

Tesis Doctoral

Transporte y adhesión en *Brucella suis*: caracterización de una proteína de la familia TolC en el eflujo de compuestos tóxicos y de tres posibles adhesinas en la colonización del hospedador

Posadas, Diana M.

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Posadas, Diana M.. (2010). Transporte y adhesión en *Brucella suis*: caracterización de una proteína de la familia TolC en el eflujo de compuestos tóxicos y de tres posibles adhesinas en la colonización del hospedador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Posadas, Diana M.. "Transporte y adhesión en *Brucella suis*: caracterización de una proteína de la familia TolC en el eflujo de compuestos tóxicos y de tres posibles adhesinas en la colonización del hospedador". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**“Transporte y adhesión en *Brucella suis*:
rol de una proteína de la familia TolC en el eflujo de
compuestos tóxicos y de tres posibles adhesinas en la
colonización del hospedador”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Química Biológica

Diana M. Posadas

Directora: Dra. Ángeles Zorreguieta

Consejero de estudios: Dr. Luis Quesada-Allué

Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA;
Fundación Instituto Leloir

Abril, 2010



....

...

A Javi*, por compartir todo conmigo (hasta la escritura de la tesis!)

A mi familia* por acompañarme siempre y ayudarme a hacer lo que me gusta

A la FCEyN* por ser mi segundo hogar por mucho tiempo, y después permitirme hacer este doctorado

A Angeles* por todo su apoyo y sus enseñanzas

A Hernán* por todos los proyectos, los experimentos, los licuados y por contagiarme a veces su forma de ver el mundo

A Fer* (dicen que la soledad es un amigo que no está) por todos los viajes, alegrías y aventuras

A Piku* por ponerle pilas a todos nuestros proyectos, aunque haya que ponerse un traje de astronauta o sumergirse en un autoclave

A Vani* y a Lu*, porque cada una desde su silla respectiva me hizo compañía mientras escribíamos.

A todo el lab 204/303/204* por compartir las cosas cotidianas, y hacer que el día a día en la mesada sea divertido

A todo el 207 que luego fue 304* por toda la buena onda compartida en todos estos años

A mis amigos, Ma. Celia*, Ma. Mar*, Guille*, Lu*, Pablo*, Die*, Lucas*, Gato*, Alf*, Nico*, Juan*, Flora*, Lucas*, Kiu*, Ceci* y Nati*, por todos los buenos momentos, los viajes, las risas, y por estar conmigo siempre (aunque se vayan a Japón, Madrid, Nueva Zelanda o a la tierra de Robin Hood)

A Luis Quesada Allué* por ser realmente mi consejero de estudios

A Ceci D'Alessio* por su generosidad y por tener siempre una buena idea para compartir

A R. Wