al superponer las dos estructuras se puede notar que la His 89 de *B. abortus* se encuentra en una orientación diferente a la presente en *B. subtilis*. Por otra parte, al analizar la estructura del sitio de unión del segundo sustrato (RPD) en RibH2 de *B. abortus*, se encontró que el mismo permaneció conservado en comparación con el de otras LS. La Figura 49, muestra los residuos involucrados en el contacto entre RibH2 y un análogo del sustrato NRP (estructuralmente equivalente). Como puede observarse en la Figura 49a, el ligando es reconocido por residuos de dos subunidades adyacentes de un mismo pentámero por múltiples interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas. El



**Figura 49. Residuos involucrados en el reconocimiento del sustrato RPD.** (a) Estructura del sitio de unión del análogo de sustrato NRP estructuralmente equivalente al sustrato. En la figura se marcan con línea punteada los contactos hidrofílicos que participan en el reconocimiento del mismo. Los residuos involucrados en el reconocimiento de este sustrato forman parte de dos monómeros vecinos (de un mismo pentámero). Los residuos marcados con apóstrofe forman parte del monómero B. Residuos sin apóstrofe forman parte del monómero A. (b) Interacción entre el anillo pirimidina del análogo de sustrato y el triptofano 22. Las figuras se realizaron a partir de la estructura de RibH2 resuelta en presencia del análogo de sustrato (Klinke 2005).

reconocimiento a su vez se complementa por una interacción coplanar entre el grupo indol del Triptofano 22 y una de las dos cara del anillo de la pirimidina (Figura 49b). Está descrito en varios trabajos que esta última interacción juega un rol fundamental en el reconocimiento del sustrato y también en la catálisis (Meining 2000; Fischer 2002; Fischer 2003). En la mayoría de las LS conocidas, en esta posición está presente un triptofano o una fenilalanina. Es importante resaltar que los contactos y el sitio de unión de este análogo de sustrato en RibH2 de *B. abortus*, se superpone con el de otras LS unidas al mismo o semejante análogo, indicando una alta conservación entre especies (Ritsert 1995; Persson 1999; Meining 2000; Gerhardt 2002; Zhang 2003; Morgunova 2005).

Las particularidades estructurales de cada uno de los sitios de unión de los sustratos de RibH2 de *B. abortus* se relacionaron con sus constantes de disociación medidas durante el estudio enzimático de la proteína. La constante de disociación entre RibH2 y But-F fue significativamente mayor a la reportada para otras LS y coincidentemente su sitio de unión se encontró estructuralmente distorsionado. Por otra parte en cuanto a RPD, tanto las características estructurales del sitio de unión como la afinidad de la proteína por el mismo fueron comparables a las reportadas para otras LS.

En resumen, los estudios enzimáticos y estructurales en conjunto revelaron que RibH2 de *B. abortus*, como consecuencia de su arreglo cuaternario especial, sólo conservó una débil afinidad por uno de sus sustratos y consecuentemente una actividad de LS residual. Estos hechos, junto con el hallazgo de un segundo gen que codifica para una enzima que cataliza la reacción enzimática más eficientemente (RibH1), descartaron prácticamente la posibilidad de postular a RibH2 como una LS en *B. abortus*.

Hasta el momento, se describió un análisis enzimático y estructural de las proteínas RibH de *B. abortus*, en el cual hallamos importantes características de las mismas. Dado que RibH2 sólo presentó actividad residual, permanecía sin responder la pregunta sobre cuál pudo haber sido la presión de selección que previno la pérdida del gen *ribH2* (en el caso que los genes *ribH1* y *ribH2* fueran evolutivamente ancestrales en *Brucella*) o bien que favoreció su más reciente adquisición por transferencia horizontal (previo a la especiación). Para abordar estas preguntas nos pareció ventajoso realizar un análisis filogenético de las diferentes proteínas que presentan similitud de secuencia con una LS (es decir, proteínas pertenecientes a la familia de LS).

Organismo con dos secuencias <i>ribH</i> .	Reino, orden o grupo
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (Bja)	$\alpha$ -proteobacteria; Rhizobiales
<i>Brucella melitensis</i> (Bme)	$\alpha$ -proteobacteria; Rhizobiales
<i>Brucella suis</i> (Bsu)	$\alpha$ -proteobacteria; Rhizobiales
<i>Mesorhizobium loti</i> (Mlo)	$\alpha$ -proteobacteria; Rhizobiales
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (Rpa)	$\alpha$ -proteobacteria; Rhizobiales
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (Sme)	$\alpha$ -proteobacteria; Rhizobiales
<i>Silicibacter pomeroyi</i> (Sipo)	$\alpha$ -proteobacteria; Rhodobacterales
<i>Caulobacter crescentus</i> (Ccr)	$\alpha$ -proteobacteria; Caulobacterales
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Pfl)	$\gamma$ -proteobacteria; Pseudomonadales
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (Psy)	$\gamma$ -proteobacteria; Pseudomonadales
<i>Nocardia farcinica</i> (Nfa)	Actinobacteridae; Actinomycetales
<i>Aeropyrum pernix</i> (Ape)	Archaea; Desulfurococcales
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> (Afu)	Archaea; Archaeoglobales
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> (Mja)	Archaea; Methanococcales
<i>Methanopyrus kandleri</i> (Mka)	Archaea; Methanopyrales
<i>Methanosarcina acetivorans</i> (Mac)	Archaea; Methanosarcinales
<i>Methanosarcina mazei</i> (Mma)	Archaea; Methanosarcinales
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> (Mth)	Archaea; Methanobacteriales
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> (Pae)	Archaea; Thermoproteales
<i>Sulfolobus solfataricus</i> (Sso)	Archaea; Sulfolobales
<i>Sulfolobus tokodaii</i> (Sto)	Archaea; Sulfolobales

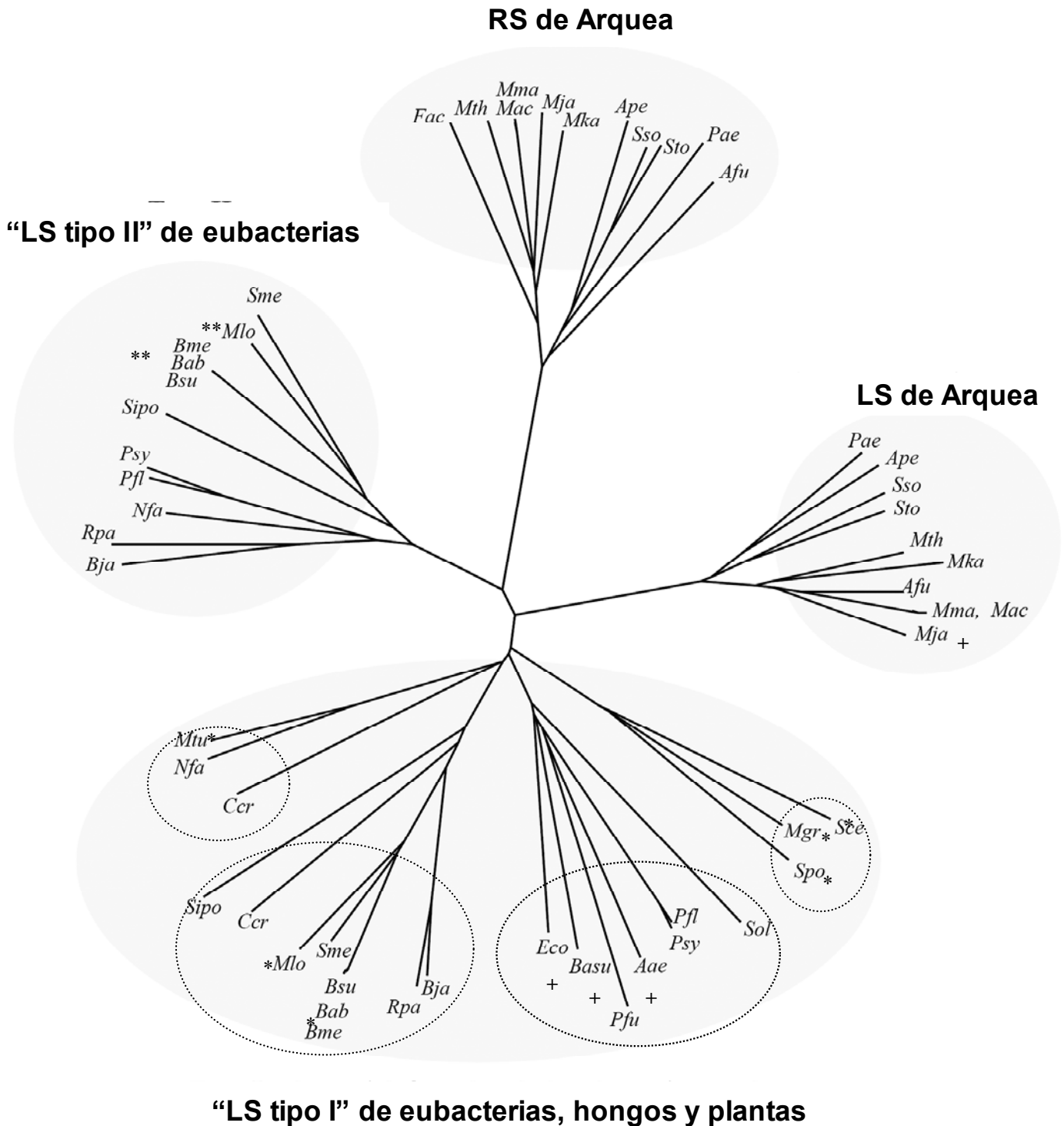
**Tabla 12.** Organismos cuyos genomas fueron secuenciados y presentaban dos genes diferentes con similitud de secuencia a LS (*ribH1* y *ribH2*).

### ***Evolución de la vía biosintética de la riboflavina.***

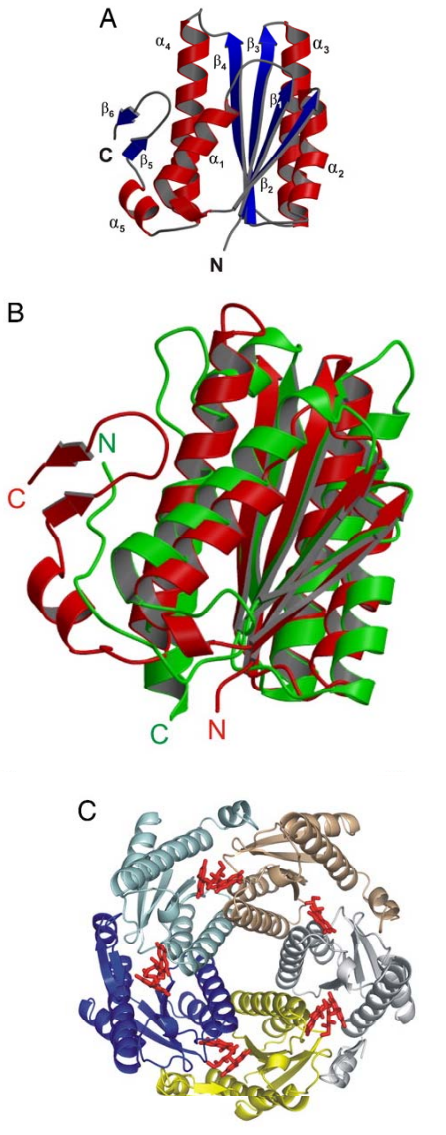
Se llevó a cabo una búsqueda informática en la cual se seleccionaron aquellos organismos cuyos genomas fueron secuenciados y que presentaban dos genes diferentes con similitud de secuencia a LS (*ribH1* y *ribH2*). En la Tabla 12, se muestran los diversos organismos que comparten esta característica; entre ellos se encontraron principalmente bacterias pertenecientes al grupo  $\alpha$ -proteobacterias,  $\gamma$ -proteobacterias, actinobacteria y organismos pertenecientes al reino Arquea. Utilizando las secuencias aminoacídicas de éstas hipotéticas LS junto con las secuencias de las LS actualmente caracterizadas (tanto de tipo icosaédrico como pentamérico), se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal X. A partir de este alineamiento se llevó a cabo un estudio filogenético, cuyo resultado se muestra en la Figura 50. Globalmente, se puede observar que el árbol filogenético de las proteínas que forman parte de la familia de LS, presenta una divergencia evolutiva generando cuatro ramas bien definidas. Todas las proteínas bacterianas, fúngicas o de plantas que fueron caracterizadas como LS activas, se ubican dentro de una sola rama. A las proteínas que se agruparon en esta rama se las denominó: “**LS tipo I**” y en todos los casos la secuencia codificante se encuentra formando parte del operón *rib*. Resulta importante recalcar que este grupo está definido funcionalmente ya que las proteínas pertenecientes al mismo resultan agrupadas independientemente de su estructura cuaternaria. Dentro de este grupo, se pueden distinguir cuatro ramificaciones, que en sólo una de ellas se ubican las LS de tipo icosaédricas caracterizadas hasta el momento. En las otras tres ramificaciones encontramos algunas proteínas que fueron clasificadas como LS pentaméricas. Las proteínas RibH1 (provenientes de organismos en cuyos genomas existen dos genes distintos, ambos con similitud de secuencia a la LS), se encuentran siempre dentro de la rama “LS tipo I” y mayoritariamente agrupadas entre sí. Entre ellas se ubica RibH1 de *B. abortus*. Existen algunas particularidades como por ejemplo la RibH1 de *P. fluorescens* (Pfl) y *P. syringae* pv *tomato* (Psy), que según nuestra predicción se agrupan junto con las LS icosaédricas. Otro caso es el de RibH1 de *N. farcinica*, la cual comparte mayor similitud de secuencia con la enzima de *M. tuberculosis*, recientemente caracterizada como pentamérica, pero que por alguna razón desconocida no se agrupan junto con el resto de las LS pentaméricas.

En otra de las ramas se encuentran las proteínas provenientes de eubacterias que comparten similitud de secuencia primaria con RibH2 de *Brucella abortus* y que no forman parte del operón rib (Figura 43). Las proteínas pertenecientes a esta rama fueron denominadas “**LS tipo II**”. Todos éstos organismos a su vez poseen en su genoma otra secuencia que codifica para una proteína LS tipo I.

Llamativamente, *C. crescentus*, una  $\alpha$ -proteobacteria, posee dos secuencias con similitud a la LS, sin embargo, ninguna de ellas se ubica dentro del grupo de las “LS tipo II”. Según este estudio filogenético, una de ellas se agrupa junto con las enzimas RibH1 y la otra junto a la LS pentamérica de *M. tuberculosis*. Este organismo sería el único (hasta el momento) que tendría dos proteínas LS tipo I.



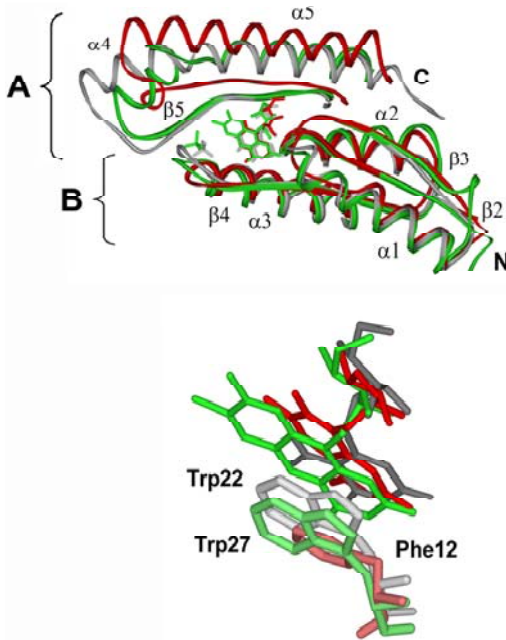
**Figura 50. Análisis filogenético de la familia de proteínas de LS.** Se puede observar una divergencia en cuatro ramas: (i) “LS tipo I”, provenientes de eubacterias, plantas y hongos, (ii) “LS tipo II” de eubacterias (decaméricas), (iii) “LS de Arqueas” y (iv) “RS de Arqueas” (pentaméricas). + (proteínas icosaédricas), \*\* (proteínas decaaméricas), \* (proteínas pentaméricas). Los organismos se indican de la siguiente forma: Aae, *A. aeolicus* (Zhang 2003); Afu, *Archaeoglobus fulgidus*; Ape, *Aeropyrum pernix*; Bab, *B. abortus*; Basu, *B. subtilis* (Ladenstein 1994); Bja, *Bradyrhizobium japonicum*; Bme, *B. melitensis*; Bsu, *B. suis* (Zylberman 2004); Ccr, *Caulobacter crescentus*; Eco, *E. coli* (Mortl 1996; Moreno 2002a); Fac, *Ferroplasma acidarmanus*; Mac, *Methanosarcina acetivorans*; Mgr, *M. grisea* (Persson 1999); Mja, *Methanococcus jannaschii* (Fischer 2004); Mka, *Methanopyrus kandleri*; Mlo, *M. loti*; Mma, *Methanosarcina mazei*; Mth, *Methanobacterium thermoautotrophicum*; Mtu, *M. tuberculosis* (Ross 1994; Foster 1996; Watson 2003; Morgunova 2005); Nfa, *Nocardia farcinica*; Pae, *Pyrobaculum aerophilum*; Pfl, *Pseudomonas fluorescens*; Pfu, *Pyrococcus furiosus*; Psy, *P. syringae*; Rpa, *R. palustris*; Sce, *S. cerevisiae* (Jahans 1997; Meining 2000); Sipo, *Silicibacter pomeroyi*; Sme, *S. meliloti*; Sol, *S. oleracea* (Persson 1999); Spo, *S. pombe* (Gerhardt 2002); Sso, *Sulfolobus solfataricus*; Sto, *Sulfolobus tokodaii*.



**Figura 51.** A, representación del monómero de RS de *M. jannaschii*. B, Superposición del monómero de RS de *M. jannaschii* (rojo) con el monómero de LS de *S. pombe* (verde). C, Representación del pentámero de la RS *M. jannaschii* acomplejada con 6,7-dioxo-8-ribityllumazina (rojo), cada monómero se mostró en un color diferente. Obtenido de (Braden 2000; Ramsperger 2006).

Por otra parte, se encuentran los organismos pertenecientes al reino Arquea que presentan dos ORF, ambos con similitud de secuencia primaria a la LS. Éstos divergieron evolutivamente, conformando las otras dos ramas del árbol filogenético de la Figura 50. En una de las ramas (derecha) se encuentran las proteínas que se agrupan junto a la proteína de *Methanocaldococcus jannaschii* (*Mja*), enzima caracterizada funcional y estructuralmente por Haase *et al.* (Haase 2003). En este trabajo los autores demostraron que la misma presenta actividad de LS y forma una estructura icosaédrica en solución. Por lo tanto, según nuestro análisis y predicción, éste grupo de proteínas conforman las llamadas **"LS de Arquea"**. La otra rama de Arquea (arriba, Figura 50), constituye un grupo sumamente interesante. En trabajos recientes se analizó la estructura y función de dos miembros de éste grupo: *Methanocaldococcus Jannaschii* (*Mja*) y a *Methanothermobacter thermautotrophicus* (*Mth*) (Fischer 2004; Fischer 2005; Ramsperger 2006). En estos trabajos se demostró que ambas son proteínas que si bien comparten similitud en la secuencia primaria con una LS y también un plegamiento general parecido (se ordenan en forma pentamérica) (Figura 51), en realidad poseen actividad enzimática de RS, enzima siguiente de la vía metabólica de las flavinas (Figura 3). Los representantes de ésta rama fueron denominados **"RS de Arquea"**.

Interesantemente, los representantes de las RS de arquea, se asemejan a RibH2 de *B. abortus* (LS tipo II) en algunos aspectos, tales como: 1) Las RS de arquea presentan conservado el sitio de unión de uno de los sustratos de la LS, el de unión a RPD, nos referiremos a él como "sitio A". En ese sitio en lugar del sustrato de la LS, en las RS de Arquea, se une una molécula de 6,7-dimethyl-8-ribityllumazina (sustrato de la reacción catalizada por la RB, Figura 3). Es importante recordar que el análisis de la estructura cristalográfica de RibH2 de *B. abortus*, reveló que también esta proteína mantuvo conservado a lo largo de la evolución el "sitio A". Este sitio, cualquiera sea la proteína, invariablemente está comprendido entre dos monómeros (A y B) de un mismo pentámero. 2) La interacción entre la RS de arquea y la 6,7-dimethyl-8-ribityllumazina en el "sitio A", es semejante a la interacción entre RibH2 de *B. abortus* o entre una LS tipo I y el anillo isoaloxazina de RPD. En la Figura 52 se muestra una superposición de una RS de Arquea con una LS tipo I y una LS tipo II, donde se observa que presentan un plegamiento general semejante en torno al "sitio A". Cada proteína fue cristalizada acomplejada con el análogo de sustrato (LS tipo II: 5-nitro-6-ribitylamino-2,4-pirimidinadiona, NRP), sustrato



**Figura 52. Comparación estructural de una LS tipo I, tipo II y una RS de arquea. (Arriba)** Superposición de RS *M. jannaschii* (rojo), LS tipo I de *S. pombe* (verde), y una LS tipo II de *B. abortus* (gris). Los sitios activos se forman entre dos monómeros adyacentes (A y B). La LS de *S. pombe* fue cristalizada unida a riboflavina (verde; residuos E17 a D112 y S113 a L158), RibH2 fue cristalizada unida a NRP (residuos S12 a E106 y T107a L156), y la RS de *M. jannaschii* unida a 6,7-dioxo-8-ribitillumazina (residuos T2 a M90 y T91a Y135). La denominación de los elementos de estructura secundaria se refieren a la LS de *S. pombe*. Se muestra solamente la estructura en torno al "sitio A", conformado entre el monómero A y B. Los ligandos se muestran en los respectivos colores. **(Abajo)** Ampliación de la ubicación del Trp27 (de *S. pombe*), Trp22 (de *B. abortus*) y Phe12 (de *M. jannaschii*) (Zylberman 2006).

(RS: 6,7-dimethyl-8-ribitillumazina) ó inhibidor de sustrato (LS tipo I: riboflavina) (Figura 52); notar que los triptofanos ó fenilalaninas a su vez se superponen perfectamente bien (Figura 52). 3) Las RS de arquea como así RibH2 de *B. abortus*, no presentan en su estructura un sitio de unión para But-F semejante al existente en las LS tipo I o en las LS de arquea (denominado "sitio B"). Coincidentemente, ninguna de las dos proteínas presentaron alta afinidad por tal sustrato y solo mostraron actividad catalítica residual de LS.

Según las similitudes planteadas entre una LS tipo II y una RS de arquea, resultaba pertinente determinar si RibH2 de *B. abortus* era capaz de catalizar la síntesis de riboflavina. Los estudios enzimáticos realizados por nuestros colaboradores en Alemania, determinaron fidedignamente que RibH2 de *B. abortus* no cataliza tal reacción enzimática, descartando la posibilidad que esta proteína fuese una RS.

El análisis filogenético presentado junto con la determinación estructural y caracterización enzimática de algunas proteínas involucradas, develaron una posible relación evolutiva para la topología de las LS. El plegamiento polipeptídico relacionado con la función catalítica de lumazina sintetasa dio lugar a al menos tres funciones diferentes: (a) la LS propiamente dicha, (b) la RS de arquea, que son "lumazinas sintetasa-like" sin actividad de LS detectable y (c) la LS tipo II de eubacterias, cuya función biológica permanece aun sin ser descripta. A partir de los estudios filogenéticos aquí presentados, no es posible determinar cual fue la función catalítica ancestral. Por lo tanto, aunque estructuralmente relacionadas, las proteínas que presentan una similitud de secuencia y un plegamiento general de LS, no necesariamente poseen ésta función biológica.

Estos resultados nos indujeron en parte a contestar y en parte a reformular la pregunta: "cual pudo haber sido la presión de selección que previno de la perdida del gen *ribH2* (en el caso que los genes *ribH1* y *ribH2* fueran evolutivamente ancestrales en *Brucella*) o bien que favoreció su más reciente adquisición por transferencia horizontal (previo especiación)". Posiblemente, la presión de selección previno la pérdida del gen *ribH2* porque existió una ventaja adaptativa otorgada por la proteína codificada por el mismo. ¿Pero, cuál es la función biológica que otorgaría tal ventaja adaptativa? Esta pregunta, aunque sencilla de formular, constituye un problema complejo de contestar. En la última parte de mi Tesis intenté acercarme a su respuesta.



## Parte B

**“P18, RibH2 ó LS tipo II: ¿Función biológica?”**

*P18, posteriormente denominada RibH2 (ó LS tipo II), proteína inmunológicamente relevante y postulada como marcador serológico de la brucelosis fue considerada durante un tiempo como una enzima pentamérica con actividad de lumazina sintetasa. A lo largo del capítulo I de esta tesis se demostró que verdaderamente presenta una estructura cuaternaria novedosa, nunca antes descrita para una LS. A partir de los estudios enzimáticos y el hallazgo de un segundo gen que codifica para una LS en B. abortus (RibH1), se determinó que RibH2 sólo presenta actividad residual de LS, siendo RibH1 la enzima funcional en dicho organismo. A continuación y a raíz de una evaluación filogenética, se encontró que el plegamiento característico de las LS dio origen a diferentes funciones catalíticas fuera de la LS tipo I y LS de arquea. Por ejemplo, en el caso de Arquea, dio origen a la actividad de riboflavina sintetasa (RS de arquea). Por otra parte, las LS tipo II, son proteínas que se asemejan a las LS en cuanto a su topología general, pero no comparte la misma función biológica. En la última parte de esta Tesis, me propuse indagar acerca de cual podría ser el posible rol biológico de dicha proteína. Dado que como integrante de las LS tipo II, solamente contábamos con RibH2 de Brucella abortus, parecía adecuado clonar y caracterizar una RibH2 de otro organismo filogenéticamente relacionado como por ejemplo Mesorhizobium loti. De este modo por un lado se podrá en parte validar las predicciones realizadas a partir del estudio filogenético de ésta familia de proteínas, y por el otro abriría la posibilidad de analizar el rol biológico de RibH2 en un organismo no patogénico para humanos.*

*Los objetivos puntuales de esta parte de la tesis son:*

- **Clonar, purificar y caracterizar estructuralmente las proteínas RibH1 y RibH2 de M. loti.**
- **Analizar posibles ligandos de RibH2 de B. abortus.**

**Clonado y caracterización de RibH1 y RibH2 de *M. loti*.**

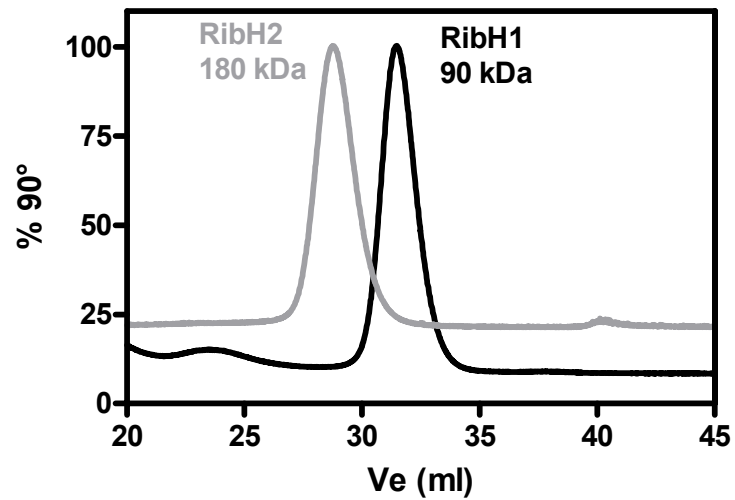
*Mesorhizobium loti*, al igual que *B. abortus* posee dos genes cuyos productos presentan similitud con la LS. La Figura 53 muestra un alineamiento de las secuencias aminoacídicas codificadas por tales genes, con las secuencias de *B. abortus*. Se puede notar la gran similitud en la estructura primaria existente entre las proteínas RibH2, como así entre las RibH1 (Figura 53). Según la hipótesis que se planteó en la parte A de este capítulo, la proteína RibH1 de *M. loti* tendría una función en la biosíntesis de las flavinas (LS tipo I), mientras que la función biológica de la proteína RibH2 de *M. loti* no estaría relacionada a ésta vía metabólica (LS tipo II) (Figura 50). Resultaba interesante validar experimentalmente algunas de las predicciones basadas en el estudio filogenético de esta familia de proteínas. A su vez estos datos serán útiles para abordar el estudio de la funcionalidad biológica de RibH2 también en *M. loti*.

<i>M. loti</i> -RibH1	MAGISQHGKAFIRPKAKAHLIIVEARFHDDLADALLDGATSALEEAGATYDVVTVPGSLE 60
<i>B. abortus</i> -RibH1	MEFLMSK-----HEADAPHLIIVEARFYDDLADALLDGAKAALDEAGATYDVVTVPGALE 55
	* : .: .: : : .*****:*****:***:*****:***
<i>M. loti</i> -RibH1	IPAVITFALDGAEEGGTINYDGFVALGTIIRGDTYHFDIVANESSRALMMSVQDSVCIGN 120
<i>B. abortus</i> -RibH1	IPATISFALDGDANGGTEYDGFVALGTIVIRGETYHFDIVSNESCRALITDLSVEESIAIGN 115
	***.:***** :***:*****:***:*****:***.*** *:***:*.***
<i>M. loti</i> -RibH1	GILTTENDAQAQWTRAKRSEGDKGGFAARAALIMIALKEQLGARS 164
<i>B. abortus</i> -RibH1	GILIVENEEQAWVHARREDKDKGGFAARAALIMIGLRKKFGA-- 157
	****.**: ***.:*.: *****:***:***
<i>M. loti</i> -RibH2	MNQSHSKDYETVRIAVVRARWHADIVDQCVSFAEEMADIGGDRFAVDVDFVPGAYE IPL 60
<i>B. abortus</i> -RibH2	MNQ-SCPNTSFKIAFIQARWHADIVDEARKSFVAELAAKTGGSSVEVEIFDVPAYE IPL 59
	*** * : :.***:*****: . :* ***: * . . **:*****
<i>M. loti</i> -RibH2	HARTLAETGRYGAVLGTAFVVGGIYRHEFVASAVIDGMMNVQLSTGVPVLSAVLTPHNY 120
<i>B. abortus</i> -RibH2	HAKTLARTGRYAAIVGAFFVIDGGIYRHFVATAVINGMMQVQLETEVPVLSVVLTPHNF 119
	**:* ** .*** .*:**:*:*****:***:***:***:***.* *****.*****::
<i>M. loti</i> -RibH2	HDSAEHHRFFFEHFIVKGKEAARACVEILAAREKIAA-- 157
<i>B. abortus</i> -RibH2	HESKEHHDFFHAHFVKVGEAAHAALQIVSERSRIAALV 158
	*:* *** ** .**.* **:*:***:*.***

**Figura 53. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de RibH1 y RibH2 provenientes de *M. loti* con las provenientes de *B. abortus*.** Las secuencias provinieron de la base de datos HMM (Gough 2001) y se utilizó el programa para alineamiento Clustal W. Los símbolos denotan el grado de conservación, “\*” idénticos, “.” sustitución conservativa, “.” sustitución semi-conservativa.

Con la intención de estudiar estructural y funcionalmente a las proteínas RibH1 y RibH2 de *M. loti*, se clonaron los genes *ribH1* y *ribH2* a partir del ADN de dicho organismo. Brevemente, la metodología empleada fue la de PCR haciendo uso de cebadores específicos diseñados para cada gen (más detalles en materiales y métodos). Los productos de PCR fueron subclonados en un vector (pET11a) y se seleccionaron mediante PCR (utilizando los mismos cebadores) aquellos clones positivos que contenían el gen en cuestión. Por último se realizó una secuenciación de los clones positivos para la PCR. Una vez confirmada la presencia de los genes *ribH1* o *ribH2* en el vector de subclonado se comenzaron con los ensayos de sobreexpresión del producto de los mismos. Se seleccionó un clon que mayor sobreexpresión presentó de RibH1 o de RibH2, a fin de realizar el mismo procedimiento a mayor escala. Las fracciones citosólicas de los cultivos bacterianos (que sobreexpresaban cada una de las proteínas) fueron sometidas a dos pasos de purificación; la primera con una columna de intercambio iónico y la segunda por un tamiz molecular. Finalmente se logró purificar a las proteínas RibH1 y RibH2 de *M. loti* recombinantes a homogeneidad. El PM de las proteínas desnaturalizadas corridas en un SDS-PAGE coincidió con el PM teórico calculado según la estructura primaria de las mismas (17,19 kDa para RibH1) y (17,28 kDa para RibH2) (resultado no mostrado). Las muestras proteicas purificadas fueron sometidas a SLS/IR/UV con el objetivo de determinar el PM de las mismas en solución. La Figura 54 muestra el perfil de elución de RibH1 y RibH2 de *M. loti*. El PM calculado para RibH1 fue de 85 KDa, compatible con un arreglo pentamérico de sus subunidades. Por otro lado, como se ve en la Figura 54, RibH2 de *M. loti* es una proteína de mayor tamaño que RibH1, coincidentemente su volumen de elución por una columna S-200 fue mayor. El PM calculado por SLS/IR/UV para la misma fue de 178 kDa, indicando que RibH2 de *R.loti* en solución se comporta como una partícula decamérica. Según los resultados preliminares obtenidos, RibH1 de *M. loti* comparte el mismo grado de estructura cuaternaria que RibH1 de *B. abortus*, lo mismo ocurre con las proteínas RibH2 de las bacterias comparadas.

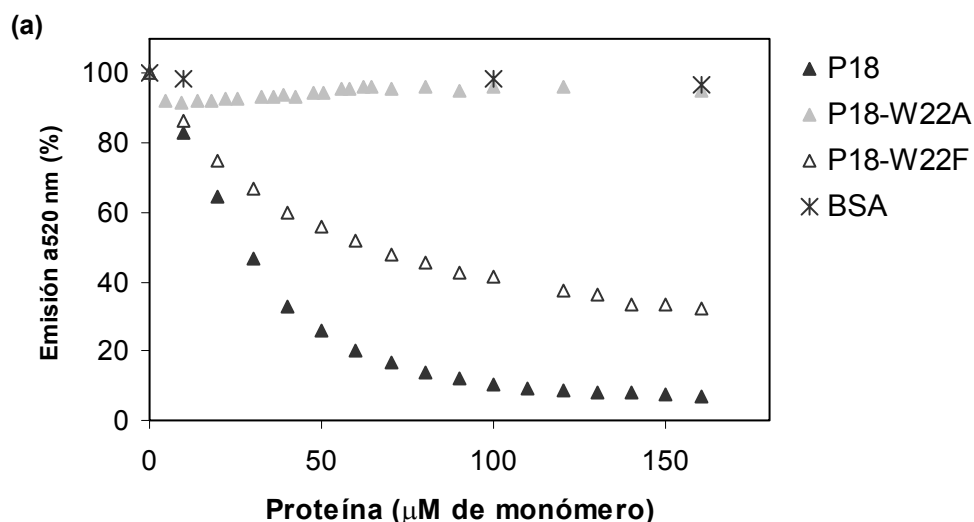
**Figura 54. Corrida S-200 acoplada a los detectores de SLS/IR/UV de las proteínas RibH1 y RibH2 de *M. loti*.** Se graficó la señal de SLS en función del volumen de elución. Las dos proteínas fueron sembradas por separado en una columna S-200 equilibrada en el mismo buffer que las muestras (fosfato 50 mM, pH 7,0). En el gráfico se señala el PM del pico proteico.



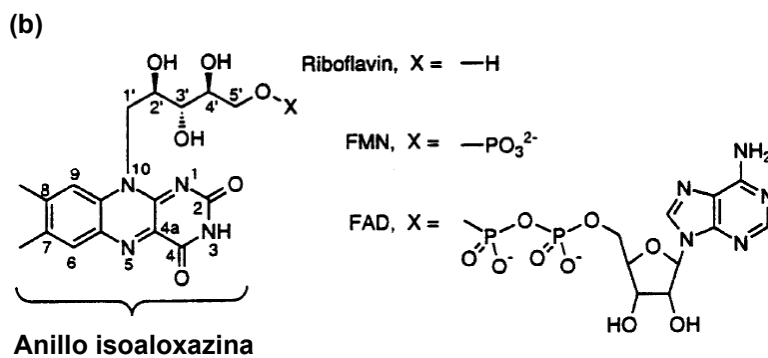
Recientemente se comenzó a llevar a cabo en Alemania, junto con nuestros colaboradores, la determinación de la actividad enzimática de las proteínas de *M. loti*. Según las primeras mediciones, RibH1 de *M. loti* es una enzima la cual presenta alta actividad de LS (LS tipo I), mientras que RibH2 solamente tiene una actividad LS residual (resultado no mostrado). Sumado a esto, últimamente se obtuvieron en el laboratorio cristales de RibH2 de *M. loti*. El estudio cristalográfico preliminar de los mismos reveló que la proteína es un dímero de pentámeros, semejante a su homóloga en *Brucella abortus*. En conclusión, el hallazgo que RibH2 de *M. loti* presenta una estructura decamérica y sólo una actividad catalítica residual, y a su vez que RibH1 del mismo organismo es una proteína pentamérica con actividad de LS, coincide con la información inferida a partir del estudio filogenéticos de esta familia de proteínas. Estos resultados abren la posibilidad de comenzar a encarar diversos estudios funcionales de RibH2 en *M. loti*. En este sentido sería interesante conocer si la mutante de delección del gen ribH2 en *M. loti* presenta algún fenotipo interesante ó alteraciones en su relación con el huésped.

**Caracterización bioquímica de la unión de RibH2 de *B. abortus* a diferentes moléculas.**

Como se mostró en la parte A de éste capítulo, RibH2 de *B. abortus* mantuvo su capacidad de unir RPD (en el "sitio A"), pese a no catalizar tal reacción enzimática. Es más, todas las proteínas pertenecientes a la familia de las LS que fueron caracterizadas hasta el momento, presentan conservado a lo largo de la evolución el "sitio A", independientemente si poseen ó no actividad de LS. Por otra parte, se conoce que la riboflavina actúa como inhibidor de algunas LS (en particular de las LS tipo I). El mecanismo por el cual se postuló que la riboflavina inhibe la reacción catalítica es el de inhibición competitiva

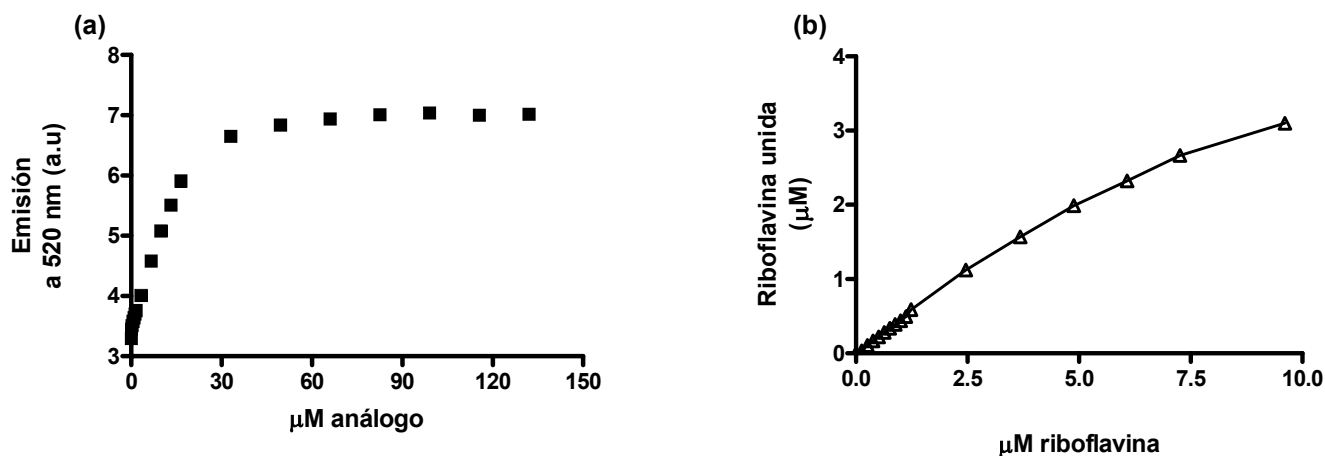


**Figura 55. Unión RibH2-riboflavina determinada por apagamiento de la señal de fluorescencia de la riboflavina.** (a) A una muestra de riboflavina (45 μM) se le fue adicionando cantidades crecientes de proteína (RibH2, mutantes ó BSA). Se midió el apagamiento de la señal de emisión a 520 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 445 nm. La emisión inicial de riboflavina se consideró como el 100 % de emisión. BSA fue la proteína utilizada como control negativo. (b) Estructura química de la riboflavina, FMN y FAD.



por unión al “sitio A”. En este caso, la acción de la riboflavina es interpretada como un punto de regulación en la biosíntesis de la riboflavina, ya que el producto final actúa como inhibidor de una de las enzimas involucradas en su propia síntesis (“feedback” negativo). Dada la conservación que RibH2 de *B. abortus* presentó en este sitio, se pensó en estudiar su facultad de unir la riboflavina, en este caso no como inhibidor, sino como un posible ligando fisiológico. Un modo posible de medir y cuantificar la unión de riboflavina a RibH2, es mediante una técnica fluorimétrica. La riboflavina emite fluorescencia a 520 nm cuando es excitada a 445 nm y es de esperar que su emisión disminuya en tanto interaccione con la proteína (Becvar 1982; Eftink 1997; Lakowicz 2002). Se trabajó con una solución de riboflavina (45  $\mu$ M) a la cual se le adicionó cantidades crecientes de proteína y se monitoreó la señal de fluorescencia a 520 nm (correspondiente a la riboflavina libre). Como muestra la Figura 55a, al agregar cantidades crecientes de RibH2, se pudo observar una disminución significativa en la emisión de fluorescencia de la riboflavina, reflejando la unión específica de ambas moléculas. Como se mencionó anteriormente, las proteínas de la familia de la LS conocidas hasta el momento, presentan conservado en la posición 22 (tomando como referencia a RibH2 de *B. abortus*) un residuo fenilalanina ó triptofano. La conservación de dicha posición se relaciona con la estabilización de la interacción con el sustrato (por los contactos entre el grupo fenilo ó indol de la posición 22 con el anillo isoaloxazina del sustrato). Nos pareció interesante estudiar la importancia de la conservación del triptofano 22 de RibH2 de *B. abortus*, en la unión a la riboflavina. Para ello, se diseñaron y obtuvieron dos mutantes de RibH2 a las que se les reemplazó el triptofano natural por una fenilalanina ó por una alanina: RibH2-W22F ó RibH2-W22A (ésta última fue caracterizada estructuralmente en el capítulo I, parte B). Tal como muestra la Figura 55a, el reemplazo del triptofano por una fenilalanina disminuyó la capacidad de RibH2 de unir riboflavina. Sin embargo al mutagenizar este sitio por una alanina, no se detectó cambio alguno en la emisión de fluorescencia de la riboflavina. Estos resultados destacan la importancia del residuo indol presente en la proteína salvaje para la estabilización de la interacción con la riboflavina. En el presente ensayo se asume que la disminución en la señal de fluorescencia de la riboflavina es principalmente debida al apagamiento de la emisión producido por la interacción entre el anillo isoaloxazina de la misma y los grupos indol ó fenilo de la proteína. Sin embargo la ausencia de un cambio en la emisión (como ocurrió con la mutante RibH2-W22A), no descarta que

exista una interacción física débil que no resulte en cambios de la señal medida. Una vez formado el complejo RibH2-riboflavina, esta última es capaz de ser desplazada de su sitio de unión por el análogo de sustrato NRP (Figura 56a), el mismo que fue empleado para la cristalización de la proteína. En el análisis cristalográfico, se encontró que este análogo interactúa con el “sitio A” de RibH2. Por lo tanto, el resultado de desplazamiento demuestra que el sitio de unión de la riboflavina es el mismo que el de unión a NRP. Según los ensayos de unión y desplazamiento, se determinó que RibH2 de *B. abortus*, une riboflavina con una relación equimolar (mol de riboflavina por mol de monómero de RibH2, Figuras 55 y 56a). A fin de determinar la constante de disociación ( $K_D$ ) de ésta interacción, se realizaron ensayos de titulación de riboflavina libre. En cada ensayo se trabajó con una concentración fija de proteína (1 a 10  $\mu\text{M}$  monómero) y se adicionó cantidades crecientes de riboflavina (de 0,1 a 100  $\mu\text{M}$ ); en cada paso de titulación se determinó la cantidad de ligando libre midiendo la emisión de la muestra a 520 nm (Figura 56b). Para cada experimento se realizó en paralelo un control en el cual se tituló la concentración de riboflavina libre en una muestra sin proteína y bajo las mismas condiciones experimentales. La constante de disociación para la riboflavina resultó ser de  $7 \pm 1 \mu\text{M}$  (para más detalles ver materiales y



**Figura 56. Desplazamiento de la unión RibH2-riboflavina determinada por apagamiento por el análogo de sustrato y determinación de la  $K_D$ .** (a) Se formó el complejo RibH2-riboflavina (30  $\mu\text{M}$  riboflavina y 30  $\mu\text{M}$  monómero de RibH2), luego se adicionó cantidades crecientes de análogo (5-nitro-6-ribitilamino-2,4-pirimidinadiona, NRP). Se midió el aumento de la señal de emisión de riboflavina (520 nm, excitación a 445 nm) causado por el desplazamiento de la misma de su sitio de unión a RibH2 inducido por el análogo de sustrato. (b) Titulación de riboflavina. Se utilizó 5  $\mu\text{M}$  de monómero de RibH2 y se adicionó cantidades crecientes de riboflavina. Se midió la señal de fluorescencia de riboflavina en cada paso de titulación. Los datos fueron ajustados a la ecuación 16 y se obtuvo el valor reportado de  $K_D$ .

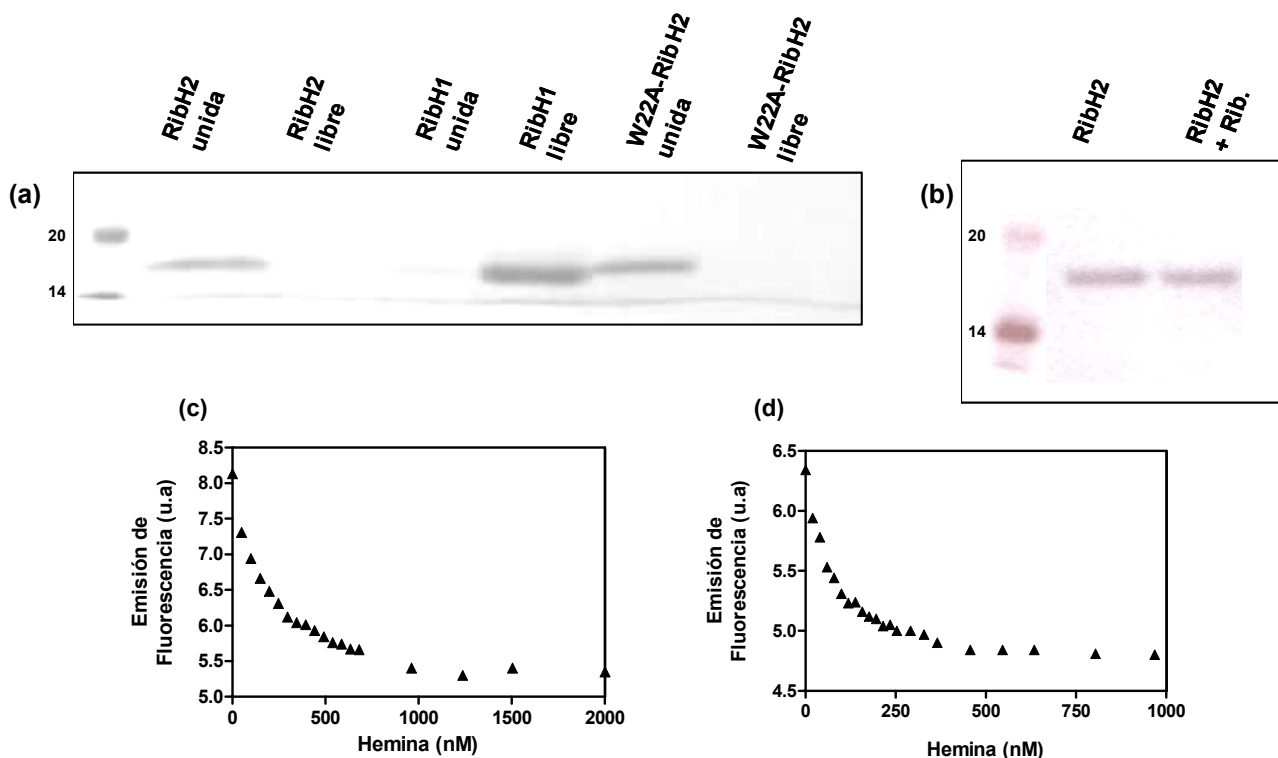


métodos). Dado que la riboflavina es el precursor de FMN y FAD, y estas moléculas solo difieren en su estructura por la presencia de un sustituyente en la cadena ribitilo (grupo fosfato en el FMN ó adenina dinucleótido fosfato en FAD) (Figura 55b), se ensayó la capacidad de RibH2 de unir tales moléculas. El estudio de la unión de FMN y FAD se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento que el reportado para los ensayos de unión de la riboflavina. Los resultados demostraron que RibH2 no posee la capacidad de unir FMN ó FAD (resultado no mostrado). Al modelar en el sitio A de la estructura cristalográfica de la proteína, una molécula de FMN o FAD, se encontró que los sustituyentes fosfato ó AMP en la cadena ribitilo de la riboflavina, producían un impedimento estérico importante imposibilitando la captación de dichas moléculas y coincidiendo con los resultados experimentales obtenidos (ver materiales y métodos).

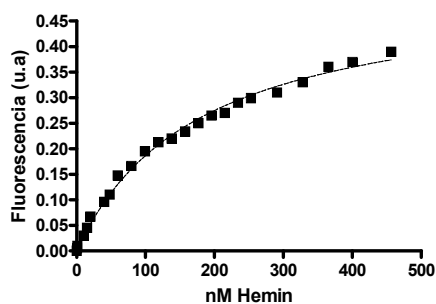
Recientemente, el grupo dirigido por el Dr. Baldi, estudiaba una proteína cuya función creían estaba relacionada con su capacidad de unión a la hemina ( $\text{Fe}^{3+}$ , protoporfirina IX). Estos investigadores pretendían demostrar la supuesta interacción, realizando una prueba física la cual requería de la utilización de una resina de hemina-agarosa (Delpino 2006). Para tales experimentos utilizaron como control negativo una muestra de RibH2 de *B. abortus*. Sorprendentemente, RibH2 mostró tener la capacidad de unirse a tal resina. Este resultado dirigió nuestro interés hacia el análisis y caracterización de la interacción entre RibH2 y la hemina, estudio que actualmente se encuentra en desarrollo. Los resultados que se mostrarán a continuación fueron obtenidos recientemente y forman parte de una evaluación preliminar del tema. Inicialmente se analizó la capacidad de RibH2 de interactuar con la hemina utilizando una resina hemina-agarosa comercial. Se incubó una muestra proteica con la resina durante 1 h a 4 °C y posteriormente se realizó una centrifugación de la misma aislándose dos fracciones, sobrenadante y precipitado, que corresponden a la proteína libre ó a la que permaneció unida a la resina, respectivamente. Ambas fracciones fueron sembradas en un gel al 15 % de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE). Se utilizó como control negativo de dicho ensayo a la proteína recombinante RibH1 de *B. abortus*, la cual fue sometida a la misma prueba. Como se puede apreciar en la Figura 57a, la proteína RibH2 fue detectada en la fracción correspondiente al precipitado, implicando que permaneció unida a la hemina-agarosa, mientras que RibH1 solo se encontró en el sobrenadante de la centrifugación, es decir

no persistió unida a la resina. Se obtuvo el mismo resultado cuando se realizó la incubación de RibH2 y la resina en presencia de 8 M urea, indicando una fuerte interacción entre las moléculas (resultado no mostrado). La mutante de RibH2 carente de triptofano (RibH2-W22A) también mostró ser capaz de interactuar con la hemina-agarosa del mismo modo que la proteína salvaje (Figura 57a), sugiriendo que el triptofano no asume un rol importante en dicha interacción contrariamente a lo ocurrido para la interacción con la riboflavina. Sumado a esto, la incubación de RibH2 con la resina y en presencia de elevadas concentraciones de riboflavina no afectó la unión de la proteína con la hemina (Figura 57b). Este resultado, junto con el obtenido para la mutante de triptofano, sugiere que RibH2 de *B. abortus* posee dos sitios diferentes, uno de unión a la hemina y otro a la riboflavina (sitio A), a su vez permite postular que la proteína puede unir simultáneamente ambas moléculas. Una vez unida RibH2 a la resina, resultó difícil poder separar ambas moléculas, aún utilizando altas concentraciones de NaCl, de urea o modificando el pH de la muestra, indicando una fuerte interacción entre las mismas.

Posteriormente se pretendió determinar mediante una técnica fluorimétrica la constante de disociación de la interacción analizada. Para ello se derivatizó a RibH2 en su extremo amino terminal, específicamente en la cisteína 7, con una sonda fluorescente, 5-iodoacetamidafluoresceína (RibH2-IAEFL). Dado que el compuesto fluorescente se encuentra unido a la cisteína y siendo ésta una región flexible de la proteína, se pensó que sería factible que la hemina produzca un apagamiento de la emisión de fluorescencia de la sonda al interactuar con la proteína. De comprobarse tal efecto, sería posible determinar la  $K_D$  de la interacción, midiendo la fluorescencia de la sonda en función del agregado de hemina libre (no como hemina-agarosa). La Figura 57c y d, muestra el resultado de dos titulaciones independientes en las cuales se adicionó cantidades crecientes de hemina a una muestra de proteína (250 ó 450 nM de monómero) y se midió para cada caso el cambio en la emisión de fluorescencia a 515 nm (con una longitud de onda de excitación a 492 nm). Como puede observarse, la unión de la hemina a la proteína produjo el apagamiento de la emisión de fluorescencia de la sonda. El cambio en la señal de emisión de fluorescencia se relacionó con la fracción de hemina unida a la proteína. Según este resultado la estequiometría de la reacción es un mol de hemina por mol de monómero de RibH2. El mismo ensayo de titulación se repitió para concentraciones más bajas de proteína (entre 1 a 50 nM de



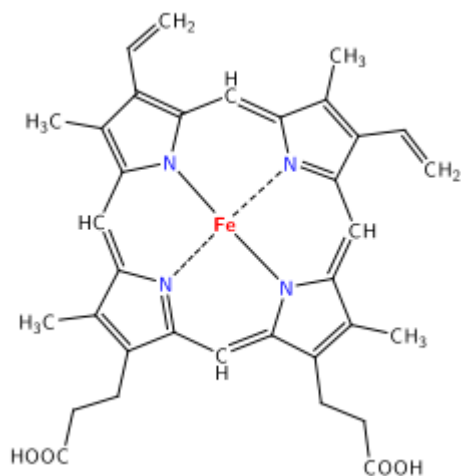
**Figura 57. Unión RibH2-Hemina.** (a) Muestras de RibH2, W22A-RibH2 ó RibH1 fueron incubadas con la resina hemina-agarosa durante 1 h a 4 °C y posteriormente centrifugadas. Se sembraron en un gel de poli-acrilamida desnaturante al 15 % las fracciones solubles (proteína libre) ó el precipitado (proteína unida a la resina) de cada una de las muestras. Pevio a la siembra los precipitados fueron incubados con buffer de siembra y calentados durante 10 min a 100 °C, posteriormente centrifugados (en el gel se corrió la fracción soluble). 20 y 14 representan los marcadores de PM. (b) Pevio a la incubación con la resina, una muestra de RibH2 se incubó con exceso de riboflavina. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento que el descrito en (a). (c) Titulación de hemina en una muestra de RibH2 cuyas cisteínas fueron tratadas con iodo acetamida-fluoresceína (IAE-FL). En este caso se utilizó una concentración de 450 nM de monómero de RibH2-IAE-FL y se tituló con hemina libre (de 10 a 2000 nM). Se midió el decaimiento de la señal de emisión a 515 nm (excitación a 492 nm). (d) Se realizó el mismo procedimiento que en (c) pero con una concentración de RibH2-IAE-FL de 250 nM de monómero.



**Figura 58. Titulación de hemina medida por fluorescencia.** Ensayo de titulación utilizando 1 nM de monómero de RibH2-IAE-FL. La línea representa el ajuste realizado de los datos.

monómeros de RibH2) a fin de calcular la constante de disociación, obteniéndose una  $K_D$  de 0,3 nM (Figura 58).

Las hemoproteínas, independientemente de las diferentes funciones en las que están implicadas, poseen como grupo prostético al hierro-protoporfirina IX (en su forma reducida como  $Fe^{2+}$ , denominada hemo, ó bien en su forma oxidada como  $Fe^{3+}$ , denominada hemina). Las protoporfirinas se clasifican por el tipo de sustituyentes periféricos, responsables del anclaje a las distintas proteínas. Las porfirinas son monociclos tetrapirrólicos aromáticos capaces de coordinar metales muy eficientemente. Las hemoproteínas estabilizan a una determinada coordinación del hierro presente en el núcleo de la porfirina. La reactividad del hemo esta relacionada con el hierro, que posee la capacidad



**Figura 59. Esquema del Hierro.** Hierro, Protoporfirina IX. La porfirina es un tetrapirrol cíclico compuesta por cuatro cadenas aromáticas de pirrol enlazadas, en su centro se encuentra el hierro. Se puede apreciar que este se une a cuatro N.

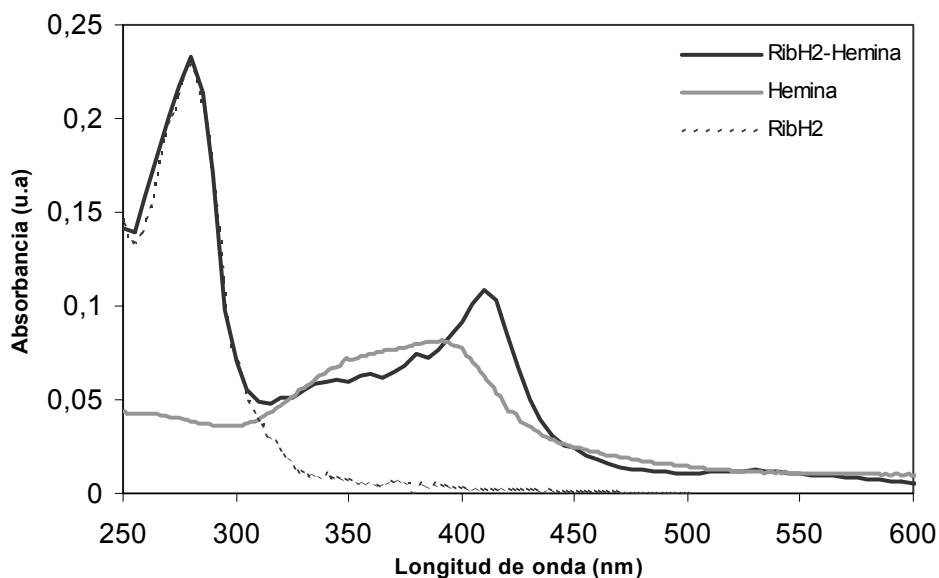
de formar 6 enlaces en una geometría tipo octogonal. Debido a la ubicación del hierro en el plano porfirínico, es capaz de formar enlaces con cada uno de los 4 nitrógenos de la porfirina (Figura 59). De este modo presenta dos enlaces adicionales con distintos ligandos, uno de cada lado del plano, conocidos como ligando proximal y distal. Comúnmente en las hemoproteínas el ligando proximal es un residuo de la misma proteína (generalmente un residuo electronegativo como histidina, cisteína, metionina o tirosina). Del otro lado el plano, se encuentra el sitio distal, que cuando se encuentra libre (no unido a un residuo proteico) es capaz de interactuar con un ligando exógeno. Estos son generalmente moléculas chicas (por ejemplo oxígeno en la hemoglobina u óxido nítrico en la guanilato ciclasa) las cuales al unirse en este sitio son transportadas ó modificadas químicamente. En el caso de las hemoproteínas involucradas en el transporte de electrones (por ejemplo el citocromo b<sub>5</sub>) el hierro se encuentra hexa-coordinado a dos aminoácidos. Las características de los entornos proximales y distales (lo cual depende de la estructura proteica), es lo que otorga a las hemoproteínas su diversidad funcional (transporte de electrones, transporte de oxígeno, sensado de oxígeno o de monóxido de carbono, catálisis de reacciones redox, transporte de hemo o hierro) (Ozaki 2001).

Existen varios trabajos publicados en los que deducen el mecanismo por el cual una determinada hemoproteína ejerce su función biológica, determinando la coordinación que el hierro adopta en dicha estructura y su reactividad con ligandos exógenos (Yonetani 1987; Ikeda-Saito 1992; Shipulina 1998; Ozaki 2001; Roberts 2003). La coordinación del hierro en una porfirina puede ser inferida utilizando diferentes técnicas espectroscópicas como espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR), espectroscopia de resonancia Raman, dicroísmo circular magnético (MDC), absorbancia de luz y coeficiente de absorción.

Como primer acercamiento, nos propusimos comenzar a estudiar las características de los espectros de absorción de luz UV visible del complejo RibH2-hemina. En las apoproteínas, la unión del hemo ó hemina, se caracteriza por promover la aparición de una banda de absorción de luz UV visible conocida como “banda de Soret”; a su vez la modificación de esta señal inducida por el agregado de un determinado reactivo, es un indicador de la existencia de algún sitio de coordinación accesible en el hierro. Con el propósito de obtener el complejo RibH2-hemina, se incubó a la proteína con una concentración en exceso de hemina y posteriormente se sembró a la

muestra en una columna G-25. Se recuperaron las diferentes fracciones eluidas y se seleccionó aquella fracción que presentó mayor absorbancia a 280 nm para realizar un espectro de absorbancia UV visible. En paralelo se sembró en la columna una muestra proteica control (la cual no fue incubada con hemina) y de la misma manera, se realizó un espectro de la fracción eluida que presentó mayor absorbancia a 280 nm. También se corrió por la columna una preparación de hemina libre, la cual permaneció retenida en la columna. La Figura 60, muestra la superposición de los espectros de absorbancia de luz UV visible de las dos fracciones proteicas seleccionadas y un espectro de una muestra de hemina preparada en el mismo buffer de elución. Como se puede notar, el espectro correspondiente a la fracción proteica eluida de la G-25 y previamente incubada con hemina mostró dos picos de absorbancia, uno a 280 nm (característico de los grupos aromáticos

**Figura 60.** Purificación y caracterización espectroscópica del complejo RibH2-Hemina. Se incubó a una muestra proteica (en PBS, pH 7,5) con un exceso de hemina y se sembró la preparación en una columna G-25. Se seleccionó la fracción eluida que presentó mayor DO a 280 nm. Se graficó el espectro de absorbancia UV visible de dicha fracción (línea negra). Como control, se graficó el espectro UV visible de una muestra proteica sin incubarse con hemina (línea punteada) y el de una muestra de hemina libre (línea gris).

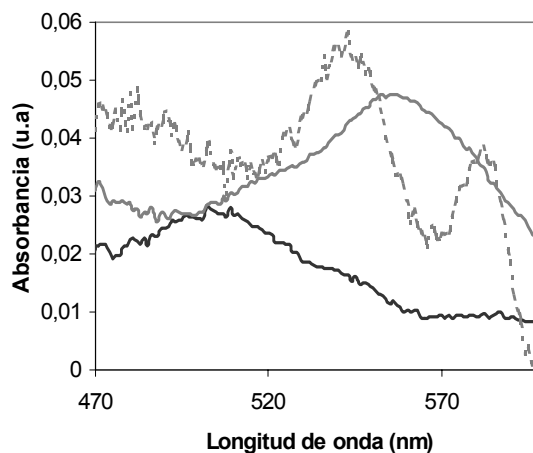
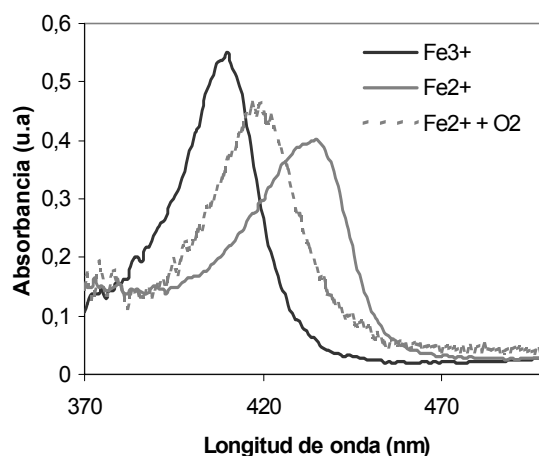


de la proteína) y otro a 410 nm que no se encuentra presente en la muestra control. Este último, se adjudica a la absorbancia del grupo hemo acomplejado con la proteína que difiere de la absorbancia de este grupo en su forma libre (pico ancho a 385 nm) y por lo tanto representa la banda de Soret.

Adicionalmente, este ensayo proporcionó otra prueba física de la interacción entre RibH2 y la hemina, permitiendo aislar dicho complejo.

Por ultimo se comenzaron a realizar estudios sobre la coordinación y la reactividad del núcleo metálico de la hemina unido a la proteína. Los ensayos preliminares (utilizando el complejo RibH2-hemina obtenido de la misma manera que se detalló anteriormente), mostraron que el hierro es capaz de ser reducido de su forma férrica a ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) con el agregado de pequeñas concentraciones de ditionito de sodio. Esta reducción, como muestra la Figura 61, es reflejada por un corrimiento de la banda de Soret (de 410 nm a 430 nm). En su forma reducida, el hierro reacciona con el oxígeno molecular,

**Figura 61.** Una muestra del complejo hemina-RibH2 (10  $\mu\text{M}$  monómero) (purificado por la columna G-25) se transfirió a una cubeta hermética y sellada de 3 ml y se degaseó. Posteriormente se colectó el espectro de absorción UV visible. La muestra fue reducida con el agregado de ditionito de sodio y se colectó el espectro de absorción. Por último se inyectó repetidas veces oxígeno y se colectó la señal espectroscópica de la muestra. La reacción de reducción y oxidación fue reversible.



produciéndose un corrimiento de la banda de Soret (de 430 a 420 nm) y una modificación en la absorbancia en la región comprendida entre las longitudes de onda de 500 y 600 nm (Figura 61, gráfico inferior). Este resultado sugiere que el hierro se encuentra penta-coordinado: 4 enlaces son aportados por el núcleo porfirínico y la posición proximal estaría ocupada por un residuo proteico. La sexta coordinación podría estar libre y dispuesta para interactuar con algún ligando exógeno (como peróxido, oxígeno molecular, óxido nítrico, etc.).

Hasta aquí se mostraron los primeros indicios los cuales sugieren que RibH2 de *B. abortus* es una proteína que contiene una hemina como grupo prostético y es capaz de unir flavina. Por lo tanto consideramos que RibH2 podría ser una flavohemoproteína. Sin embargo resulta preciso continuar con la caracterización bioquímica y estructural de dichas interacciones, ya que estos conocimientos nos orientarán en la investigación sobre el rol biológico de la proteína en cuestión. Los futuros experimentos que se llevarán a cabo, estarán focalizados en la identificación de él o de los residuos proteicos que interactúan con el hierro como así de los posibles ligando exógenos, es decir la coordinación y reactividad del hierro en el núcleo porfirínico. Para ello, será necesario realizar diferentes tipos de estudios espectroscópicos del complejo RibH2-hemina. Adicionalmente se intentarán obtener cristales del complejo RibH2-hemina y RibH2-hemina-flavina a fin de determinar, a partir de un análisis cristalográfico, el sitio o bolsillo hirofóbico donde se aloja la porfirina en la estructura de la proteína y su relación o distancia con la flavina.

Por otra parte, llegado a éste punto, resultaba necesario comenzar a indagar cual podría ser el rol biológico de RibH2 de *B. abortus* no solamente a partir de un enfoque bioquímico/estructural sino que también fisiológico. Para esto último, se estableció una colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Ugalde (UNSAM), en la que actualmente se están llevando a cabo diversos ensayos en *Brucella abortus* como así en *M. loti*.

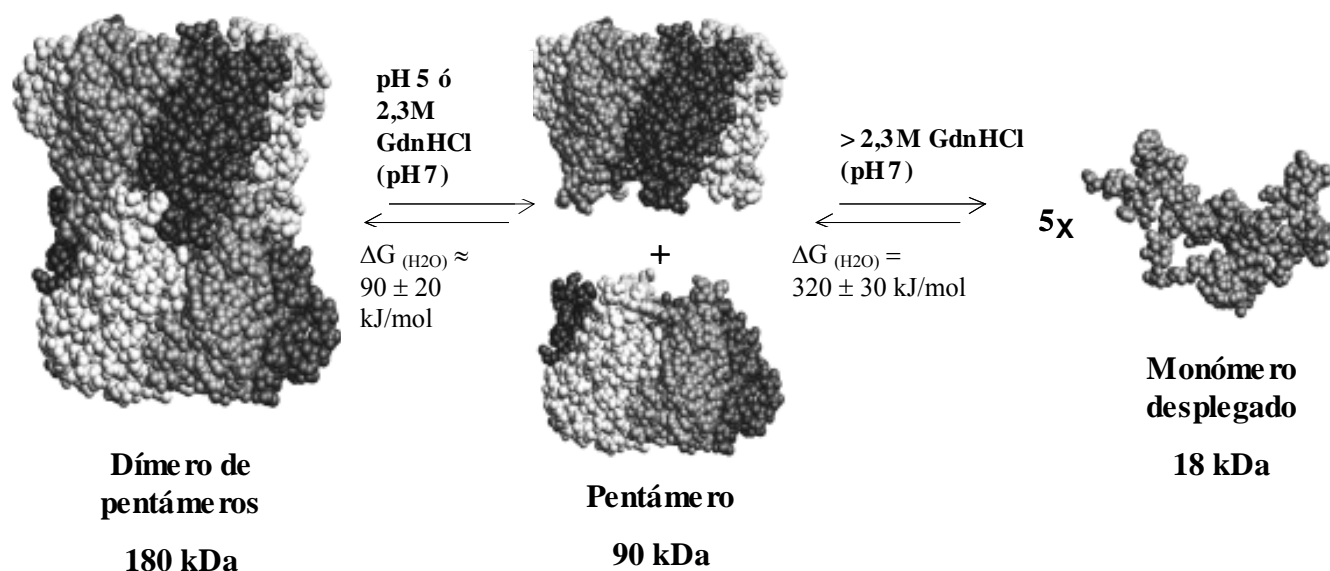
# Discusión general y conclusiones



A lo largo de la primera parte de mi tesis, he realizado una caracterización estructural de P18 (posteriormente denominada RibH2 de *B. abortus*) y de su estado de agregación. La motivación inicial por la cual decidimos comenzar con estos estudios fue comprender si la capacidad inmunogénica de la proteína estaba relacionada con su estabilidad y estructura polimérica. Además, nos interesaba comprender las diferencias estructurales y funcionales entre RibH2 de *B. abortus* y otras lumazinas sintetasas pertenecientes a diversos organismos. El conocimiento de la relación entre estructura y función biológica de una proteína es fundamentalmente importante tanto en aspectos teóricos como aplicados de la biología. Estos estudios proveen indicios sobre las bases moleculares de la estabilidad de la molécula así como de su función; conocimientos que pueden ser utilizados, por ejemplo, para el desarrollo de protocolos biotecnológicos en proteínas con propiedades aplicables específicas. Como primer resultado interesante, se descubrió que RibH2 de *B. abortus* presenta una estructura cuaternaria novedosa, diferente a las LS pentaméricas ó icosaédricas descritas hasta el momento. Según un análisis espectroscópico de la proteína (principalmente SLS/IR/UV) y de su estructura cristalina, RibH2 es una proteína globular cuyo estado cuaternario es decamérico, mejor descrito como un dímero de pentámeros. Este tipo de asociación de los pentámeros que componen a la partícula nativa nos llamó mucho la atención, ya que nunca antes había sido descrita para otra LS. Este resultado constituyó el puntapié inicial por el cual nos propusimos profundizar en el estudio estructural de RibH2 de *B. abortus*, y específicamente estudiar el mecanismo de desnaturalización de la proteína. Por otra parte resultaba necesario contar con dichos conocimientos para ser aplicados en el estudio de la relación entre estructura e inmunogenicidad de la proteína, así como en el desarrollo de una plataforma proteica capaz de ser utilizada como adyuvante de péptidos foráneos.

**Estructura cuaternaria y mecanismo integrado de desnaturalización de RibH2 de *B. abortus*.**

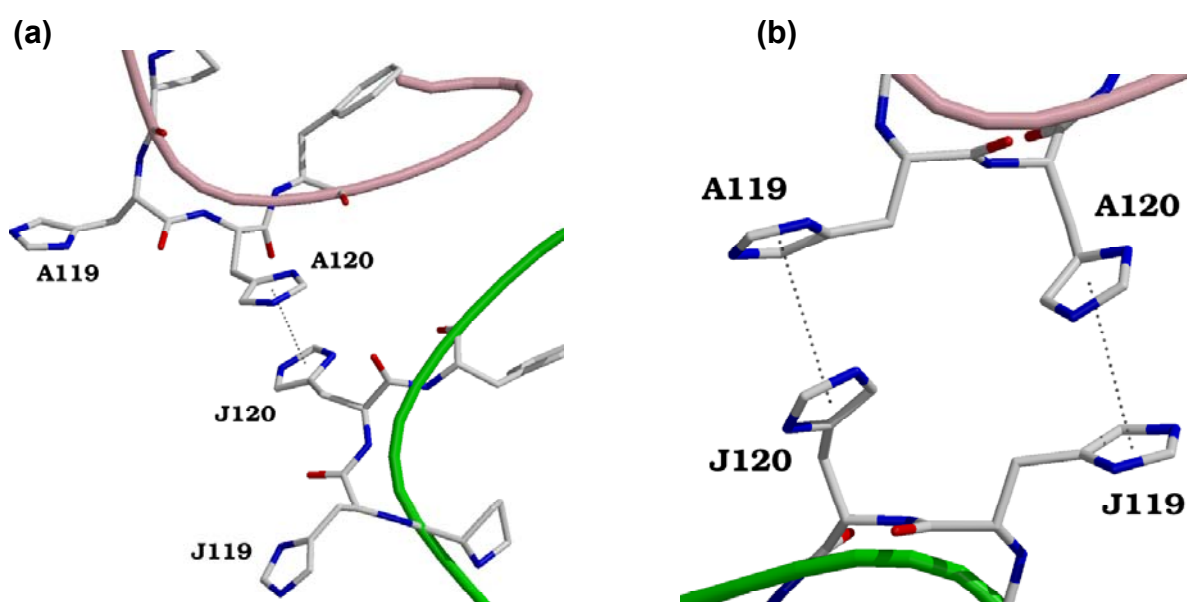
Los estudios realizados en solución mostraron que RibH2 de *B. abortus* es una proteína conformacionalmente estable, resistente a altas temperaturas y a la desnaturalización por urea. El análisis conjunto de las características termodinámicas de la proteína y de su estructura cristalográfica permitió postular un mecanismo integrado de desnaturalización para la misma (Figura 62). La estructura decamérica puede ser disociada en al menos dos diferentes condiciones, generando una partícula pentamérica plegada. Interesantemente, una de las condiciones disociantes es el pH ácido (levemente por debajo del pI de la proteína). El efecto del pH puede ser adjudicado a la alta densidad de histidinas presentes en la interfaz de contacto entre pentámeros (ver Figura 25).



**Figura 62. Mecanismo de disociación y desplegamiento de RibH2 de *B. abortus*. En la Figura se indican los parámetros termodinámicos determinados experimentalmente.**

Los residuos de histidina se protonan en condiciones de pH por debajo de 6, este fenómeno sería capaz de producir una repulsión de las cargas y pérdida de contactos que estabilizan al dácámero, resultando en la disociación del mismo. El efecto del pH en las histidinas de la interfaz y la propagación de dicho efecto en la estructura global de la proteína, también puede ser comprendido al comparar la estructura cristalográfica de RibH2 de *B. abortus* resuelta a pH 6,5

ó pH 4,8. En condiciones cristalográficas de pH por debajo del pI de la proteína, no ocurre la disociación de los pentámeros (debido a la alta concentración de proteína local), sin embargo se puede observar un reacomodamiento de las histidinas, producido por la repulsión de sus cargas en dicha condición (Figura 63). Contrariamente, el pH entre 6-5 no produce un alto efecto desestabilizante del pentámero, pudiéndose relacionar este hecho con la gran superficie de contacto existente entre monómeros de un mismo pentámero (35% del ASA total de cada monómero) que es principalmente hidrofóbica y en la cual no participan enlaces aportados por residuos protonables. Cada monómero aporta 245 contactos de tipo van der Waals durante la formación de un pentámero, haciendo un total de más de 1200 contactos de este tipo por pentámero. El alto valor de  $\Delta G$  asociado a la estabilidad del pentámero, es probablemente



**Figura 63. Comparación de la posición de las His de la interfaz de contacto entre pentámeros en diferentes pH.** (a) Estructura cristalográfica de RibH2 obtenida en condiciones de cristalización de pH 4,8 (pdb: 1DI0). (b) Estructura cristalográfica de RibH2 obtenida en condiciones de cristalización de pH 6,3 ó 6,5 (pdb: 1T13 ó 1XN1). En rosa se muestra el monómero A y en verde el monómero J.

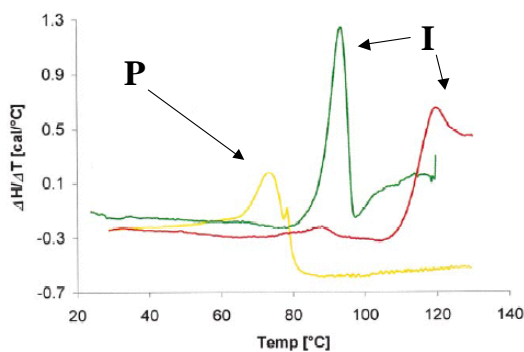
consecuencia de la estrecha (entrelazada) interacción entre monómeros y de la naturaleza hidrofóbica de esta superficie de contacto, resistente al efecto del pH.

Las interacciones cuaternarias tienen un rol dominante en la estabilización de proteínas oligoméricas (Boudker 1997). El mecanismo de desplegamiento

puede variar notablemente entre proteínas oligoméricas. La disociación de las subunidades que la conforman puede ocurrir antes ó después del desplegamiento de la cadena polipeptídica, o bien estas dos reacciones pueden ocurrir en simultáneo en ausencia de un intermediario en equilibrio (Guidry 2000). Se han reportado en la bibliografía diferentes casos de equilibrio de disociación entre una proteína plegada y sus monómeros seguidos del desplegamiento de los mismos, así como casos de disociación de subunidades acoplada al desplegamiento de las mismas (Pace 1986; Mok 1996; Dams 1999; Reddy 1999). El desplegamiento de RibH2 de *B. abortus* contiene elementos de ambos tipos de mecanismos. La disociación del dímero de pentámeros y el aislamiento de un intermediario pentamérico que conserva su estructura puede ser consecuencia de una adaptación estructural durante la divergencia evolutiva de dicha proteína. También es posible suponer que la disociación esté relacionada con la función ó regulación catalítica. En este sentido, la hélice continua  $\alpha 4\alpha 5$  de RibH2 de *B. abortus* (Figuras 24 y 25) genera una superficie complementaria entre pentámeros estabilizada por interacciones hidrofóbicas, en la cual hay una marcada presencia de residuos de histidinas y fenilalaninas (Figura 25). En cambio, el pentámero de RibH2 presenta una estructura entrelazada en la cual cada monómero interactúa extensivamente con el monómero adyacente vía múltiples interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y puentes salinos. Como consecuencia, la disociación del intermediario pentamérico y el desplegamiento de los monómeros ocurre de manera concertada. Las metodologías empleadas en este trabajo indicaron un equilibrio de dos estados para esta transición, es decir no identificaron ningún intermediario termodinámicamente estable. Si consideramos que en todas las LS el sitio activo se forma a partir de la interacción de dos monómeros (de un mismo pentámero), no existiría una razón estructural que justifique la existencia de un monómero plegado.

***Estabilidad térmica de RibH2 de B. abortus: relación con el grado de polimerización.***

La  $T_m$  de RibH2 es elevada ( $88 \pm 1$  °C). Sin embargo, si la comparamos con las  $T_m$  reportadas para otras proteínas relacionadas se puede notar que RibH2 presenta un comportamiento intermedio entre proteínas pentaméricas e icosaédricas (Figura 64) (Zhang 2001). Las proteínas RibH1 pentaméricas aisladas de *B. abortus* y de *S. cerevisiae* presentan una  $T_m$  reversible, de 74



**Figura 64.** DSC (calorimetría diferencial de barrido) de diferentes LS (se indica el orden polimérico). Adaptado de (Zhang 2001).

	T <sub>m</sub> (°C)	Orden
<i>S. cerevisiae</i>	74,1	P
<b><i>B. abortus RibH1</i></b>	<b>63</b>	<b>P</b>
<b><i>B. abortus RibH2</i></b>	<b>88</b>	<b>D</b>
<i>A. aeolicus</i>	119,9	I
<i>B. subtilis</i>	93,3	I

**Tabla 13.** T<sub>m</sub> de LS provenientes de diferentes organismos. Adaptado de (Zhang 2001).

y 60 °C respectivamente, mientras que la T<sub>m</sub> de una proteína RibH1 de tipo icosaédrica es de 93 ó 120 °C dependiendo si el organismo del cual fue aislada es mesófilo (*B. subtilis*) ó termófilo (*A. Aeolicus*). Zhang *et al.* (Zhang 2001) postuló que la estabilidad térmica de la proteína aislada de *A. Aeolicus* está relacionada con la naturaleza de la interfaz de contacto monómero-monómero, predominantemente hidrofóbica. A su vez en esta familia de proteínas se observa una clara relación entre la estabilidad térmica y el orden de polimerización de las mismas (Tabla 13). En este sentido, nuestros resultados muestran la importancia de ambos tipos de interacciones. Por ejemplo, los experimentos en los que RibH2 fue previamente disociada (Figuras 22b) revelaron que la molécula en dicha condición presentaba una transición térmica de 70 °C, cercana al valor obtenido para las RibH1 pentaméricas (Tabla 13). Con respecto a las interacciones que estabilizan al pentámero, fue importante el análisis de las T<sub>m</sub> de las mutantes puntuales de RibH2. Algunas mutantes puntuales de RibH2 diseñadas con la intención de modificar la estabilidad conformacional del pentámero sin afectar la formación de la estructura decamérica (aunque esto último quedó sin ser comprobado) revelaron la influencia de ciertas interacciones en la estabilidad conformacional global de la proteína. Tal es el caso de las mutantes L105A y M101A, las cuales mostraron T<sub>m</sub> cercanas a los 70 °C, a pesar de ser proteínas decámicas (Figura 33). En el caso de la mutante de triptofano (W22A-F130W) se logró aumentar la estabilidad conformacional de la proteína, incrementando el número y probablemente la calidad de los contactos que participan en la estabilización de ambas interfaces (Figura 40). Resumiendo, tanto las características de los contactos responsables de la estabilización del pentámero como la formación de una estructura de mayor grado de polimerización (asociación pentámero-pentámero) juegan un rol importante en la estabilidad conformacional de la molécula. Es por ello, que los resultados presentados en este trabajo permiten postular a RibH2 de *B. abortus* como un buen modelo para el estudio de los mecanismos de desplegamiento y estabilización termodinámica de una proteína oligomérica.

***Estabilidad conformacional de RibH2 de B. abortus y su aplicabilidad como sistema de presentación de péptidos ó carrier de inmunógenos.***

Las proteínas han evolucionado adaptándose al cumplimiento de una determinada función fisiológica. En este proceso las propiedades estructurales de una proteína han evolucionado principalmente a favor del incremento de su funcionalidad, lo cual no viene acompañado necesariamente con un aumento de su estabilidad (Buchner 2005). La estabilidad es una de las muchas restricciones evolutivas para una proteína. Las proteínas deben ser capaces de plegarse en un tiempo razonable y ser lo suficientemente estables para poder ejercer su función biológica durante un periodo de tiempo adecuado. No existen otras presiones selectivas que justifiquen una proteína “mejor ó más estable” de lo fisiológicamente necesario (Zavodszky 1998; Taverna 2002; Buchner 2005). De hecho la mayoría de las proteínas son marginalmente estables (en orden de 52 kJ/mol) (Jaenicke 2000). Sigue siendo materia de discusión si la estabilidad marginal de las proteínas es una característica que ha sido seleccionada durante la evolución de las mismas (por ejemplo, para permitir la degradación o aumentar la funcionalidad de ellas), ó si por lo contrario es sólo un efecto lateral de la falta de presión de selección para una alta estabilidad. En cambio, algunas condiciones experimentales (la utilización de una proteína en una formulación a altas concentraciones, su actividad prolongada a 37 °C, su expresión a larga escala, cristalización y almacenamiento entre tantas otras), pueden demandar una mayor estabilidad conformacional de la proteína que la que se encuentra en su ambiente natural. La remarcada estabilidad conformacional de RibH2 combinada con su alta inmunogenicidad (comprobada en modelos de inmunización murina, y en pacientes y animales infectados) ha provocado interés en su utilización como vehículo de péptidos foráneos en el desarrollo de una vacuna (Laplagne 2004; Sciutto 2005; Rosas 2006). Algunas características de RibH2 de *B. abortus* se asemejan a las de la subunidad B de la enterotoxina de *E. coli* (EtxB) y a la toxina colérica (CtxB). Ambas toxinas se ensamblan *in vivo* en complejos homopentaméricos altamente estables, los cuales mantienen su estructura cuaternaria en una variedad de condiciones que normalmente causan la desnaturalización proteica (Ruddock 1996a). Esta remarcada estabilidad conformacional, así como la inmunogenicidad inherente de los pentámeros EtxB y CtxB, ha promovido el uso de las mismas como carriers para el desarrollo de vacunas acelulares (Ruddock 1996a; Arakawa 1998; Fraser 2003). Notablemente, RibH2 de *B. abortus* es más resistente a la

desnaturalización térmica que las toxinas EtxB y CtxB ( $T_m$  de 84 y 75 °C, respectivamente) (Bhakuni 1991; Ruddock 1996b).

En este trabajo de tesis se mostró una metodología para la obtención de proteínas quiméricas de RibH2 de *B. abortus*, las cuales representan sistemas multivalentes de presentación de péptidos foráneos de interés (Figura 28) (Laplagne 2004). Recientemente, ha comenzado a ser estudiado un sistema de vacunación oral similar contra la cisticercosis, encontrándose apto para tal propósito (Rosas 2006). Esto significa que la proteína carrier (RibH2 de *B. abortus*) resistió su degradación durante la absorción en el tracto digestivo y mantuvo su capacidad de presentación al sistema inmunológico de los péptidos foráneos responsables de la protección contra la cisticercosis. Este resultado se relaciona íntimamente con la estabilidad conformacional de RibH2, evidenciada también por su alta resistencia a la degradación por la tripsina (enzima digestiva) (Figura 35). Por otra parte, se identificó a una variante de RibH2 (W22A-F130W) que presentó mayor estabilidad conformacional que la proteína salvaje, característica útil en cuanto a la aplicabilidad de la misma. En el futuro se medirá la capacidad inmunogénica y adyuvante de esta variante, a fin de ser utilizada como plataforma proteica para el desarrollo de vacunas acelulares.

### ***Evolución de la familia de proteínas de LS.***

El análisis genómico de *B. abortus* realizado en este trabajo, reveló dos ORFs relacionados (*ribH1* y *ribH2*), ubicados en diferentes cromosomas y que codifican para dos proteínas designadas como RibH1 y RibH2 de *B. abortus* (ó LS tipo I y II, respectivamente). La similitud de secuencia entre éstas es relativamente baja, pero se encuentra dentro de los niveles de similitud encontrados entre las proteínas pertenecientes a la familia de LS. Por ello asumimos que la separación evolutiva de los genes *ribH1* y *ribH2* ó la adquisición de uno de estos genes por transferencia lateral, ocurrió con anterioridad a la especiación de las  $\alpha$ -proteobacterias. La Tabla 14 resume las características genómicas, estructurales y bioquímicas de las proteínas RibH de *B. abortus*.

Dentro de la familia de LS, un estudio reciente mostró la existencia de proteínas pentaméricas con actividad de riboflavina sintetasas (RS, enzima siguiente en la vía metabólica de la riboflavina) (Fischer 2004; Ramsperger 2006), pero estructuralmente relacionadas con las LS. Estas enzimas fueron encontradas únicamente en Arqueas, las cuales no poseen la enzima RS

Nombre previo	Nombre del gen/proteína	Cromosoma en el que se ubica el gen	Orden cuaternario	Actividad LS
-	<i>ribH1/RibH1</i>	I	Pentamérica	+
P18	<i>ribH2/RibH2</i>	II	Decamérica	Residual

**Tabla 14. Resumen de las características principales de las proteínas RibH de *B. abortus*.**

característica de las eubacterias, plantas u hongos (RS trimérica con una estructura totalmente diferente a la estructura de las LS).

El sitio activo de las RS de Arquea presenta similitudes con el de las LS, exceptuando que en vez de los sustratos de una LS, la RS pentamérica une dos moléculas de 6,7-dimethyl-8-ribitillumazina. Una de ellas se une en el “sitio A” (descrito en el capítulo II) de manera semejante a la unión de RPD en las LS (Figura 52). Lo más notable es que este tipo de enzimas son evolutivamente ancestrales y no presentan actividad de LS (Fischer 2004; Fischer 2005; Ramsperger 2006). Los genomas de Arquea secuenciados hasta la fecha, mostraron dos genes con similitud de secuencia, uno de ellos codifica para una LS clásica y el otro para una RS pentamérica. La situación presentada en Arquea es comparable a la encontrada en algunas eubacterias, con las LS tipo I y II. Sin embargo las LS tipo II mostraron una función diferente. Es decir, no presentan actividad de RS y sólo conservaron una actividad residual de LS. El estudio filogenético de esta familia de proteínas permitió postular la existencia de una proteína ancestral que originó diferentes funciones catalíticas, una de ellas aún no descrita (LS tipo II). Las proteínas pertenecientes a esta familia mantuvieron conservado una topología de plegamiento similar: En todos los casos el menor grado de polimerización es el de un pentámero, los cuales pueden asociarse (ó no) conformando las proteínas decaméricas ó icosahédricas. La manera más simple de explicar la divergencia estructural sería pensar que la proteína ancestral presentaba una estructura pentamérica (tal vez similar a la RS de Arquea), la cual a partir de modificaciones restringidas a ciertas partes de la molécula originó el resto de las estructuras conocidas.

En el caso de las proteínas decaméricas (LS tipo II), la formación de esta estructura cuaternaria originó una incompatibilidad con su función catalítica de LS. Sin embargo esta modificación otorgó una ventaja adaptativa a los organismos que la contienen, relacionada con la función adquirida que aún resta descubrir.



**Actividad LS en *B. abortus*.**

Las enzimas LS tipo I, caracterizadas funcionalmente en diversos trabajos (Kis 1995b; Jordan 1999; Fischer 2002; Paulsen 2002) mostraron una actividad catalítica moderada, en el orden de los 200 a 300 nmol/mg\*min (ensayos realizados a temperaturas de crecimiento óptimo). En comparación con estos datos, la actividad enzimática de la LS tipo I de *B. abortus* fue un orden menor (Tabla 10). La baja actividad catalítica general de estas enzimas no resulta de una reacción cuya barrera de energía libre de activación sea alta. Es más, la condensación de But-F con RPD se caracteriza por ser una reacción de tan baja barrera de energía de activación que puede proceder a una velocidad apreciable, aún a temperatura ambiente, en solución acuosa y pH neutro, y sin intervención enzimática (Kis 2001). La baja actividad de las LS es una característica compartida con otras enzimas involucradas en la biosíntesis de la riboflavina. Todos los valores de actividades reportados para las enzimas de esta vía metabólica en *E. coli*, *B. subtilis* y levaduras, se encuentran en el rango de nanomoles sobre miligramo por minuto (Harvey 1966; Richter 1992; Eberhardt 1996; Scheuring 1996; Eberhardt 1997; Liao 2000; Fischer 2002; Graupner 2002; Kaiser 2002; Fischer 2003; Echt 2004). Por lo tanto, al menos en el caso de las RS y LS, la barrera de energía libre de activación inherente a las reacciones catalíticas no sería una razón para las bajas velocidades enzimáticas reportadas. De hecho, está postulado que esta vía metabólica existía antes de la vida biótica (período denominado “RNA-World”), previo a la aparición de las proteínas, cuando el metabolismo estaba guiado enteramente por RNA (Benner 1989; Joyce 2002). El hipotético “RNA World” probablemente requería de procesos redox, y las flavinas (junto con sus derivados) son candidatos excelentes para llevar a cabo este tipo de procesos (Fischer 2004). De hecho ciertos genes de la biosíntesis de riboflavina, presentes en algunas eubacterias, son regulados por una secuencia particular de RNA, ó riboswitch que responde a FMN (como en el caso del gen *ribH2* de *B. abortus*), pudiéndose tomar esto como un rastro actual del período del RNA catalítico. Por lo tanto debemos asumir, a falta de otros argumentos, que la presión de selección que controló esta vía metabólica favoreció la evolución de la catálisis con baja velocidades de reacción. Por otra parte la riboflavina es requerida por los organismos en pequeñas cantidades, ya que un exceso de la misma produciría una depleción

innecesaria de sus precursores y un efecto negativo en la supervivencia de la bacteria.

De todos modos, aún queda por entender por qué la actividad catalítica de la LS tipo I de *B. abortus* es menor a la reportada para otras enzimas de la misma clase.

### ***LS tipo II de B. abortus, su posible rol biológico.***

A lo largo de este trabajo se mostraron las razones tanto enzimáticas, estructurales como evolutivas por las cuales consideramos que las proteínas LS tipo II sólo conservaron una actividad LS residual. Estas proteínas tendrían una función asociada que explicaría su selección positiva en el discurrir evolutivo. En particular, nos interesaba comenzar a indagar cuál es la función de RibH2 de *B. abortus*. Contábamos con el dato que esta proteína constituía un antígeno inmunodominante durante la infección bacteriana (Goldbaum 1993; Goldbaum 1999), es decir, que su expresión *in vivo* (demostrada también en cultivo, Figura 46) mostraba que no se trataba del producto de un pseudogen. Es por ello que comenzamos a indagar desde diferentes puntos de vista cuál podría ser su rol biológico. Se estableció una colaboración con el grupo del Dr. Ugalde (UNSAM), para investigar la importancia de esta proteína en la fisiología de la bacteria. Actualmente, se están llevando a cabo ensayos de infección *ex vivo* e *in vivo* (es decir en macrófagos y en ratones) utilizando una cepa de *B. abortus* mutante de delección para el gen *ribH2* (denominada *ribH2::Gm*). A su vez se están desarrollando ensayos de “gen reportero” para dilucidar el momento en el cual se expresa la proteína RibH2 así como posibles reguladores traduccionales y/o transcripcionales. Los primeros estudios realizados mostraron un dato revelador. En estos ensayos se inyectaron  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa salvaje (S2308) ó mutante (*ribH2::Gm*) intraperitonealmente en ratones Balb/c. A los 10 ó 40 días post-infección se recuperaron del bazo las bacterias persistentes. Llamativamente, la cepa mutante presentó una marcada disminución en su infectividad (se recuperaron 4 ordenes de magnitud menos UFC que de la cepa salvaje). Sumado a este resultado, en los ensayos de infección *ex vivo* (utilizando macrófagos J774. A1) se vio que la cepa mutante (*ribH2::Gm*) presentaba menor capacidad infectiva a tiempos cortos de infección (durante las primeras 4 h) (I. Marchesini, resultados no publicados). En cambio, una cepa mutante de delección complementada con el mismo gen (*ribH2::Gm+pBBR4ribH2*) mostró mayor infectividad que la cepa salvaje. Estos

resultados indican que RibH2 puede ser considerada como un factor de virulencia de *Brucella ssp.* involucrado probablemente durante la fase temprana de infección, cuando el macrófago comienza a producir un fuerte stress oxidativo. De hecho se vió en pruebas de crecimiento de *Brucella ssp.* en medio de cultivo, que la cepa de delección es sumamente sensible al agregado de peróxido de hidrógeno, mientras que la cepa complementada (ribH2::Gm+ pBBR4ribH2) es resistente a elevadas concentraciones de dicho compuesto (I. Marchesini, resultados no publicados). Este resultado apoya la hipótesis de un rol de RibH2 durante la primera etapa infectiva, etapa en la cual la bacteria requiere de la activación de numerosos sistemas de defensa contra el huésped (Roop 2004).

RibH2 de *B. abortus* no es el único caso en el cual una proteína de la vía metabólica de las flavinas esta relacionada con otra función enzimática esencial para la supervivencia de un patógeno. *H. pylori*, un patógeno de humanos, posee la enzima RibBA, cuya función es la de reducción del hierro férrico. Por lo general, al colonizar o invadir una célula de mamíferos, las bacterias patogénicas encuentran un ambiente deficiente en hierro (Worst 1998). La reducción del hierro férrico a ferroso es esencial para la supervivencia de la bacteria, dado que ésta última es la forma más soluble del hierro. La enzima RibBA en *E. coli*, como así en otros organismos, está involucrada en la síntesis de riboflavina (Figura 3). Está reportado (Fontecave 1994; Pierre 2002) que en algunos organismos la riboflavina puede ser utilizada como un sistema de reducción del hierro férrico. Esta función fue descripta como uno de los tantos mecanismos que tienen los patógenos para introducir hierro (Olczak 2005). En el caso de *H. pylori*, la transcripción del gen *ribBA* es regulada a su vez por el hierro (a través del “fur-box”). Los autores postularon que, bajo condiciones pobres de hierro, el sistema de reducción de hierro de *H. pylori* se activa, lo cual implica un incremento en la demanda de riboflavina. Dado que el paso limitante de esta reacción está catalizado por el producto de gen *ribBA* (enzima bifuncional), un aumento en su expresión resultará en un aumento de la riboflavina, lo cual finalmente aumentará la disponibilidad de hierro (Worst 1998). Éste es un claro ejemplo de interconexión entre el metabolismo del hierro y la flavinogénesis.

Durante la última parte de esta Tesis se mostraron los primeros experimentos por los cuales se puede considerar a RibH2 de *B. abortus* como una

flavoheproteína. Si analizamos en general que tipo de proteínas son capaces de unir en simultáneo hemo y flavinas, nos encontramos con una clase interesante de proteínas: las flavohemoglobinas y hemoglobinas truncadas. Éstas están involucradas en diversas funciones (Wittenberg 2002; Frey 2003; Fabozzi 2006), aunque generalmente se las asocia en la defensa contra el stress nitrosativo, ya que algunas son capaces de oxidar el NO a nitrato (Ouellet 2002). Es conocido que *Brucella spp.* es capaz de contrarrestar el daño oxidativo producido por el macrófago (Wang 2001). Incluso, es capaz de respirar nitratos (Haine 2006; Loisel-Meyer 2006). Sin embargo, en la literatura no está descrita ninguna proteína de *Brucella spp.* capaz de llevar a cabo dicha función biológica. Una búsqueda en la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoms) en la que se analizaron todos los ORF de *B. abortus*, reveló la inexistencia de una anotación correspondiente a dicha función. Otras flavohemoproteínas caracterizadas, son enzimas con centros multi-redox, involucradas en el transporte de electrones. Entre ellas se encuentra la flavocitocromo b2 (Xia 1990) ó P450 BM3 (Daff 1997) (Roberts 2003). Llamativamente, en el genoma de *Brucella abortus*, tampoco se encontró una secuencia genómica a cuyo producto se le haya adjudicado dicha función. Por otra parte, si consideramos que la unión de RibH2 a la riboflavina es una característica que no estaría involucrada con su función biológica (podría ser una propiedad “residual” compartida con el resto de las proteínas que conforman a la familia de LS), entonces podríamos pensar que RibH2 de *B. abortus* es una hemoproteína. Existen diferentes tipos de hemoproteínas en bacterias que cumplen funciones relacionadas con: transporte de hemo, transporte de electrones (citocromos), catálisis de reacciones redox (catalasas, peroxidasa, NO reductasas) y proteínas sensoras de oxígeno (Beyer 1988; Perutz 1999; Ozaki 2001; Olczak 2005). Es probable que la función de RibH2 de *B. abortus* sea alguna de todas las nombradas, aunque no se pueda inferir cual de todas es sólo a partir de su homología en la secuencia primaria con proteínas conocidas. Entonces RibH2 podría considerarse como una proteína que adoptó una función necesaria en *Brucella spp.* con un plegamiento atípico para dicha actividad. El hecho de que esta proteína sea un factor de virulencia convierte a esta hipótesis en una aún más interesante. Futuros trabajos multidisciplinarios validarán dicha presunción.

- ❖ Mediante el análisis espectroscópico y cristalográfico, se determinó que RibH2 de *B. abortus* es una proteína cuyo estado nativo puede ser descrito como dímero de pentámeros.
- ❖ El mecanismo de desplegamiento de dicha proteína (inducido por cloruro de guanidinio) involucra a un intermediario pentamérico estable, caracterizado por presentar un plegamiento comparable al existente cuando éste forma parte de la partícula decamérica.
- ❖ La partícula decamérica está estabilizada por múltiples contactos principalmente hidrofóbicos, y por una interfaz de contacto monómero-monómero entrelazada. Estas características, junto con su importante grado de polimerización, explican la elevada estabilidad conformacional de la molécula. Existe una corona de histidinas ubicadas en la interfaz de contacto pentámero-pentámero que estabilizan a la partícula decamérica, y juegan un rol dominante en la disociación del decámero inducida por el pH.
- ❖ Acorde al análisis estructural, se lograron diseñar diferentes mutantes puntuales de RibH2. Al comparar la estabilidad conformacional de cada una de ellas, se identificó una región en la proteína capaz de ser considerada como “Hot Spot” para la estabilización de la misma, ubicada en la interfaz de contacto monómero-monómero. La remoción de algunos residuos presentes en dicha región genera un efecto desestabilizante importante, ya que se forma un volumen continuo carente de enlaces estabilizantes.
- ❖ El reemplazo de la fenilalanina natural por un triptofano en la posición 130 de la secuencia polipeptídica de RibH2, permitió obtener una proteína capaz de ser utilizada en estudios fluorimétricos para el monitoreo del estado cuaternario de la molécula durante su desplegamiento. A su vez, dicha modificación aumentó la estabilidad conformacional general de la proteína.
- ❖ Se desarrolló la base para evaluar la relación entre la estabilidad conformacional de RibH2 y su capacidad de inducir una fuerte respuesta humoral. A tal fin, se usarán las mutantes de estabilidad conformacional reducida y aumentada. Se evaluará además la capacidad adyuvante de estas proteínas.
- ❖ Se demostró la factibilidad de utilizar a RibH2 en el desarrollo de quimeras mixtas, capaces de presentar al sistema inmunológico diversos péptidos de manera simultánea. Estos estudios se basaron

en el mecanismo de desplegamiento propuesto para RibH2 y representan, a su vez una reconfirmación del mismo. Estos sistemas serán de gran utilidad, por ejemplo cuando se utilicen epítopes T ó péptidos troyanos.

- ❖ *B. abortus* posee dos ORFs diferentes para proteínas con similitud de secuencia primaria a las LS. Cada uno de los genes se encuentra en un contexto genómico diferente, siendo el gen *ribH1* el que forma parte del operón rib.
- ❖ A partir de un estudio filogenético, se determinó que las proteínas que conforman la familia de LS divergieron evolutivamente en al menos cuatro funciones diferentes (las cuales se originaron a partir de un plegamiento polipeptídico común). A las proteínas que conforman cada una de las ramas divergentes del árbol filogenético, se las denominó según su función biológica conocida o hipotética.
- ❖ Se logró clonar a *ribH1* de *B. abortus* y se determinó que es una proteína pentamérica con actividad enzimática de LS (LS tipo I). No se encontraron razones estructurales que justifiquen su baja actividad catalítica.
- ❖ RibH2 de *B. abortus* presenta sólo actividad catalítica residual. La baja actividad enzimática de LS se relaciona íntimamente con su estructura cuaternaria. Siendo una, causa ó consecuencia de la otra.
- ❖ Las proteínas RibH1 y 2 de *M. loti* (clonadas en el presente trabajo) presentaron las características estructurales y enzimáticas esperables según el análisis filogenético realizado. Es decir RibH1 es una proteína pentamérica con actividad de LS, mientras que RibH2 sólo presenta actividad residual y una estructura cuaternaria compartida con la proteína RibH2 de *B. abortus*.
- ❖ Se piensa que la posible función biológica de RibH2 de *B. abortus* estaría dada por su capacidad de unir simultáneamente riboflavina y hemina.
- ❖ El conocimiento adquirido a partir del trabajo presentado en esta Tesis, servirá de base y puntapié inicial en variados estudios fisiológicos, bioquímicos o de ciencia aplicada en los que la proteína RibH2 de *B. abortus* jugará un rol protagónico. Varios de estos aspectos fueron ampliados a lo largo del presente trabajo. Sin embargo quiero recalcar la importancia y lo provechoso que resulta

estudiar en forma asociada aspectos estructurales, enzimáticos y evolutivos de una proteína proveniente de un organismo patogénico.

# Materiales y métodos



**1.A.1. Expresión recombinante de P18 (RibH2 de B. abortus).**

Se transformaron bacterias competentes *E. Coli* BL21 (DE3) de (Stratagene, La Jolla, CA) con el vector pT11a-P18, (Figura 1) (Novagen) (Goldbaum 1999) el cual contenía el gen que codifica para la proteína P18 (ó RibH2), previamente clonado por el Dr. F. Godbaum (Goldbaum 1999) a partir del genoma de *Brucella abortus*. El mismo vector porta el gen cuya expresión confiere resistencia al antibiótico Ampicilina, lo cual permitió seleccionar a las bacterias transformadas en una placa de LB-Ampicilina (100 µg/ml). Se tomó una única colonia de aquella placa y se inocularon 5 ml de LB Ampicilina (100 µg/ml), permitiendo que el cultivo llegue a saturación (ON). Con este cultivo se inocularon 500 ml de LB Ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C con agitación (300 rpm) hasta alcanzar una  $DO_{600\text{ nm}} = 1$ . En dicho estado se procedió a inducir a las bacterias agregando 1 mM de IPTG, a 37 °C, durante 4 ó 12 h con agitación. La inducción corta (4 h) favorece la solubilización de la proteína y su acumulación en el citoplasma bacteriano, mientras que inducciones largas (12 h) aumentan la acumulación de la misma en los cuerpos de inclusión de la bacteria. Por último se centrifugó al cultivo y se congeló a 20 °C las bacterias hasta su utilización.

**1.A.2. Purificación de P18 (RibH2 de B. abortus) recombinante**

El pelett bacteriano se resuspendió en 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 1% Tritón, pH 8,0 y se sonicó durante 5 minutos (con pulsos de 20 seg y pausas de 40 seg), luego se centrifugo la muestra a una velocidad de 15,000 x g durante 15 min. El precipitado de dicha sonicación corresponde a los cuerpos de inclusión (CI) mientras que la fracción soluble (S) al citoplasma bacteriano. Los CI se solubilizaron en 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 8 M urea pH 8,0 durante una noche a temperatura ambiente con agitación constante. El material solubilizado se replegó por diálisis contra PBS, 1 mM DTT, durante 72 h, realizándose al menos cuatro cambios de buffer. Si por el contrario se optó por un protocolo de purificación a partir del citoplasma bacteriano (inducción corta), se sometió a la fracción S a una diálisis durante 48 h contra PBS, 1 mM DTT. En cualquiera de los dos casos, una vez completada la diálisis se realizó una centrifugación a 15,000 x g durante 10 min, descartándose el precipitado. La fracción citoplasmática ó la proveniente del replegamiento de los cuerpos de inclusión fue sometida a dos pasos de purificación: un intercambio iónico con una columna de Q-sepharosa de 30 ml de lecho (Amersham Pharmacia), acoplada a un equipo de FPLC. Se utilizó como buffer de equilibrio de las

muestras y de siembra 50 mM Tris, pH 8,5, 1 mM DTT (buffer A). La elución de las muestras se logró implementando un gradiente lineal de 0 a 1M de NaCl en 30 ml formulado en el buffer 50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8,5, 1 mM DTT (buffer B). El eluido enriquecido con la proteína de interés fue seguidamente purificado utilizando como tamiz molecular una columna Superdex-200 (S-200, Amersham Biosciences) equilibrada en buffer PBS, pH 7,0; 1 mM DTT. El grado de pureza de la preparación fue determinado en un PAGE-SDS 15% poliacrilamida teñido con Comassie-Blue. La proteína purificada fue concentrada y cuantificada mediante la medición de su absorbancia a 280 nm. En esta determinación se tuvo en cuenta el valor de coeficiente de extinción molar teórico de P18, calculado por monómero es de  $9970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La concentración de P18 fue validada, midiendo su concentración por el método de Bradford. Parte de la proteína purificada fue iodoacetilada, para ello se la incubó con 25 mM de iodoacetamida (IAA) durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad, se eliminó el excedente de reactivo a través de una diálisis contra PBS durante 24 h. Finalmente, la preparación se fraccionó, congeló con  $\text{N}_2$  líquido y almacenó en freezer a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización. A la muestra proteica sin tratar con IAA, se le adicionó 1 mM DTT previo a su congelamiento.

#### **1.A.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Los geles de poliacrilamida y las corridas electroforéticas se realizaron según el método de Laemmli (Laemmli 1970). Los marcadores de peso molecular fueron provistos por Sigma.

#### **1.A.4. Determinación del peso molecular de las proteínas por Static Light Scattering/índice de refracción/UV (SLS/IR/UV).**

El peso molecular promedio ( $M_r$ ) de todas las proteínas estudiadas en ésta tesis y en las diferentes condiciones de buffer, fue determinado utilizando un sistema de cromatografía de alta resolución (HPLC) conectado en serie a un detector de Light scattering a  $90^\circ$  (Precision Detectors PD2010), a un refractómetro diferencial (IR) (LKB 2142) y a una lámpara UV. En términos generales, se inyectó en una columna de cromatografía de exclusión molecular (SEC), por ejemplo Superdex 200 HR-10/30 (24 ml) o Sephadex G-25 (1 ml) (Amersham Biosciences), de 20 a 500  $\mu\text{l}$  de proteína de concentración entre 0,3 a 1 mg/ml, equilibrada previamente en el buffer de elución durante 2 h. Los buffers utilizados fueron 50 mM fosfato, 1 mM DTT, pH 7,0 conteniendo o no diferentes concentraciones de urea, cloruro de guanidinio y NaCl según correspondió en cada caso. En el caso de la determinación del  $M_r$  en función del pH de incubación, se utilizaron las

siguientes composiciones de buffers: 50 mM citrato, 1 mM DTT, pH 6,0-2,5 ó 50 mM fosfato, 1 mM DTT, pH 7,5-7,0. En todos los casos la columna fue equilibrada en el mismo buffer de la muestra. Las señales de scattering a 90°, IR y UV fueron colectadas en una PC y analizadas mediante el software Discovery32, acreditado por Precision Detectors. El detector de Light scattering a 90° fue equilibrado en cada determinación, empleando como estándar de peso molecular a la albúmina bovina (BSA), de Mr = 66,5 kDa, previamente incubada en las mismas condiciones del buffer que el utilizado para cada ensayo en particular.

#### **1.A.5. Dicroísmo Circular**

Todos las mediciones de DC se realizaron en un espectropolarímetro (JASCO J-810) implementando cubetas de cuarzo de 0,1-0,5 cm de ancho. El desplegamiento de las proteínas se monitoreó midiendo la señal de las mismas en DC UV-lejano (260 nm a 200 nm) en función del agregado de concentraciones crecientes de diferentes agentes desnaturizantes (cloruro de guanidinio o urea). Se trabajó con concentraciones de proteína entre 0,25 y 25 µM de subunidades monoméricas incubadas durante 2 h a temperatura ambiente en los diferentes buffers, de acuerdo a lo indicado en cada caso. En los experimentos de DC en función del pH, se incubó a las muestras proteicas en los mismos buffers reportados para los ensayos de SLS/IR/UV en función del pH. El valor de elipticidad molar se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\Theta_{MRW} = s/10 * M * r * p \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde s representa el valor de elipticidad en mdg, M es la concentración molar de proteína utilizada, r el paso de luz expresada en cm y p es el número de enlaces peptídicos de la proteína (número de aminoácidos menos uno). En los casos en que se informó la disminución del porcentaje de elipticidad molar a 222 nm de las muestras, se tomó al valor de elipticidad molar a 222 nm de la proteína en buffer nativo (PBS, pH 7,0 ó 50 mM fosfato, pH 7,0) como el 100%. Para las determinaciones de DC UV-cercano (360nm a 260nm) se utilizaron concentraciones de proteína, en el rango de 10 a 100 µM de subunidades monoméricas. En todos los ensayos de DC, se realizaron mediciones "blanco" con el buffer correspondiente y sin el agregado de proteína. Los resultados informados corresponden a tres mediciones independientes.

#### **1.A.6. Desnaturalización térmica**

Los ensayos de desnaturalización térmica de las proteínas se llevaron a cabo incubando a las muestras en PBS, pH 7,0 ó buffer 50 mM fosfato, pH 7,0 y

midiendo la variación de la señal de elipticidad molar a 222nm en función del incremento de temperatura (de 25 a 100 °C a una velocidad de 2 °C/min). Se tomaron medidas de DC cada intervalo de 0,5 °C. Se utilizó un Peltier (Jasco) acoplado al equipo de DC. La  $Tm_a$  se calculó como el punto medio de la transición. En los casos en que se determinó la  $Tm_a$  del intermediario pentamérico, se incubó a la muestra proteica en presencia de 2,3 M cloruro de guanidinio (en buffer 50 mM fosfato, pH 7,0) o bien se la diluyó en buffer de pH 5,0. En todos los casos en los que se determinó la  $Tm_a$ , se trabajó preferentemente con proteína iodoacetilada; caso contrario se agregó 1 mM DTT previo a la medición. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se graficó una curva representativa.

En los intentos de encontrar una condición de reversibilidad de la desnaturalización térmica de P18, se incubó a la muestra proteica en buffer 50 mM fosfato pH 7,0 con variadas concentraciones finales de urea (de 0,05 a 2 M) o bien de cloruro de guanidinio (de 0,05 a 1 M). Posteriormente se determinó la  $Tm$ , se enfrió a la muestra (a una velocidad de 2 °C) y se realizó un espectro de DC UV-lejano. En todos los casos, la transición térmica fue irreversible y se observaron agregados en la muestra.

#### **1.A.7. Ensayos de replegamiento**

En los ensayos de renaturalización, una muestra de P18 (RibH2) fue incubada durante 2 h con altas concentraciones de guanidinio (6 M) en buffer fosfato 50 mM, pH 7,0. Posteriormente se dializó la preparación ON contra buffer fosfato 50 mM, pH 7,0 y con al menos 4 cambios de solvente. Seguidamente, se centrifugó a la muestra y cuantificó mediante DO a 280nm la concentración de proteína replegada. Por último se le realizó un espectro de CD UV-cercano y se comparó su elipticidad molar a 222 nm con la obtenida previo al tratamiento de desnaturalización.

#### **1.A.8. Fluorescencia intrínseca y del ANS.**

Los espectros de emisión o excitación fueron tomados en un espectrofluorímetro Jasco FP-770 a 25 °C. Se fijó la luz de excitación de las muestras a 280 nm o bien a 295 nm y se tomaron los espectros de emisión en un rango de 300 a 450 nm. Las muestras proteicas fueron incubadas durante 2 h previo a cada medición en diferentes solventes de acuerdo a lo indicado en cada caso (cloruro de guanidinio, urea). El centro de masa (CM) de cada espectro se calculó como:

$$CM = \frac{\sum \lambda_i * I_i}{\sum I_i} \text{ (Ecuación 2)}$$

Donde  $\lambda_i$  representa la longitud de onda  $i$  (en nm), y  $I_i$  la intensidad de fluorescencia intrínseca en la longitud de onda  $i$ . En los casos que se informó el porcentaje de intensidad de fluorescencia, se tomó como el 100% de fluorescencia intrínseca al valor de emisión obtenido a una determinada longitud de onda, para la proteína incubada con el buffer sin desnaturante (PBS, pH 7,0 ó 50 mM fosfato, pH 7,0). En todos los casos se realizaron mediciones "blanco" con el buffer correspondiente y sin el agregado de proteína. Los resultados informados corresponden a tres mediciones independientes.

Los ensayos de fluorescencia del ANS se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de pH de incubación de las muestras que se informó para los experimentos de DC, o SLS/IR/UV y con el agregado de un exceso de ANS en cada muestra. Los valores de emisión obtenidos para estas muestras fueron normalizados con la emisión del ANS libre (50  $\mu$ M) en el mismo buffer. Las longitudes de excitación y emisión fueron ajustadas a 365 y 470 nm, respectivamente.

#### **1.A.9. Obtención de los parámetros termodinámicos del desplegamiento de P18 inducido por cloruro de guanidinio**

La evaluación termodinámica del desplegamiento de P18 inducido por GdnHCl fue ajustado a un modelo de dos equilibrios:

$N_{10} \leftrightarrow (2)N_5 \leftrightarrow 5U$ . El primer paso ( $N_{10} \leftrightarrow (2)N_5$ ) representa la disociación del decámero de P18 ( $N_{10}$ ) en dos pentámeros plegados ( $N_5$ ) y el segundo paso ( $N_5 \leftrightarrow 5U$ ), representa la concomitante disociación y desplegamiento de la estructura pentamérica en 5 monómeros desplegados ( $U$ ). Dado que se encontró que ambos equilibrios estaban bien resueltos uno de otro, los parámetros termodinámicos de cada transición fueron analizados independientemente utilizando un método de extrapolación lineal (Ecuación 3) y asumiendo una transición de dos estados para cada caso.

$$\Delta G_{D/U} = \Delta G_{H_2O} - m_1 * [D] \quad \text{(Ecuación 3)}$$

En donde  $\Delta G_{D/U}$  es el cambio de energía libre de disociación ( $\Delta G_D$ ) o desplegamiento ( $\Delta G_U$ ) de la proteína a una determinada concentración de desnaturante,  $\Delta G_{H_2O}$  es el cambio de energía libre de desplegamiento en ausencia de desnaturante,  $m_1$  representa la dependencia del parámetro de energía libre con la concentración de desnaturante ( $[D]$ ).

*Paso 1*— Para el caso de la proteína salvaje, el primer paso fue monitoreado por SLS/IR/UV en el rango de 1,5 a 2,2 M GdnHCl. Las concentraciones en

equilibrio de las especies  $N_{10}$  y  $N_5$  fueron calculadas utilizando las ecuaciones 6 y 7 obtenidas a partir de un arreglo de las ecuaciones 4 y 5.

$$Mr = (Mr_{10} * ccN_{10} + Mr_5 * ccN_5) / ccT \text{ (Ecuación 4)}$$

$$ccT = ccN_{10} + ccN_5 \text{ (Ecuación 5)}$$

$$[N_{10}] = ccT(Mr - Mr_5) / (Mr_{10} - Mr_5)Mr_{10} \text{ (Ecuación 6)}$$

$$[N_5] = (ccT - ccN_{10}) / Mr_5 \text{ (Ecuación 7)}$$

Donde  $Mr$  representa el peso molecular promedio de P18;  $ccN_{10}$ ,  $ccN_5$ , y  $ccT$  representan la concentración en mg/ml de decámero, pentámero y proteína total respectivamente;  $[N_{10}]$  y  $[N_5]$  representan la concentración molar;  $Mr_{10}$  y  $Mr_5$  los pesos moleculares promedio de las especies decaméricas (174,4 kDa) y pentaméricas (87,2 kDa) de P18 respectivamente.

La constante al equilibrio  $k_D$  y el cambio de energía libre asociado al paso 1 se definió según las ecuaciones 8 y 9.

$$k_D = [N_5]^2 / [N_{10}] \text{ (Ecuación 8)}$$

$$\Delta G_D = -RT \ln k_D \text{ (Ecuación 9)}$$

Los valores de  $\Delta G_{H_2O}$  y  $m_1$  para ésta transición fueron obtenidos de la ecuación 3, extrapolando a cero de concentración de desnaturante y por la pendiente de la regresión lineal, en el rango de 1,5 a 2,2 M de GdnHCl. La constante de disociación de la partícula decamérica ( $K_D$ ) fue estimada a partir del valor de  $\Delta G_{H_2O}$  obtenido para ésta transición utilizando la siguiente ecuación:  $K_D = e^{(-\Delta G_{H_2O} / (RT))}$ .

El valor de  $D_{50}$  fue obtenido por la Ecuación 9, suponiendo una condición en la que la fracción de  $N_{10} = N_5$ .

En el caso de las mutantes de triptofano (W22A-F121W o W22A-F130W), el segundo paso fue monitoreado por FT y DC en el rango de 1,5 a 2,2 M GdnHCl. Dado que en este caso se obtuvieron la fracción de proteína en estado decamérico ( $F_{N_{10}}$ ) o pentamérico ( $F_{N_5}$ ), y considerando que  $F_{N_{10}} + F_{N_5} = 1$ , las ecuaciones 6 y 7 fueron modificadas de la siguiente manera:

$$[N_{10}] = [T] * (1 - F_{N_5}) / 10 \text{ (Ecuación 6')}$$

$$[N_5] = [T] * F_{N_5} / 5 \text{ (Ecuación 7')}$$

donde  $[T]$  es la concentración molar total de proteína, expresada en unidades monoméricas. La  $k_d$ ,  $\Delta G_D$  y  $\Delta G_{H_2O}$  se obtuvieron de la misma manera que con la proteína salvaje, a partir de las ecuaciones 8, 9 y 3.

**Paso 2**— El Segundo paso fue monitoreado por CD y FT en el rango entre 2,3 y 3,5 M GdnHCl, tanto para la proteína salvaje como para las mutantes de

triptofano. La constante al equilibrio  $k_u$  y el cambio de energía libre asociado a ésta transición  $\Delta G_u$  se definieron según las ecuaciones 10 y 11.

$$k_u = [U]^5/[N_5] \text{ (Ecuación 10)}$$

$$\Delta G_u = -RT \ln k_u \text{ (Ecuación 11)}$$

Las fracciones de moléculas en el estado nativo pentamérico ( $F_n$ ) o desplegado monomérico ( $F_u$ ) fueron calculadas según las ecuaciones 12 y 13.

$$[T] = 5 * [N_5] + [U] \text{ (Ecuación 12)}$$

$$F_n = 5[N_5]/ [T] \text{ (Ecuación 13)}$$

$$F_u = 1- F_n = (F_n - Y)/(F_n - F_u) = (m_f * [D]+ F) - Y/(m_f * [D]+ F) - (m_u * [D]+ U) \text{ (Ecuación 14)}$$

Donde Y es el valor espectroscópico experimental, [D] la concentración de desnaturalizante, F y U son las ordenadas al origen de las líneas de bases pre y post desplegamiento respectivamente, y  $m_f$  y  $m_u$  las pendientes de dichas rectas. La constante al equilibrio para cada concentración de GdnHCl ensayada se calculó según:  $k_u = ([T] * F_u)^5/ ([T] * (1-F_u)/10)$  (surge de combinar las ecuaciones 10, 12, 13 y 14); el  $\Delta G_u$  se calculó reemplazando  $k_u$  en la ecuación 9 y el  $\Delta G_{H_2O}$  mediante una extrapolación lineal (ecuación 3). El valor de  $D_{50}$  se obtuvo según la ecuación 15, la cual surge de la condición en que  $F_n = F_u$ .

$$D_{50} = - R * T * \ln ([T] * 4 * 5/6) - \Delta G_{H_2O} ] * (- m) \text{ (Ecuación 15)}$$

Independientemente se realizó una extrapolación no lineal de los datos, obteniéndose los mismos valores para los diferentes parámetros.

#### **1.A.10. Cristalización, colección de datos y determinación de la estructura.**

Sumado al análisis cristalográfico de P18 previamente realizado por Braden *et.al.* (Braden 2000) el cual permitió la resolución de su estructura tridimensional, se obtuvieron dos estructuras cristalográficas adicionales en el laboratorio por el método “hanging drop” (método de difusión de vapor). El primero, utilizando 30% (p/v) polietileno glicol 400, 0,1 M acetato de sodio en 0,1 M buffer MES, pH 6,5 difractó a 2,9 Å y perteneció a un grupo espacial trigonal P3121. El segundo se obtuvo en 12% (p/v) polietileno glicol 4000, 0,1 M acetato de sodio en 0,1 M buffer HEPES, pH 7,5, el cual difractó a 3.0 Å y perteneció al grupo espacial P21. La difracción de rayos-X fue colectada en un ánodo rotatorio Bruker M18XH6 MAC Science comunicado con un detector Siemens X-1000 multiwire (Fundación Instituto Leloir) ó en la línea cristalográfica D03B en el Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron, Campinas, Brasil (Polikarpov 1998). La reducción y procesamiento de datos fue llevada a

cabo utilizando los programas MOSFLM, Scala y Truncate (Navaza J 1994). El empaquetamiento del cristal fue determinado utilizando el método de reemplazo molecular implementado en MoRe (Navaza J 1994); como modelo se empleó a la estructura de P18 previamente resuelta. La construcción de la simetría cristalográfica fue llevada a cabo haciendo uso del programa O (Jones 1991). El análisis cristalográfico de RibH1 y RibH2 forma parte de la Tesis de doctorado de Sebastián Klinke.

#### **1.A.11. Análisis de áreas de superficie e interfaces de contacto.**

El área de superficie total accesible y el área de superficie de interacción oculta ( $\Delta$ ASA) entre monómeros y pentámeros en la estructura pentamérica ó decamérica respectivamente fueron calculados con el programa Surface Racer 1.2 (Tsodikov 2002), implementando un algoritmo de Lee y Richards (Lee 1971) y como sonda una molécula de H<sub>2</sub>O de radio de 1.7 Å. Las interacciones intermoleculares polares o no-polares fueron calculadas por medio de los programas Molmol 2k.2 (Koradi 1996) y Structural Units (Sobolev 1999). Se consideró a un par de átomos en contacto, cuando la distancia entre ellos fue menor a 4 Å.

#### **1.A.12. Construcción de un plásmido-Cassete para la ingeniería de las quimeras.**

Este tipo de plásmido-casete fue desarrollado por Laplagne *et al.* (Laplagne 200, Laplagne 2003). Brevemente: una preparación de DNA plásmido de pET11a-P18 (Goldbaum 1999) fue digerido con las enzimas de restricción BamH I y Xba I (Promega) y el inserto liberado (secuencia que codifica para la proteína) fue subclonado en el vector (Promega). Se utilizó el kit de mutagénesis dirigida "Altered Sites II" (Promega) para introducir dos sitios nuevos de restricción: sitio Nsi I en los primeros dos codones del extremo 5' y el sitio Afl II en los dos codones que codifican para los residuos 8 y 9 de la secuencia aminoacídica de la proteína salvaje. La secuencia resultante contiene un residuo de His en lugar de una Ala en la posición 1 y una Leu en lugar de Asn en la posición 8 de la secuencia codificante. La construcción fue subclonada nuevamente en el vector pET11. El plásmido fue digerido con las enzimas de restricción Nsi I y Afl II, removiendo los primeros 8 codones. Para cada péptido utilizado se enviaron a sintetizar dos oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies, Inc.) de manera que luego del apareamiento entre sí, presenten la secuencia de interés y en sus extremos las secuencias complementarias para la ligación con el plásmido previamente digerido con las enzimas Nsi I y Afl II.



La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes *E.coli* DH5 $\alpha$  y BL21 (DE3). La inserción se verificó mediante Colony-PCR. La construcción final fue chequeada por secuenciación.

#### **1.A.13. Expresión y purificación de las quimeras de P18.**

Las proteínas quimeras fueron expresadas y purificadas de la misma manera que la proteína salvaje (1.A.1 y 1.A.2).

#### **1.A.14. Producción de quimeras mixtas (o polivalentes)**

Las quimeras P18-Omp31 y P18-Ketc1 en una concentración de 300  $\mu$ M de monómero (ambas en buffer 50 mM fosfato, pH 7,0) fueron incubadas durante 2 h con una concentración final de 2,3 M cloruro de guanidinio (de manera de inducir la disociación de los decámeros). Posteriormente se mezclaron las muestras proteicas y se la dializó contra buffer 50 mM fosfato pH 7,0. Luego de la diálisis, se centrifugó la mezcla de quimeras. El sobrenadante fue nuevamente dializado en el buffer de siembra (50 mM Tris, pH 8,5) de una columna de intercambio iónico (mono-Q, Amersham Pharmacia). Se trabajó con un gradiente lineal de 0 a 1 M NaCl. El pico correspondiente a la quimera mixta fue analizado mediante un gel al 15% de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) ó bien mediante un gel al 12,5 % de poliacrilamida nativo (Phastgel, Phast system). Como control cada quimera fue tratada por separado de la misma manera.

#### **1.A.15. Inmunización de las quimeras mixtas.**

Ratones Balb/c de seis semanas fueron inmunizados con 40  $\mu$ g de la preparación de quimera mixta (P18-Omp31-Ketc1) obtenida mediante el procedimiento detallado en el punto 1.A.14 en presencia de adyuvante completo de Freund (Sigma). Se realizaron 4 inmunizaciones intraperitoneales a los 0, 22, 45 y 60 días. Al día 70 del protocolo de inmunización, se sangraron a los ratones y se obtuvieron los sueros.

#### **1.A.16. Ensayo de ELISA.**

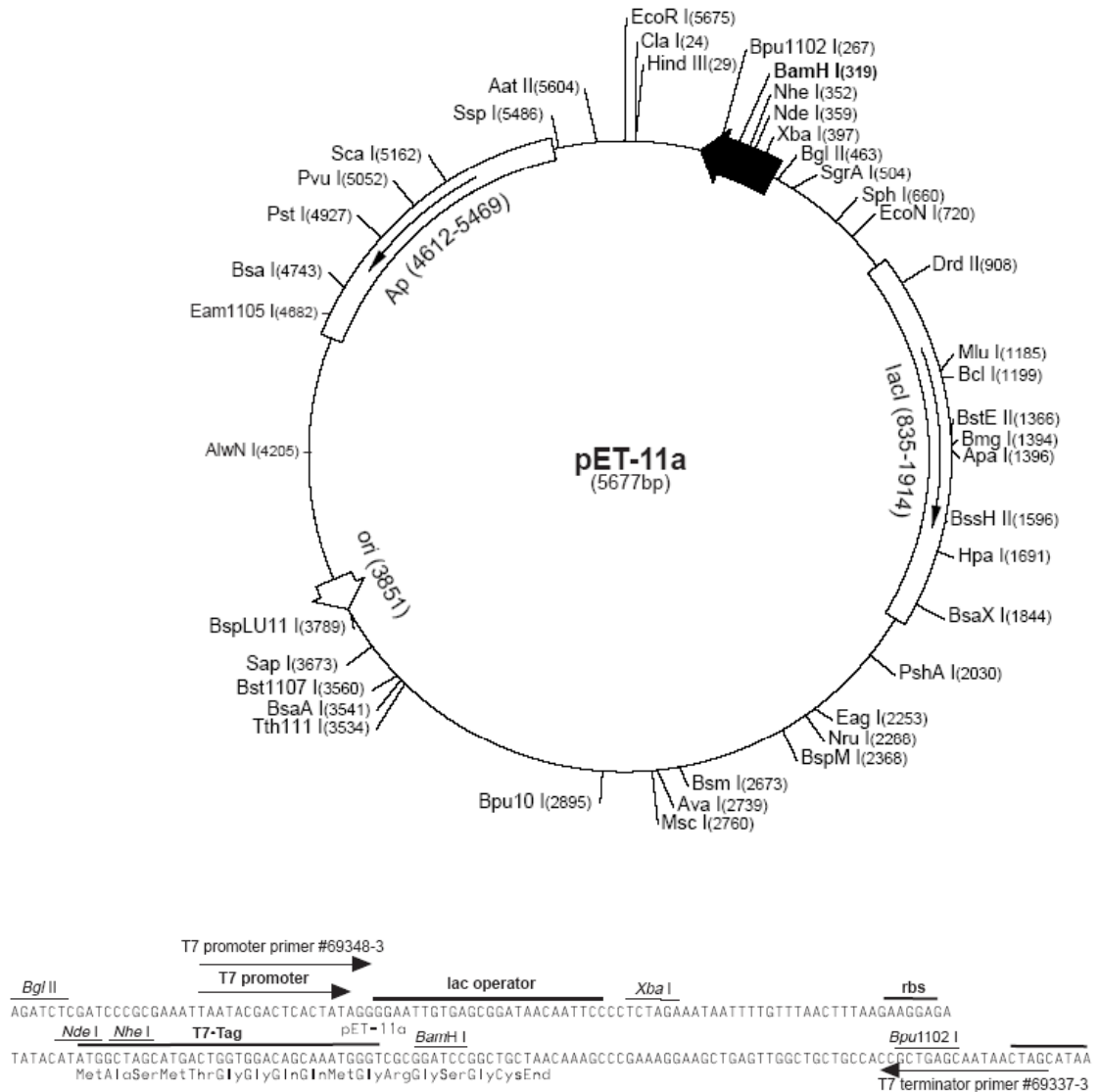
Se inmovilizaron sobre una placa de ELISA 0,4  $\mu$ g/well de la proteína P18, o de los péptidos Omp31 o Ketc1. Se ensayó la reactividad de los sueros (dilución 1/100 y obtenidos según se explicó en 1.A.15) por incubación con un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa contra IgG de ratón (Dako).

#### **1.A.17. Representación gráfica**

Las figuras mostradas en este trabajo se realizaron implementando los siguientes programas: MOLSCRIPT (Uchoa 2004), Raster3D (Merritt 1994), Chimera (Pettersen 2004), PyMOL (Liang 2003) y Swiss-Pdb Viewer (Kaplan 2001).

**1.B.1. Mutagénesis sitio dirigida de P18. Mutantes de estabilidad conformacional reducida y mutantes de triptofano.**

El método de mutagénesis sitio dirigida de P18 implementado, fue descrito por Kammann *et. al.* (Kammann 1989). Para ello se requirió de tres reacciones de amplificación en cadena (PCR). En todas las PCR se utilizó la enzima pFu (purificada en la Fundación Instituto Leloir), los buffers apropiados (Promega) y el termociclador (TECHNE). En la primera PCR (PCR<sub>1</sub>) se utilizó como templado al plásmido pET11a-P18 y como cebadores al oligonucleótido universal Sp6 (5'-ATTTAGGTGACTATAG), cuya secuencia se encuentra abajo del sitio de clonado (Figura 65) y a alguno de los oligonucleótidos que aparecen en la Tabla 15, según la variante de P18 que se deseó obtener (sintetizados por IDT Integrated DNA Technologies). Este último contiene una secuencia de 25-35 nucleótidos los cuales son complementarios a una región del gen de P18 salvo en un determinado codón (ubicado en el centro de dicha secuencia), éste codón codifica para el aminoácido que se desea que reemplace al aminoácido salvaje. El producto de ésta PCR fue purificado y utilizado como “mega-cebador” para la segunda reacción de amplificación (PCR<sub>2</sub>). En esta PCR<sub>2</sub> se utilizó al plásmido pET11a-P18 como templado y como segundo cebador al oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG). El producto purificado de esta reacción fue utilizado como templado de la última PCR (PCR<sub>3</sub>), realizada solamente con la finalidad de aumentar la masa del producto de PCR<sub>2</sub>. En la misma se utilizaron los dos cebadores universales Sp6 y T7. Generalmente, se realizaron 30 ciclos de amplificación: 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, y 72 °C durante 1 min, concluido el último ciclo se mantuvo la reacción durante 10 min a 72 °C. Como paso final, se purificó al producto de la PCR<sub>3</sub>, se lo digirió con las enzimas de restricción XbaI y BamHI (Promega) y ligó al vector pET11a, al cual se trató previamente con las mismas enzimas de restricción.



**Figura 65. Vector pET-11a y su sitio de**

La mezcla de ligación se utilizó para transformar bacteria *E. coli* DH5α. Se seleccionaron las bacterias transformadas por placa LB-Ampicilina y se tomó una colonia para inocular 5 ml de medio LB-Ampicilina. Se procesó el cultivo ON, a fin de obtener una preparación de DNA plasmídico. Ésta preparación se utilizó para una secuenciación (realizada en la Fundación Instituto Leloir). Una vez confirmada la mutación introducida, se transformaron bacterias *E. coli* DE3 con el mismo plásmido secuenciado y se procedió con la expresión y purificación de la proteína como lo indica en los puntos 1.A.1 y 1.A.2. En el caso de la obtención de las mutantes dobles P18-W22A-F121W y P18-W22A-

Variante de P18	Oligonucleótido utilizado en la PCR <sub>1</sub> .
P18-W22F	5´-ATTCAGGCCCGCTTCCACGCCGACATC
P18-W22A	5´-ATTCAGGCCCGCGCCACGCCGACATC
P18-L61A	5´-TATGAAATCCCGCTCACGCCAAGACA
P18-Y87A	5´-GACGGCGGCATCGCTCGTCATGATTTTC
P18-F91A	5´-TATCGTCATGATGCCGTGGCGACG
P18-M101A	5´-ATCAACGGCATGGCGCAGGTGCAGCTT
P18-L105A	5´-ATGCAGGTGCAGGCTGAAACGGAAGTG
P18-H119A	5´-GTGCTGACGCCGCGCCATTTCCATGAA
P18-H120A	5´-GTGCTGACGCCGCACGCCCTTCCATGAAAGCAAG
P18-F121W	5´-ACGCCGCACCATTGGCATGAAAGCAAGGAG
P18-E123A	5´-CCGCACCATTTCCATGCCAGCAAGGAGCAT
P18-E126A	5´-TTCCATGAAAGCAAGGCCGCATCACGACTTC
P18-F130W	5´-AAGGAGCATCACGACTGGTTCCATGCTCAT
P18-H134A	5´-GACTTCTTCCATGCTGCTTTCAAGGTGAAG
P18-I153A	5´-GAGCGCAGCCCGCGCCCGCTTGTCTGA

**Tabla 15. Oligonucleótidos diseñados para ser utilizado como cebadores en la reacción de PCR<sub>1</sub>, en la cual se genera el mega-cebador (conteniendo la mutación de interés).**

F130W, se realizó el mismo procedimiento que el reportado arriba, con la diferencia que en las PCR, se utilizó el templado pET11a-P18-W22A en vez del pET11a-P18, el cual ya presentaba la mutación W22A. La masa de proteína para cada una de las mutantes se estimó mediante la medición de la absorbancia a 280 nm de las muestras, considerando que el coeficiente de extinción molar teórico para las mutantes de triptofano es de  $4470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y el de la mutante Y87A es de  $8480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (calculados por monómero). En el

caso de las mutantes de triptofano, la concentración de proteína se estimó complementariamente mediante la técnica de Bradford.

**1.B.2. Calculo de las áreas de superficie de contacto de las mutantes de estabilidad conformacional reducida.**

El área de superficie de contacto perdido en las mutantes puntuales de P18, fue calculado utilizando el programa Ligand-Protein Contacts & Contacts of Structural Units del Instituto Weizmann, Israel (Sobolev 1999), utilizando el software CSU: <http://bip.weizmann.ac.il/oca-bin/lpccsu/>.

**1.B.3. Static Ligth Scattering, DC, temperatura de desnaturalización térmica, FT y estabilidad termodinámica de las mutantes de P18.**

El PM, espectros de DC (lejano y cercano), T<sub>m</sub>, FT y estabilidad termodinámica de las mutantes de P18 se calcularon del mismo modo como se indicó en los puntos 1.A.4, 1.A.5, 1.A.6, 1.A.8 y 1.A.9.

**1.B.4. Digestión enzimática de P18 y de L105A.**

Una muestra de P18, L105A o BSA en PBS pH 7,5, fue incubada a 37 °C en presencia de la enzima Tripsina (Invitrogen), (equivalente a una relación molar 1:50 de Sustrato:Enzima, respectivamente), en un volumen final de 0,5 ml. A diferentes tiempos se tomaron pequeñas muestras de cada una de las reacciones de digestión (10 µl), se las diluyó con el buffer de siembra de un SDS-PAGE y calentó a 100 °C durante 5 min, a fin de detener la reacción enzimática. Se reservó una muestra de cada una de las proteínas, las cuales fueron incubadas a 37 °C durante el tiempo que duró el procedimiento sin el agregado de Tripsina (control). Concluido el tiempo de la digestión (24 h) se sembraron todas las muestras en un gel desnaturalizante al 15 % de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se reveló por tinción con Coomassie Blue.

**2.A.1. Clonado de RibH1 de *B. abortus*.**

La secuencia nucleotídica del gen que codifica para RibH1 de *B. abortus* se obtuvo de la base de datos NCBI. Se utilizó esta información en el diseño de los cebadores específicos conteniendo los extremos 5' y 3' del gen y adicionando las bases de reconocimiento específico para las enzimas de restricción NdeI y HindIII. Las secuencias diseñadas y sintetizadas (IDT Integrated DNA Technologies) fueron las siguientes: RibH1-NdeI-V0, 5'-ATAATAATACATA TGGAGTTTCTCATGTCCAAGCAC-3' y RibH1-HindIII-Hi, 5'-TATTATTATAA GCTTAGGCTCCGAATTTTTTGCAGGC-3'. El clonado del gen se realizó mediante una reacción de amplificación en cadena (PCR) a partir del DNA total de *B. abortus*. Se realizaron 30 ciclos de amplificación de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, y 72 °C durante 1 min. El producto

de la amplificación fue purificado por gel de agarosa (kit de extracción en gel, Qiagen, Hilden, Germany) y utilizado en el ensayo de restricción con las enzimas apropiadas. Seguidamente se purificó el producto de digestión y se realizó la ligación al plásmido pT7-7 (Tabor 1990), previamente digerido por las enzimas BamHI y HindIII. El fragmento clonado fue secuenciado a fin de descartar errores introducidos durante la amplificación.

### **2.A.2. Expresión recombinante y purificación de RibH1 de *B. abortus*.**

RibH1 de *B. abortus* clonado en el vector pT7-7 fue utilizado para transformar células competentes BL21 (DE3). A continuación se llevó a cabo el mismo protocolo de sobreexpresión que el utilizado para P18 (RibH2) con 4 h de inducción con IPTG a 37 °C. Las células inducidas fueron tratadas con buffer A (50 mM fosfato, pH 7,0), sonicadas durante 5 min y centrifugadas a 15,000 g durante 15 min. Posteriormente se realizó una centrifugación para eliminar posibles agregados. La preparación fue inyectada en una columna Q-sepharose (Amersham Pharmacia), preequilibrada en buffer A. Se le aplicó un gradiente lineal de 0 a 1 M fosfato de potasio en buffer 50 mM fosfato, pH 7,0 (buffer B) a fin de eluir la proteína adsorbida. El eluido enriquecido en RibH1 fue sembrado en una columna Superdex-200 (S-200) ó Sephacryl-400 (S-400) (Amersham Biosciences), equilibradas con el buffer de siembra (100 mM fosfato de potasio, pH 7,0). Las fracciones conteniendo la proteína de interés fueron agrupadas y concentradas por ultrafiltración. La pureza de la muestra fue chequeada por geles PAGE-SDS. La concentración de RibH1 se calculó según el valor de absorbancia de la muestra a 280 nm, utilizando su coeficiente de extinción molar teórico calculado por monómero ( $11460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### **2.A.3. Determinación del PM de RibH1 de *B. abortus*.**

El PM de RibH1 de *B. abortus* fue determinado por SLS/IR/UV tal como se indicó en 1.A.4. y por ultracentrifugación analítica (UA). Los experimentos de UA se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de los Dres. Fischer y Bacher en Alemania. Para ello, se utilizó una ultracentrífuga analítica Optima XL-A de Beckman Instruments (Palo Alto, California). La concentración de proteína fue monitoreada fotométricamente a 280 nm. Para la determinación del coeficiente de sedimentación se incubó 1,2 mg/ml de proteína en buffer 100 mM fosfato de potasio, 300 mM cloruro de sodio, pH 5,0 y se centrifugó a la muestra a 59,000 rpm a 20 °C. Los ensayos de sedimentación al equilibrio se realizaron con una solución de 0,4 mg/ml de proteína en buffer 100 mM fosfato de potasio, 300 mM cloruro de sodio, pH 5,0. La muestra se centrifugó

a 10,000 rpm durante 72 h. a 4 °C. El volumen específico fue estimado a partir de la composición aminoacídica obteniéndose un valor de 0,733 ml/g (Laue 1992).

#### **2.A.4. Ensayo de medición de la actividad enzimática de lumazina sintetasa.**

El ensayo de medición de la actividad de LS fue descrito por Kis *et al.* (Kis 1995b). En todos los casos, la solución a la cual se le midió actividad enzimática contenía: 100 mM fosfato de potasio (pH 7,0), 5 mM EDTA, RPD (8), But-F (6) (Figura 3) y proteína (RibH1 o RibH2) en un volumen final de 200  $\mu$ l. A fin de determinar la  $K_M$  y  $V_{max}$  para RPD, las proteínas (40  $\mu$ M de monómero de RibH2 o 10  $\mu$ M de monómero de RibH1) fueron preincubadas con varias concentraciones de RPD, comenzando con 5  $\mu$ M. La reacción se inició con el agregado (en una cantidad en exceso) de But-F. Por otra parte, a fin de estimar la  $K_M$  y  $V_{max}$  para But-F, las mismas concentraciones de proteína fueron preincubadas con una cantidad creciente de But-F, comenzando con 10  $\mu$ M. En este caso, la reacción enzimática se inició con el agregado de un exceso de RPD. En ambos casos, se monitoreó la absorbancia a 410 nm cada 15 min a 37 °C. La concentración del sustrato variable fue incrementada en cada ensayo hasta no observarse cambio alguno de la velocidad de la reacción (a la misma se le asoció el valor de  $v_{max}$ ). Para cada experimento, se realizó un control (blanco de reacción) en el cual se procedió de la misma manera y con los mismos buffers y sustratos pero sin el agregado de proteína. Las velocidades iniciales de los blancos fueron sustraídas a las velocidades correspondientes de las muestras con proteínas. Las velocidades iniciales corregidas, fueron ajustadas con la ecuación de Michaelis-Menten o de Hill utilizando el programa Origin o DynaFit versión 3.28.024 (Kuzmic 1996). Cada determinación se realizó al menos por triplicado.

#### **2.A.5. Alineamiento y estudio filogenético de las proteínas pertenecientes a la familia de LS.**

Las secuencias utilizadas para el análisis filogenético de las proteínas pertenecientes a la familia de la LS fueron obtenidas a partir de la base de datos de NCBI y del programa Superfamily 1.69. Las secuencias aminoacídicas fueron alineadas con el programa ClustalX (versión 1.81) para el alineamiento de múltiples secuencias (Thompson 1997). El análisis filogenético de dicho alineamiento fue inferido a partir del programa PHYLML versión 2.4.2, implementando un algoritmo de máxima parsimonia y un modelo de sustitución JTT (Jones 1992; Guindon 2003). La fiabilidad de los nodos fueron analizados generando 1000 árboles independientes (Felsenstein 1987).

### **2.A.6. Detección de las proteínas RibH1 y RibH2 de extractos de *B. abortus* (experimentos de western blot).**

En este ensayo se utilizó un extracto bacteriano de una cepa salvaje de *B. abortus* y de una cepa mutante de *B. abortus* la cual presenta una delección del gen *ribh1*. Como controles positivos se utilizaron las proteínas recombinantes RibH1 y RibH2 de *B. abortus*. Los extractos bacterianos y las muestras proteicas fueron diluidos en buffer de corrida de un gel al 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE) y calentados a 100 °C durante 10 min. Posteriormente las muestras fueron sembradas en el gel y transferidas a una membrana de celulosa (BIO-RAD). La membrana transferida fue bloqueada en presencia de PBS conteniendo 5 % de leche descremada ON a 4 °C . Se utilizaron dos anticuerpos diferentes según la proteína a detectar: Para la detección de la proteína RibH2 se utilizó el anticuerpo monoclonal BI24 (Goldbaum 1993) y para la detección de RibH1 se utilizó un suero proveniente de un conejo inmunizado con la proteína recombinante RibH1. La dilución de los anticuerpos utilizada fue 1/1000 para el anti-RibH2 y 1/100 para el anti-RibH1 (siempre en PBS con 5 % de leche descremada). Cada membrana fue incubada en presencia de alguno de los anticuerpos durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente fueron lavadas exhaustivamente con PBS e incubadas en presencia del anticuerpo secundario (de ratón o conejo según correspondió) conjugado a la peroxidasa HRP, durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar varias veces, las membranas se incubaron por un minuto con el sustrato de la enzima HRP, LumiGlo (New England Biolabs) y se reveló por autorradiografía.

### **2.A.7. Modelado molecular.**

La molécula de FMN ó FAD se modeló en el sitio activo de RibH2 de *B. abortus* utilizando como patrón la ubicación del anillo pirimidínico y la cadena de ribosa del análogo de sustrato NRP (pdb 1T13) y el programa cristalográfico de visualización y modelado "O" (Jones 1991).

### **2.B.1. Clonado, expresión recombinante, purificación y determinación del PM de RibH1 y RibH2 de *M. loti*.**

Las secuencias nucleotídicas de los genes *ribH* de *M. loti* se obtuvieron de la base de datos NCBI. Se utilizó esta información en el diseño de los cebadores específicos conteniendo los extremos 5' y 3' de los genes y adicionando las bases de reconocimiento específico para las enzimas de restricción NdeI y BamHI. Las secuencias fueron las siguientes:

RIBH2-NdeI 5'- ATA ATA ATA CAT ATG AAT CAG CAT TCC CAC AAA GAC TAT



RIBH2-BamHI 5'- TAT TAT TAT AAG GAT CCT TAT CAT GCC GCG ATC TTT TC

RIBH1-Ndel 5'- ATA ATA ATA CAT ATG GCT GGT ATA TCC CAA CAC GGC

RIBH1-BamHI 5'- TAT TAT TAT AAG GAT CCT TAT CAC GAT CGG GCT CCC AAT

El clonado de los genes se realizó mediante una reacción de amplificación en cadena (PCR) a partir del DNA total de *B. abortus*. Se realizaron 30 ciclos de amplificación de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, y 72 °C durante 1 min. El producto de cada amplificación fue purificado por gel de agarosa (kit de extracción en gel, Quiagen, Hilden, Germany) y posteriormente utilizado en el ensayo de restricción con las enzimas apropiadas. Seguidamente, el producto de digestión fue repurificado y ligado al plásmido pT7-7 previamente digerido por las enzimas BamHI y Ndel. Los fragmentos clonados fueron secuenciados a fin de descartar errores introducidos durante la amplificación. La expresión y purificación de las proteínas recombinantes se realizó de la misma manera que la reportada para las proteínas homologas de *B. abortus*. La concentración de las proteínas RibH1 y RibH2 de *M. loti* fue estimada por la medición de la absorbancia de las muestras considerando los coeficientes de extinción molar teóricos (9970 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> y 12950 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, respectivamente). La determinación del PM de las proteínas se realizó mediante la técnica de SLS/IR/UV de la misma manera que se detallo en 1.A.5.

### **2.B.2. Caracterización de la unión RibH2-riboflavina y RibH2-hemina mediante técnicas fluorimétricas.**

Los experimentos se realizaron en un espectrofluorímetro Jasco FP-770 a 25 °C en cubetas de cuarzo de 10 nm. Se trabajó con soluciones madres de riboflavina, 5-nitro-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinediona (NRP) y hemina, preparadas frescas previo a cada medición. La concentración de cada una fue estimada fotométricamente:  $\epsilon_{445 \text{ riboflavina}} = 12.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{323 \text{ NRP}} = 14.200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{385 \text{ hemina}} = 58.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Kirschner-Zilber 1982). La solución madre de hemina (1 mM) fue preparada disolviendo a la hemina en 0,1 ml de 0,1 M NaOH y 0,9 ml de PBS.

**Unión RibH2-riboflavina.** La unión RibH2-riboflavina se determinó de diferentes maneras: **a)** La titulación del ligando (riboflavina) libre se llevó a cabo adicionando 100  $\mu\text{L}$  de la solución de riboflavina en pasos (cada 5  $\mu\text{L}$ ) a 1 ml de una solución de RibH2. El buffer de la reacción fue 50 mM fosfato de sodio, pH 7,0. El ligando libre fue estimado fluorimétricamente (utilizando una longitud de onda de excitación de 445 nm y de emisión de 520 nm). Para cada experimento se llevó a cabo un blanco sin el agregado de proteína y un

control inespecífico en el cual se trabajó con la proteína BSA. La constante de disociación ( $K_D$ ) fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$R_f = 0.5 * \{ (-P + R - K_d) + [(P - R + K_d)^2 + (4 * K_d * R)]^{0.5} \} \quad \text{(Ecuación 16)}$$

Donde  $R_f$  representa el ligando libre,  $R$  el total de ligando y  $P$  la cantidad de proteína. **b)** Se trabajó con una concentración constante de riboflavina (45  $\mu$ M, en buffer 50 mM fosfato, pH 7,0) a la cual se le agregó cantidades creciente de la proteína RibH2, o de las mutantes RibH2-W22A o RibH2-W22F en el mismo buffer. La concentración de riboflavina libre se estimó fluorimétricamente de la misma manera que la descrita anteriormente. **c)** El desplazamiento de la riboflavina de su sitio de unión por el compuesto NRP también fue evaluado fluorimétricamente. Para ello, se incubó a la proteína RibH2 con una concentración equimolar de riboflavina (30  $\mu$ M) y se adicionó una cantidad creciente del compuesto NRP (en pasos de a 5 o 10  $\mu$ l) hasta alcanzar una concentración final de 150  $\mu$ M. El desplazamiento de la riboflavina de su sitio de unión en RibH2 fue evidenciada por el aumento de la emisión de fluorescencia a 520 nm (excitación a 450 nm).

**Unión RibH2-hemina.** A fin de analizar la unión de la hemina a RibH2, la proteína fue marcada con una sonda fluorescente 5-iodoacetamidofluoresceína (IAEFI) (Invitrogen), mediante un protocolo general (Hermanson 1996). La sonda presenta afinidad preferencial por tioles libres. Se tituló a una concentración fija de proteína marcada (entre 1 y 500 nM de monómero) con una cantidad creciente de hemina. Se midió el decaimiento de la señal de emisión de fluorescencia de la sonda (excitación a 492 nm y emisión a 515 nm). La  $K_D$  fue calculada según la ecuación 16.

### **2.B.3. Unión RibH2- Hemina-agarosa.**

El ensayo de unión fue realizado según se describió en Lee et. al. (Lee 1992). Inicialmente, 100  $\mu$ l de la resina hemina-agarosa (Sigma-Aldrich) fue lavada tres veces por suspensión en 1 ml de buffer PBS seguido de una centrifugación corta (10,000  $\times g$ , 5 min.). Se utilizaron 20  $\mu$ g de cada una de las muestras proteicas (RibH2 o RibH2-W22A) y se las incubó con la resina durante 1 h a 4  $^{\circ}$ C, en constante agitación. En uno de los ensayos previo a la incubación con la resina, se preincubó a la muestra proteica con un exceso de 25 veces de riboflavina. Posteriormente, se centrifugaron a las muestras (10,000  $\times g$ , 5 min), y se separó el sobrenadante ( $S_1$ = proteína libre) del precipitado (proteína unida a la resina). El precipitado fue lavado tres veces con buffer PBS conteniendo 0,05% Tween. El material que permaneció unido a la resina fue eluido de la misma agregando 30  $\mu$ l de buffer de siembra del

gel de poliacrilamida, calentando la muestra a 100 °C durante 5 min y posteriormente centrifugando (12.000 × rpm, 2 min). El sobrenadante de esta última centrifugación junto con el S<sub>1</sub> fueron analizados mediante SDS-PAGE, seguido de una tinción por Commassie-Blue. Como control negativo se utilizó una muestra de RibH1, tratada de manera idéntica.

#### **2.B.4. Caracterización espectroscópica del complejo RibH2-hemina.**

Se incubó a una muestra proteica (en PBS, pH 7,5) con un exceso de hemina y se sembró la preparación en una columna de Sephadex G-25. Se utilizó el buffer PBS pH 7,5 para la elución. Se colectaron diferentes fracciones a las cuales se les midió la DO a 280 nm. La fracción de mayor DO fue seleccionada y se le realizó un espectro de absorbancia UV visible. Como control, se sembró una muestra de proteína sin incubar con hemina y una muestra de hemina libre.

Una muestra del complejo hemina-RibH2 (10 μM monómero) (purificado por la columna G-25) se transfirió a una cubeta hermética y sellada de 3 ml y se desgaseó inyectando nitrógeno gaseoso, por medio de una cánula, durante 45 min. Posteriormente se colectó el espectro de absorbancia UV visible del complejo. La muestra fue reducida con el agregado de pequeñas cantidades de ditionito de sodio (Sigma-Aldrich) y en cada paso se colectaron los espectros de absorbancia hasta que el mismo se mantuvo constante. Por último se inyectó repetidas veces oxígeno y se colectó la señal espectroscópica de la muestra. Se confirmó la reversibilidad de la reacción de reducción y oxidación repitiendo el ensayo (agregado de ditionito de sodio y luego oxígeno) al menos dos veces.

- Ali, M. H. y B. Imperiali (2005). "Protein oligomerization: how and why." Bioorg Med Chem 13(17): 5013-20.
- Al-Mariri, A., A. Tibor, P. Lestrade, P. Mertens, X. De Bolle y J. J. Letesson (2002). "Yersinia enterocolitica as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding Brucella abortus bacterioferritin or P39 antigen." Infect Immun 70(4): 1915-23.
- Al-Mariri, A., A. Tibor, P. Mertens, X. De Bolle, P. Michel, J. Godfroid, K. Walravens y J. J. Letesson (2001). "Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of Brucella spp." Infect Immun 69(10): 6264-70.
- Anderson, T. D. y N. F. Cheville (1986). "Ultrastructural morphometric analysis of Brucella abortus-infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum." Am J Pathol 124(2): 226-37.
- Arakawa, T., J. Yu, D. K. Chong, J. Hough, P. C. Engen y W. H. Langridge (1998). "A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes." Nat Biotechnol 16(10): 934-8.
- Arellano-Reynoso, B., N. Lapaque, S. Salcedo, G. Briones, A. E. Ciocchini, R. Ugalde, E. Moreno, I. Moriyon y J. P. Gorvel (2005). "Cyclic beta-1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival." Nat Immunol 6(6): 618-25.
- Bacher, A. (1986). "Heavy riboflavin synthase from Bacillus subtilis." Methods Enzymol 122: 192-9.
- Bachmann, M. F., H. Hengartner y R. M. Zinkernagel (1995). "T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction?" Eur J Immunol 25(12): 3445-51.
- Bachmann, M. F. y M. Kopf (1999). "The role of B cells in acute and chronic infections." Curr Opin Immunol 11(3): 332-9.
- Bachmann, M. F., U. H. Rohrer, T. M. Kundig, K. Burki, H. Hengartner y R. M. Zinkernagel (1993). "The influence of antigen organization on B cell responsiveness." Science 262(5138): 1448-51.
- Baldi, P. C., C. A. Velikovskiy, B. C. Braden, G. H. Giambartolomei, C. A. Fossati y F. A. Goldbaum (2000). "Structural, functional and immunological studies on a polymeric bacterial protein." Braz J Med Biol Res 33(7): 741-7.
- Banachowicz, E. (2006). "Light scattering studies of proteins under compression." Biochim Biophys Acta 1764(3): 405-13.
- Barton, G. M. y R. Medzhitov (2002). "Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors." Curr Opin Immunol 14(3): 380-3.
- Becvar, J. y G. Palmer (1982). "The binding of flavin derivatives to the riboflavin-binding protein of egg white. A kinetic and thermodynamic study." J Biol Chem 257(10): 5607-17.
- Benner, S. A., A. D. Ellington y A. Tauer (1989). "Modern metabolism as a palimpsest of the RNA world." Proc Natl Acad Sci U S A 86(18): 7054-8.
- Berguer, P. M., J. Mordinano, I. Piazzon y F. A. Goldbaum (2006). "A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4." J Immunol 176(4): 2366-72.
- Beyer, W. F., Jr. y I. Fridovich (1988). "Catalases--with and without heme." Basic Life Sci 49: 651-61.
- Bhakuni, V., D. Xie y E. Freire (1991). "Thermodynamic identification of stable folding intermediates in the B-subunit of cholera toxin." Biochemistry 30(20): 5055-60.

- Bogachev, A. V., R. A. Murtazina y V. P. Skulachev (1993). "Cytochrome d induction in *Escherichia coli* growing under unfavorable conditions." FEBS Lett 336(1): 75-8.
- Boudker, O., M. J. Todd y E. Freire (1997). "The structural stability of the co-chaperonin GroES." J Mol Biol 272(5): 770-9.
- Braden, B. C., C. A. Velikovskiy, A. A. Cauerhff, I. Polikarpov y F. A. Goldbaum (2000). "Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from *Brucella abortus*." J Mol Biol 297(5): 1031-6.
- Buchner, J. y T. Kiefhaber (2005). Protein folding handbook. Wiley-VCH, Weinheim.
- Celli, J., C. de Chastellier, D. M. Franchini, J. Pizarro-Cerda, E. Moreno y J. P. Gorvel (2003). "Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum." J Exp Med 198(4): 545-56.
- Céspedes, S., E. Andrews, H. Folch y A. Onate (2000). "Identification and partial characterisation of a new protective antigen of *Brucella abortus*." J Med Microbiol 49(2): 165-70.
- Chain, P. S., D. J. Comerci, M. E. Tolmasky, F. W. Larimer, S. A. Malfatti, L. M. Vergez, F. Aguero, M. L. Land, R. A. Ugalde y E. Garcia (2005). "Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*." Infect Immun 73(12): 8353-61.
- Cloekaert, A., J. M. Verger, M. Grayon, J. Y. Paquet, B. Garin-Bastuji, G. Foster y J. Godfroid (2001). "Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus." Microbes Infect 3(9): 729-38.
- Comerci, D. J., M. J. Martinez-Lorenzo, R. Sieira, J. P. Gorvel y R. A. Ugalde (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.
- Corbel, M. J. y W. J. Brinley-Morgan. (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Md.
- Courtenay, E. S., M. W. Capp, R. M. Saecker y M. T. Record, Jr. (2000). "Thermodynamic analysis of interactions between denaturants and protein surface exposed on unfolding: interpretation of urea and guanidinium chloride *m*-values and their correlation with changes in accessible surface area (ASA) using preferential interaction coefficients and the local-bulk domain model." Proteins Suppl 4: 72-85.
- Craig, P. O., P. M. Berguer, N. Ainciart, V. Zylberman, M. G. Thomas, L. J. Tosar, A. Bulloj, G. L. Boccaccio y F. A. Goldbaum (2005). "Multiple display of a protein domain on a bacterial polymeric scaffold." Proteins.
- Cushman, M., G. Jin, T. Sambaiah, B. Illarionov, M. Fischer, R. Ladenstein y A. Bacher (2005). "Design, synthesis, and biochemical evaluation of 1,5,6,7-tetrahydro-6,7-dioxo-9-D-ribitylamino lumazines bearing alkyl phosphate substituents as inhibitors of lumazine synthase and riboflavin synthase." J Org Chem 70(20): 8162-70.
- Daff, S. N., S. K. Chapman, K. L. Turner, R. A. Holt, S. Govindaraj, T. L. Poulos y A. W. Munro (1997). "Redox control of the catalytic cycle of flavocytochrome P-450 BM3." Biochemistry 36(45): 13816-23.
- D'Alfonso, L., M. Collini y G. Baldini (1999). "Evidence of heterogeneous 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate binding to beta-lactoglobulin from fluorescence spectroscopy." Biochim Biophys Acta 1432(2): 194-202.
- Dams, T. y R. Jaenicke (1999). "Stability and folding of dihydrofolate reductase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*." Biochemistry 38(28): 9169-78.

- Daniel, E. y G. Weber (1966). "Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate. Fluorimetric titrations." Biochemistry 5(6): 1893-900.
- De Ley, J., W. , P. Mannheim, A. Segers, M. Lievens, M. Denijn, Vanhoucke y M. Gillis (1987). "Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of Brucella and CDC group Vd." Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 35-42.
- Delpino, M. V., J. Cassataro, C. A. Fossati, F. A. Goldbaum y P. C. Baldi (2006). "Brucella outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein." Microbes Infect 8(5): 1203-8.
- DelVecchio, V. G., V. Kapatral, R. J. Redkar, G. Patra, C. Mujer, T. Los, N. Ivanova, I. Anderson, A. Bhattacharyya, A. Lykidis, G. Reznik, L. Jablonski, N. Larsen, M. D'Souza, A. Bernal, M. Mazur, E. Goltsman, E. Selkov, P. H. Elzer, S. Hagius, D. O'Callaghan, J. J. Letesson, R. Haselkorn, N. Kyrpides y R. Overbeek (2002). "The genome sequence of the facultative intracellular pathogen Brucella melitensis." Proc Natl Acad Sci U S A 99(1): 443-8.
- Detilleux, P. G., B. L. Deyoe y N. F. Cheville (1990a). "Entry and intracellular localization of Brucella spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy." Vet Pathol 27(5): 317-28.
- Detilleux, P. G., B. L. Deyoe y N. F. Cheville (1990b). "Penetration and intracellular growth of Brucella abortus in nonphagocytic cells in vitro." Infect Immun 58(7): 2320-8.
- Detilleux, P. G., B. L. Deyoe y N. F. Cheville (1991). "Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of Brucella abortus in Vero cells." Am J Vet Res 52(10): 1658-64.
- Dintzis, H. M., R. Z. Dintzis y B. Vogelstein (1976). "Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response." Proc Natl Acad Sci U S A 73(10): 3671-5.
- Dubey, V. K. y M. V. Jagannadham (2003). "Differences in the unfolding of procerain induced by pH, guanidine hydrochloride, urea, and temperature." Biochemistry 42(42): 12287-97.
- Duy, C. y J. Fitter (2006). "How aggregation and conformational scrambling of unfolded states govern fluorescence emission spectra." Biophys J 90(10): 3704-11.
- Eberhardt, S., S. Korn, F. Lottspeich y A. Bacher (1997). "Biosynthesis of riboflavin: an unusual riboflavin synthase of Methanobacterium thermoautotrophicum." J Bacteriol 179(9): 2938-43.
- Eberhardt, S., G. Richter, W. Gimbel, T. Werner y A. Bacher (1996). "Cloning, sequencing, mapping and hyperexpression of the ribC gene coding for riboflavin synthase of Escherichia coli." Eur J Biochem 242(3): 712-9.
- Echt, S., S. Bauer, S. Steinbacher, R. Huber, A. Bacher y M. Fischer (2004). "Potential anti-infective targets in pathogenic yeasts: structure and properties of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of Candida albicans." J Mol Biol 341(4): 1085-96.
- Eftink, M. R. (1995). "Use of multiple spectroscopic methods to monitor equilibrium unfolding of proteins." Methods Enzymol 259: 487-512.
- Eftink, M. R. (1997). "Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions." Methods Enzymol 278: 221-57.
- Ewalt, D. R., J. B. Payeur, B. M. Martin, D. R. Cummins y W. G. Miller (1994). "Characteristics of a Brucella species from a bottlenose dolphin (Tursiops truncatus)." J Vet Diagn Invest 6(4): 448-52.
- Fabozzi, G., P. Ascenzi, S. D. Renzi y P. Visca (2006). "Truncated hemoglobin GbO from Mycobacterium leprae alleviates nitric oxide toxicity." Microb Pathog 40(5): 211-20.

- Fasman, G. D. (1996). Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. New York.
- Felsenstein, J. (1987). "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap." Evolution 12(39): 783-791.
- Ficht, T. A. (2003). "Intracellular survival of Brucella: defining the link with persistence." Vet Microbiol 92(3): 213-23.
- Fischer, M., I. Haase, R. Feicht, G. Richter, S. Gerhardt, J. P. Changeux, R. Huber y A. Bacher (2002). "Biosynthesis of riboflavin: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase of *Schizosaccharomyces pombe*." Eur J Biochem 269(2): 519-26.
- Fischer, M., I. Haase, K. Kis, W. Meining, R. Ladenstein, M. Cushman, N. Schramek, R. Huber y A. Bacher (2003). "Enzyme catalysis via control of activation entropy: site-directed mutagenesis of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase." J Mol Biol 326(3): 783-93.
- Fischer, M., W. Romisch, B. Illarionov, W. Eisenreich y A. Bacher (2005). "Structures and reaction mechanisms of riboflavin synthases of eubacterial and archaeal origin." Biochem Soc Trans 33(Pt 4): 780-4.
- Fischer, M., A. K. Schott, W. Romisch, A. Ramsperger, M. Augustin, A. Fidler, A. Bacher, G. Richter, R. Huber y W. Eisenreich (2004). "Evolution of vitamin B2 biosynthesis. A novel class of riboflavin synthase in Archaea." J Mol Biol 343(1): 267-78.
- Fontecave, M., J. Coves y J. L. Pierre (1994). "Ferric reductases or flavin reductases?" Biometals 7(1): 3-8.
- Foster, G., K. L. Jahans, R. J. Reid y H. M. Ross (1996). "Isolation of Brucella species from cetaceans, seals and an otter." Vet Rec 138(24): 583-6.
- Fraser, S. A., L. de Haan, A. R. Hearn, H. K. Bone, R. J. Salmond, A. J. Rivett, N. A. Williams y T. R. Hirst (2003). "Mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit that separates toxoid-mediated signaling and immunomodulatory action from trafficking and delivery functions." Infect Immun 71(3): 1527-37.
- Frey, A. D. y P. T. Kallio (2003). "Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology." FEMS Microbiol Rev 27(4): 525-45.
- Gerhardt, S., I. Haase, S. Steinbacher, J. T. Kaiser, M. Cushman, A. Bacher, R. Huber y M. Fischer (2002). "The structural basis of riboflavin binding to *Schizosaccharomyces pombe* 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase." J Mol Biol 318(5): 1317-29.
- Godfroid, J., A. Cloeckart, J. P. Liautard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravens, B. Garin-Bastuji y J. J. Letesson (2005). "From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis." Vet Res 36(3): 313-26.
- Goldbaum, F. A., J. Leoni, J. C. Wallach y C. A. Fossati (1993). "Characterization of an 18-kilodalton Brucella cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis." J Clin Microbiol 31(8): 2141-5.
- Goldbaum, F. A., I. Polikarpov, A. A. Cauerhff, C. A. Velikovskiy, B. C. Braden y R. J. Poljak (1998). "Crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of the lumazine synthase from *Brucella abortus*." J Struct Biol 123(2): 175-8.
- Goldbaum, F. A., C. A. Velikovskiy, P. C. Baldi, S. Mortl, A. Bacher y C. A. Fossati (1999). "The 18-kDa cytoplasmic protein of Brucella species -- an antigen useful for diagnosis--is a lumazine synthase." J Med Microbiol 48(9): 833-9.
- Gorvel, J. P. y E. Moreno (2002). "Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication." Vet Microbiol 90(1-4): 281-97.

- Gough, J., K. Karplus, R. Hughey y C. Chothia (2001). "Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure." J Mol Biol 313(4): 903-19.
- Graupner, M., H. Xu y R. H. White (2002). "The pyrimidine nucleotide reductase step in riboflavin and F(420) biosynthesis in archaea proceeds by the eukaryotic route to riboflavin." J Bacteriol 184(7): 1952-7.
- Greene, R. F., Jr. y C. N. Pace (1974). "Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, alpha-chymotrypsin, and beta-lactoglobulin." J Biol Chem 249(17): 5388-93.
- Gross, A., S. Spiesser, A. Terraza, B. Rouot, E. Caron y J. Dornand (1998). "Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages." Infect Immun 66(4): 1309-16.
- Gross, A., A. Terraza, J. Marchant, M. Bouaboula, S. Ouahrani-Bettache, J. P. Liautard, P. Casellas y J. Dornand (2000a). "A beneficial aspect of a CB1 cannabinoid receptor antagonist: SR141716A is a potent inhibitor of macrophage infection by the intracellular pathogen *Brucella suis*." J Leukoc Biol 67(3): 335-44.
- Gross, A., A. Terraza, S. Ouahrani-Bettache, J. P. Liautard y J. Dornand (2000b). "In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells." Infect Immun 68(1): 342-51.
- Guidry, J. J., C. K. Moczygemba, N. K. Steede, S. J. Landry y P. Wittung-Stafshede (2000). "Reversible denaturation of oligomeric human chaperonin 10: denatured state depends on chemical denaturant." Protein Sci 9(11): 2109-17.
- Guindon, S. y O. Gascuel (2003). "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." Syst Biol 52(5): 696-704.
- Guzman-Verri, C., E. Chaves-Olarte, C. von Eichel-Streiber, I. Lopez-Goni, M. Thelestam, S. Arvidson, J. P. Gorvel y E. Moreno (2001). "GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42." J Biol Chem 276(48): 44435-43.
- Haase, I., S. Mortl, P. Kohler, A. Bacher y M. Fischer (2003). "Biosynthesis of riboflavin in archaea. 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase of *Methanococcus jannaschii*." Eur J Biochem 270(5): 1025-32.
- Haine, V., M. Dozot, J. Dornand, J. J. Letesson y X. De Bolle (2006). "NnrA is required for full virulence and regulates several *Brucella melitensis* denitrification genes." J Bacteriol 188(4): 1615-9.
- Halling, S. M., B. D. Peterson-Burch, B. J. Bricker, R. L. Zuerner, Z. Qing, L. L. Li, V. Kapur, D. P. Alt y S. C. Olsen (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.
- Harvey, R. A. y G. W. Plaut (1966). "Riboflavin synthetase from yeast. Properties of complexes of the enzyme with lumazine derivatives and riboflavin." J Biol Chem 241(9): 2120-36.
- Hemmen, F., V. Weynants, T. Scarcez, J. J. Letesson y E. Saman (1995). "Cloning and sequence analysis of a newly identified *Brucella abortus* gene and serological evaluation of the 17-kilodalton antigen that it encodes." Clin Diagn Lab Immunol 2(3): 263-7.
- Hermanson, G. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Press.
- Ikeda-Saito, M., H. Hori, L. A. Andersson, R. C. Prince, I. J. Pickering, G. N. George, C. R. Sanders, 2nd, R. S. Lutz, E. J. McKelvey y R. Mattera (1992). "Coordination structure of the ferric heme iron in



- engineered distal histidine myoglobin mutants." J Biol Chem 267(32): 22843-52.
- Iñon de Iannino, N. a. y R. A. Ugalde (2004). *Brucella Cyclic b-1,2-Glucans: Structure, Biosynthesis, Biological Activities and Role in Virulence. Brucella, Molecular and Cellular Biology*. I. a. Lopez-Goni y I. Moriyon. Pamplona, Horizon bioscience: 193-212.
- Jaenicke, R. (2000). "Stability and stabilization of globular proteins in solution." J Biotechnol 79(3): 193-203.
- Jahans, K. L., G. Foster y E. S. Broughton (1997). "The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals." Vet Microbiol 57(4): 373-82.
- Jones, D. T., W. R. Taylor y J. M. Thornton (1992). "The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences." Comput Appl Biosci 8(3): 275-82.
- Jones, T. A., J. Y. Zou, S. W. Cowan y Kjeldgaard (1991). "Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models." Acta Crystallogr A 47 ( Pt 2): 110-9.
- Jordan, D. B., K. O. Bacot, T. J. Carlson, M. Kessel y P. V. Viitanen (1999). "Plant riboflavin biosynthesis. Cloning, chloroplast localization, expression, purification, and partial characterization of spinach lumazine synthase." J Biol Chem 274(31): 22114-21.
- Joyce, G. F. (2002). "The antiquity of RNA-based evolution." Nature 418(6894): 214-21.
- Jubier-Maurin, V., A. Rodrigue, S. Ouahrani-Bettache, M. Layssac, M. A. Mandrand-Berthelot, S. Kohler y J. P. Liautard (2001). "Identification of the *nik* gene cluster of *Brucella suis*: regulation and contribution to urease activity." J Bacteriol 183(2): 426-34.
- Jumas-Bilak, E., S. Michaux-Charachon, G. Bourg, D. O'Callaghan y M. Ramuz (1998a). "Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*." Mol Microbiol 27(1): 99-106.
- Jumas-Bilak, E., S. Michaux-Charachon, G. Bourg, M. Ramuz y A. Allardet-Servent (1998b). "Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria." J Bacteriol 180(10): 2749-55.
- Kaiser, J., N. Schramek, S. Eberhardt, S. Puttmer, M. Schuster y A. Bacher (2002). "Biosynthesis of vitamin B2." Eur J Biochem 269(21): 5264-70.
- Kammann, M., J. Laufs, J. Schell y B. Gronenborn (1989). "Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR)." Nucleic Acids Res 17(13): 5404.
- Kaplan, W. y T. G. Littlejohn (2001). "Swiss-PDB Viewer (Deep View)." Brief Bioinform 2(2): 195-7.
- Kaufmann, A. F., M. I. Meltzer y G. P. Schmid (1997). "The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable?" Emerg Infect Dis 3(2): 83-94.
- Kirschner-Zilber, I., E. Rabizadeh y N. Shaklai (1982). "The interaction of heme and bilirubin with the human red cell membrane." Biochim Biophys Acta 690(1): 20-30.
- Kis, K. y A. Bacher (1995a). "Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*." J Biol Chem 270(28): 16788-95.
- Kis, K., K. Kugelbrey y A. Bacher (2001). "Biosynthesis of riboflavin. The reaction catalyzed by 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase can proceed without enzymatic catalysis under physiological conditions." J Org Chem 66(8): 2555-9.
- Kis, K., R. Volk y A. Bacher (1995b). "Biosynthesis of riboflavin. Studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase." Biochemistry 34(9): 2883-92.

- Klinke, S., V. Zylberman, D. R. Vega, B. G. Guimaraes, B. C. Braden y F. A. Goldbaum (2005). "Crystallographic studies on decameric Brucella spp. Lumazine synthase: a novel quaternary arrangement evolved for a new function?" J Mol Biol 353(1): 124-37.
- Ko, J. y 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.
- Koch, M., C. Breithaupt, S. GerhardtHaase, S. Weber, M. Cushman, R. Huber, A. Bacher y M. Fischer (2004). "Structural basis of charge transfer complex formation by riboflavin bound to 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase." Eur J Biochem 271(15): 3208-14.
- Kohler, S., S. Michaux-Charachon, F. Porte, M. Ramuz y J. P. Liautard (2003). "What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named Brucella?" Trends Microbiol 11(5): 215-9.
- Koradi, R., M. Billeter y K. Wuthrich (1996). "MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures." J Mol Graph 14(1): 51-5, 29-32.
- Korematsu, S., Y. Tanaka, S. Hosoi, S. Koyanagi, T. Yokota, B. Mikami y N. Minato (2000). "C8/119S mutation of major mite allergen Derf-2 leads to degenerate secondary structure and molecular polymerization and induces potent and exclusive Th1 cell differentiation." J Immunol 165(5): 2895-902.
- Kulakov, Y. K., P. G. Guigue-Talet, M. R. Ramuz y D. O'Callaghan (1997). "Response of Brucella suis 1330 and B. canis RM6/66 to growth at acid pH and induction of an adaptive acid tolerance response." Res Microbiol 148(2): 145-51.
- Kundu, S., M. Sundd y M. V. Jagannadham (1999). "Structural characterization of a highly stable cysteine protease ervatamin C." Biochem Biophys Res Commun 264(3): 635-42.
- Kurar, E. y G. A. Splitter (1997). "Nucleic acid vaccination of Brucella abortus ribosomal L7/L12 gene elicits immune response." Vaccine 15(17-18): 1851-7.
- Kuzmic, P. (1996). "Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase." Anal Biochem 237(2): 260-73.
- Ladenstein, R., K. Ritsert, R. Huber, G. Richter y A. Bacher (1994). "The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of Bacillus subtilis. X-ray structure analysis of hollow reconstituted beta-subunit capsids." Eur J Biochem 223(3): 1007-17.
- Ladenstein, R., M. Schneider, R. Huber, H. D. Bartunik, K. Wilson, K. Schott y A. Bacher (1988). "Heavy riboflavin synthase from Bacillus subtilis. Crystal structure analysis of the icosahedral beta 60 capsid at 3.3 A resolution." J Mol Biol 203(4): 1045-70.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-5.
- Lakowicz, J. R., (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy (Second Edition). New York, .
- Lakowicz, J. R. y NetLibrary Inc. (2002). Topics in fluorescence spectroscopy. New York, Kluwer Academic Pub.
- Laplagne, D. A., (2002). Tesis de licenciatura. Desarrollo de un nuevo carrier antigénico por ingeniería de proteínas para su uso en vacunas acelulares. Universidad de Buenos Aires.
- Laplagne, D. A., V. Zylberman, N. Ainciart, M. W. Steward, E. Scitutto, C. A. Fossati y F. A. Goldbaum (2004). "Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides." Proteins 57(4): 820-828.

- Laue, T. M., B. D. Shah., T. M. Ridgeway. y S. L. Pelletier. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science. A. J. R. S. E. Harding, and J. C. Horton. Cambridge, United Kingdom, The Royal Society of Chemistry: 90-125.
- Lee, B. y F. M. Richards (1971). "The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility." J Mol Biol 55(3): 379-400.
- Lee, B. C. (1992). "Isolation of an outer membrane hemin-binding protein of Haemophilus influenzae type b." Infect Immun 60(3): 810-6.
- Liang, M. P., D. R. Banatao, T. E. Klein, D. L. Brutlag y R. B. Altman (2003). "WebFEATURE: An interactive web tool for identifying and visualizing functional sites on macromolecular structures." Nucleic Acids Res 31(13): 3324-7.
- Liao, D. I., P. V. Viitanen y D. B. Jordan (2000). "Cloning, expression, purification and crystallization of dihydroxybutanone phosphate synthase from Magnaporthe grisea." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56 ( Pt 11): 1495-7.
- Loisel-Meyer, S., M. P. Jimenez de Bagues, E. Basseres, J. Dornand, S. Kohler, J. P. Liautard y V. Jubier-Maurin (2006). "Requirement of norD for Brucella suis virulence in a murine model of in vitro and in vivo infection." Infect Immun 74(3): 1973-6.
- Lopez-Goni, I., C. Guzman-Verri, L. Manterola, A. Sola-Landa, I. Moriyon y E. Moreno (2002). "Regulation of Brucella virulence by the two-component system BvrR/BvrS." Vet Microbiol 90(1-4): 329-39.
- Lopez-Goni, I. a. y I. Moriyon (2004). Brucella Molecular and Cellular Biology. Pamplona, Horizon Bioscience.
- Mack, M. y S. Grill (2006). "Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis." Appl Microbiol Biotechnol 71(3): 265-75.
- Man, N., A. J. Cartwright, K. M. Andrews y G. E. Morris (1989). "Treatment of human muscle creatine kinase with glutaraldehyde preferentially increases the immunogenicity of the native conformation and permits production of high-affinity monoclonal antibodies which recognize two distinct surface epitopes." J Immunol. Methods. 125(1-2): 251-9.
- Massey, V. (2000). "The chemical and biological versatility of riboflavin." Biochem Soc Trans 28(4): 283-96.
- Meining, W., S. Mortl, M. Fischer, M. Cushman, A. Bacher y R. Ladenstein (2000). "The atomic structure of pentameric lumazine synthase from Saccharomyces cerevisiae at 1.85 Å resolution reveals the binding mode of a phosphonate intermediate analogue." J Mol Biol 299(1): 181-97.
- Merritt, E. A. y M. E. Murphy (1994). "Raster3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 6): 869-73.
- Mok, Y. K., G. de Prat Gay, P. J. Butler y M. Bycroft (1996). "Equilibrium dissociation and unfolding of the dimeric human papillomavirus strain-16 E2 DNA-binding domain." Protein Sci 5(2): 310-9.
- Moreno, E. (1998). "Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome?" FEMS Microbiol Rev 22(4): 255-75.
- Moreno, E., A. Cloeckert y I. Moriyon (2002a). "Brucella evolution and taxonomy." Vet Microbiol 90(1-4): 209-27.
- Moreno, E. y I. Moriyon (2002b). "Brucella melitensis: a nasty bug with hidden credentials for virulence." Proc Natl Acad Sci U S A 99(1): 1-3.
- Moreno, E., E. Stackebrandt, M. Dorsch, J. Wolters, M. Busch y H. Mayer (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.
- Morgunova, E., W. Meining, B. Illarionov, I. Haase, G. Jin, A. Bacher, M. Cushman, M. Fischer y R. Ladenstein (2005). "Crystal structure of lumazine synthase from Mycobacterium tuberculosis as a target for rational drug design: binding mode of a new class of purinetriene inhibitors." Biochemistry 44(8): 2746-58.
- Mortl, S., M. Fischer, G. Richter, J. Tack, S. Weinkauff y A. Bacher (1996). "Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of Escherichia coli." J Biol Chem 271(52): 33201-7.
- Navaza J, A. C. (1994). "AMoRe: an automated package for molecular replacement." Acta Crystallogr. A 50: 157-163.
- Nicoletti, P. (1990). "Vaccination against Brucella." Adv Biotechnol Processes 13: 147-68.
- Nieba, L. y M. F. Bachmann (2000). "A new generation of vaccines." Mod. Asp. Immunobiol. 1: 36-39.
- Nudler, E. y A. S. Mironov (2004). "The riboswitch control of bacterial metabolism." Trends Biochem Sci 29(1): 11-7.
- Olczak, T., W. Simpson, X. Liu y C. A. Genco (2005). "Iron and heme utilization in Porphyromonas gingivalis." FEMS Microbiol Rev 29(1): 119-44.
- Oliveira, S. C. y G. A. Splitter (1996). "Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against Brucella abortus infection." Vaccine 14(10): 959-62.
- Onate, A. A., S. Cespedes, A. Cabrera, R. Rivers, A. Gonzalez, C. Munoz, H. Folch y E. Andrews (2003). "A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of Brucella abortus induces protective immunity in BALB/c mice." Infect Immun 71(9): 4857-61.
- Ouellet, H., Y. Ouellet, C. Richard, M. Labarre, B. Wittenberg, J. Wittenberg y M. Guertin (2002). "Truncated hemoglobin HbN protects Mycobacterium bovis from nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A 99(9): 5902-7.
- Ovadi, J. (1991). "Physiological significance of metabolic channelling." J Theor Biol 152(1): 1-22.
- Ozaki, S., M. P. Roach, T. Matsui y Y. Watanabe (2001). "Investigations of the roles of the distal heme environment and the proximal heme iron ligand in peroxide activation by heme enzymes via molecular engineering of myoglobin." Acc Chem Res 34(10): 818-25.
- Pace, C. N. (1986). "Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves." Methods Enzymol 131: 266-80.
- Pace, C. N. y K. Schott (1997). measuring the conformational stability of a protein. Oxford, IRL press.
- Pappas, G., N. Akritidis, M. Bosilkovski y E. Tsianos (2005). "Brucellosis." N Engl J Med 352(22): 2325-36.
- Paulsen, I. T., R. Seshadri, K. E. Nelson, J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, T. D. Read, R. J. Dodson, L. Umayam, L. M. Brinkac, M. J. Beanan, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, W. C. Nelson, B. Ayodeji, M. Kraul, J. Shetty, J. Malek, S. E. Van Aken, S. Riedmuller, H. Tettelin, S. R. Gill, O. White, S. L. Salzberg, D. L. Hoover, L. E. Lindler, S. M. Halling, S. M. Boyle y C. M. Fraser (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.
- Persson, K., G. Schneider, D. B. Jordan, P. V. Viitanen y T. Sandalova (1999). "Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly." Protein Sci 8(11): 2355-65.

- Perutz, M. F., M. Paoli y A. M. Lesk (1999). "Fix L, a haemoglobin that acts as an oxygen sensor: signalling mechanism and structural basis of its homology with PAS domains." Chem Biol 6(11): R291-7.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng y T. E. Ferrin (2004). "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem 25(13): 1605-12.
- Pierre, J. L., M. Fontecave y R. R. Crichton (2002). "Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron." Biometals 15(4): 341-6.
- Pizarro-Cerda, J., S. Meresse, R. G. Parton, G. van der Goot, A. Sola-Landa, I. Lopez-Goni, E. Moreno y J. P. Gorvel (1998a). "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 y J. P. Gorvel (2000). "Invasion and intracellular trafficking of Brucella abortus in nonphagocytic cells." Microbes Infect 2(7): 829-35.
- Pizarro-Cerda, J., E. Moreno, V. Sanguedolce, J. L. Mege y J. P. Gorvel (1998b). "Virulent Brucella abortus prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments." Infect Immun 66(5): 2387-92.
- Poester, F. P., V. S. Goncalves y A. P. Lage (2002). "Brucellosis in Brazil." Vet Microbiol 90(1-4): 55-62.
- Polikarpov, I., G. Olivab, E. E. Castellano, R. C. Garrattb, P. Arruda, A. Leite y A. Craievich (1998). "The protein crystallography beamline at LNLS, the Brazilian National Synchrotron Light Source." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A 405: 159-164.
- Ramsperger, A., M. Augustin, A. K. Schott, S. Gerhardt, T. Krojer, W. Eisenreich, B. Illarionov, M. Cushman, A. Bacher, R. Huber y M. Fischer (2006). "Crystal structure of an archaeal pentameric riboflavin synthase in complex with a substrate analog inhibitor: stereochemical implications." J Biol Chem 281(2): 1224-32.
- Reddy, G. B., S. Bharadwaj y A. Surolia (1999). "Thermal stability and mode of oligomerization of the tetrameric peanut agglutinin: a differential scanning calorimetry study." Biochemistry 38(14): 4464-70.
- Richter, G., R. Volk, C. Krieger, H. W. Lahm, U. Rothlisberger y A. Bacher (1992). "Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, and expression of the gene coding for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of Escherichia coli." J Bacteriol 174(12): 4050-6.
- Ritsert, K., R. Huber, D. Turk, R. Ladenstein, K. Schmidt-Base y A. Bacher (1995). "Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of Bacillus subtilis: crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 Å resolution." J Mol Biol 253(1): 151-67.
- Roberts, G. A., A. Celik, D. J. Hunter, T. W. Ost, J. H. White, S. K. Chapman, N. J. Turner y S. L. Flitsch (2003). "A self-sufficient cytochrome p450 with a primary structural organization that includes a flavin domain and a [2Fe-2S] redox center." J Biol Chem 278(49): 48914-20.
- Robinson, H. L. (1997). "Nucleic acid vaccines: an overview." Vaccine 15(8): 785-7.
- Roop, R. M., 2nd, B. H. Bellaire, M. W. Valderas y J. A. Cardelli (2004). "Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche." Mol Microbiol 52(3): 621-30.
- Roop, R. M., 2nd, G. T. Robertson, G. P. Ferguson, L. E. Milford, M. E. Winkler y G. C. Walker (2002). "Seeking a niche: putative contributions of the

- hfq and bacA gene products to the successful adaptation of the brucellae to their intracellular home." Vet Microbiol 90(1-4): 349-63.
- Rosas, G., G. Fragoso, N. Ainciart, F. Esquivel-Guadarrama, A. Santana, R. J. Bobes, O. Ramirez-Pliego, A. Toledo, C. Cruz-Revilla, G. Meneses, P. Berguer, F. A. Goldbaum y E. Sciutto (2006). "Brucella spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity." Microbes Infect 8(5): 1277-86.
- Rosinha, G. M., A. Myiوشي, V. Azevedo, G. A. Splitter y S. C. Oliveira (2002). "Molecular and immunological characterisation of recombinant Brucella abortus glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation." J Med Microbiol 51(8): 661-71.
- Ross, H. M., G. Foster, R. J. Reid, K. L. Jahans y A. P. MacMillan (1994). "Brucella species infection in sea-mammals." Vet Rec 134(14): 359.
- Ruddock, L. W., J. J. Coen, C. Cheesman, R. B. Freedman y T. R. Hirst (1996a). "Assembly of the B subunit pentamer of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Kinetics and molecular basis of rate-limiting steps in vitro." J Biol Chem 271(32): 19118-23.
- Ruddock, L. W., H. M. Webb, S. P. Ruston, C. Cheesman, R. B. Freedman y T. R. Hirst (1996b). "A pH-dependent conformational change in the B-subunit pentamer of Escherichia coli heat-labile enterotoxin: structural basis and possible functional role for a conserved feature of the AB5 toxin family." Biochemistry 35(50): 16069-76.
- Samartino, L. E. (2002). "Brucellosis in Argentina." Vet Microbiol 90(1-4): 71-80.
- Scheuring, J., M. Fischer, M. Cushman, J. Lee, A. Bacher y H. Oschkinat (1996). "NMR analysis of site-specific ligand binding in oligomeric proteins. Dynamic studies on the interaction of riboflavin synthase with trifluoromethyl-substituted intermediates." Biochemistry 35(30): 9637-46.
- Schmid, F. X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. Oxford, UK, Oxford University Press.
- Schurig, G. G., N. Sriranganathan y M. J. Corbel (2002). "Brucellosis vaccines: past, present and future." Vet Microbiol 90(1-4): 479-96.
- Sciutto, E., A. Toledo, C. Cruz, G. Rosas, G. Meneses, D. Laplagne, N. Ainciart, J. Cervantes, G. Fragoso y F. A. Goldbaum (2005). "Brucella spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system." Vaccine 23(21): 2784-90.
- Sedlmaier, H., F. Muller, P. J. Keller y A. Bacher (1987). "Enzymatic synthesis of riboflavin and FMN specifically labeled with <sup>13</sup>C in the xylene ring." Z Naturforsch [C] 42(4): 425-9.
- Semisotnov, G. V., N. A. Rodionova, O. I. Razgulyaev, V. N. Uversky, A. F. Gripas y R. I. Gilmanshin (1991). "Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe." Biopolymers 31(1): 119-28.
- Shipulina, N., R. C. Hunt, N. Shaklai y A. Smith (1998). "Coordination of nitric oxide by heme-hemopexin." J Protein Chem 17(3): 255-60.
- Sieira, R., D. J. Comerici, L. I. Pietrasanta y R. A. Ugalde (2004). "Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the Brucella abortus virB operon." Mol Microbiol 54(3): 808-22.
- Sobolev, V., A. Sorokine, J. Prilusky, E. E. Abola y M. Edelman (1999). "Automated analysis of interatomic contacts in proteins." Bioinformatics 15(4): 327-32.

- Sola-Landa, A., J. Pizarro-Cerda, M. J. Grillo, E. Moreno, I. Moriyon, J. M. Blasco, J. P. Gorvel y I. Lopez-Goni (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.
- Spivey, H. O. y J. Ovadi (1999). "Substrate channeling." *Methods* 19(2): 306-21.
- St Clair, N., B. Shenoy, L. D. Jacob y A. L. Margolin (1999). "Cross-linked protein crystals for vaccine delivery." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(17): 9469-74.
- Sulzer, B. y A. S. Perelson (1997). "Immunons revisited: binding of multivalent antigens to B cells." *Mol Immunol* 34(1): 63-74.
- Tabatabai, L. B. y G. W. Pugh, Jr. (1994). "Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine." *Vaccine* 12(10): 919-24.
- Tabor, S. y C. C. Richardson (1990). "DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Effect of pyrophosphorolysis and metal ions." *J Biol Chem* 265(14): 8322-8.
- Taverna, D. M. y R. A. Goldstein (2002). "Why are proteins marginally stable?" *Proteins* 46(1): 105-9.
- Teale, F. W. (1960). "The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution." *Biochem J* 76: 381-8.
- Thakur, S. D., R. Kumar y D. C. Thapliyal (2002). "Human brucellosis: review of an under-diagnosed animal transmitted disease." *J Commun Dis* 34(4): 287-301.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins (1997). "The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res* 25(24): 4876-82.
- Tsodikov, O. V., M. T. Record, Jr. y Y. V. Sergeev (2002). "Novel computer program for fast exact calculation of accessible and molecular surface areas and average surface curvature." *J Comput Chem* 23(6): 600-9.
- Tucker, B. J. y R. R. Breaker (2005). "Riboswitches as versatile gene control elements." *Curr Opin Struct Biol* 15(3): 342-8.
- Uchoa, H. B., G. E. Jorge, N. J. Freitas Da Silveira, J. C. Camera, Jr., F. Canduri y W. F. De Azevedo, Jr. (2004). "Parmodel: a web server for automated comparative modeling of proteins." *Biochem Biophys Res Commun* 325(4): 1481-6.
- Ugalde, J. E., D. J. Comerci, M. S. Leguizamon y R. A. Ugalde (2003). "Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine." *Infect Immun* 71(11): 6264-9.
- 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.
- Underhill, D. M. y A. Ozinsky (2002). "Toll-like receptors: key mediators of microbe detection." *Curr Opin Immunol* 14(1): 103-10.
- Velasco, J., C. Romero, I. Lopez-Goni, J. Leiva, R. Diaz y I. Moriyon (1998). "Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp." *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 3: 759-68.
- Velev, O. D., E. W. Kaler y A. M. Lenhoff (1998). "Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering: comparison of lysozyme and chymotrypsinogen." *Biophys J* 75(6): 2682-97.
- Velikovskiy, C. A. (2000). Estudio de la respuesta inmunológica inducida por una proteína de 18 kDa y otros componentes citoplasmáticos de

- Brucella*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires.
- Velikovskiy, C. A., J. Cassataro, G. H. Giambartolomei, F. A. Goldbaum, S. Estein, R. A. Bowden, L. Bruno, C. A. Fossati y M. Spitz (2002). "A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice." Infect Immun 70(5): 2507-11.
- Venyaminov, S. Y. y J. T. Yang (1996). Determination of Protein Secondary Structure. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. G. D. Fasman. New York., Plenum Press: 69–107.
- Verger, J. M., F. Grimont, P. A. D. Grimont y M. Grayon (1985). "Brucella, a monoespecific genus as shown by desoxyribonucleic acid hybridation." Int J Sys Bacteriol 35: 292-295.
- Vitreschak, A. G., E. V. Lyubetskaya, M. A. Shirshin, M. S. Gelfand y V. A. Lyubetsky (2004). "Attenuation regulation of amino acid biosynthetic operons in proteobacteria: comparative genomics analysis." FEMS Microbiol Lett 234(2): 357-70.
- Vitreschak, A. G., D. A. Rodionov, A. A. Mironov y M. S. Gelfand (2002). "Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation." Nucleic Acids Res 30(14): 3141-51.
- Wang, M., N. Qureshi, N. Soeurt y G. Splitter (2001). "High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages." Microb Pathog 31(5): 221-30.
- Watson, C. R., R. Hanna, R. Porter, W. McConnell, D. A. Graham, S. Kennedy y S. W. McDowell (2003). "Isolation of *Brucella* species from common seals in Northern Ireland." Vet Rec 153(5): 155-6.
- Way, S. S., S. Sallustio, R. S. Magliozzo y M. B. Goldberg (1999). "Impact of either elevated or decreased levels of cytochrome bd expression on *Shigella flexneri* virulence." J Bacteriol 181(4): 1229-37.
- Wen, J., T. Arakawa y J. S. Philo (1996). "Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions." Anal Biochem 240(2): 155-66.
- Wilson, W. W. (2003). "Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth--a practical approach." J Struct Biol 142(1): 56-65.
- Winkler, W. C., S. Cohen-Chalamish y R. R. Breaker (2002). "An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN." Proc Natl Acad Sci U S A 99(25): 15908-13.
- Wittenberg, J. B., M. Bolognesi, B. A. Wittenberg y M. Guertin (2002). "Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants." J Biol Chem 277(2): 871-4.
- Worst, D. J., M. M. Gerrits, C. M. Vandenbroucke-Grauls y J. G. Kusters (1998). "Helicobacter pylori ribBA-mediated riboflavin production is involved in iron acquisition." J Bacteriol 180(6): 1473-9.
- Xia, Z. X. y F. S. Mathews (1990). "Molecular structure of flavocytochrome b2 at 2.4 Å resolution." J Mol Biol 212(4): 837-63.
- Yonetani, T. y H. Anni (1987). "Yeast cytochrome c peroxidase. Coordination and spin states of heme prosthetic group." J Biol Chem 262(20): 9547-54.
- Zavodszky, P., J. Kardos, Svingor y G. A. Petsko (1998). "Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins." Proc Natl Acad Sci U S A 95(13): 7406-11.
- Zhang, X., W. Meining, M. Cushman, I. Haase, M. Fischer, A. Bacher y R. Ladenstein (2003). "A structure-based model of the reaction catalyzed



- by lumazine synthase from *Aquifex aeolicus*." J Mol Biol 328(1): 167-82.
- Zhang, X., W. Meining, M. Fischer, A. Bacher y R. Ladenstein (**2001**). "X-ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus* at 1.6 Å resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons." J Mol Biol 306(5): 1099-114.
- Zylberman, V., P. O. Craig, S. Klinke, B. C. Braden, A. Cauerhff y F. A. Goldbaum (**2004**). "High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* sp. lumazine synthase." J Biol Chem 279(9): 8093-101.
- Zylberman, V., S. Klinke, I. Haase, A. Bacher, M. Fischer y F. A. Goldbaum (**2006**). "Evolution of vitamin B<sub>2</sub> biosynthesis: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthases of *Brucella*." J Bacteriol 188(17): 6135-42.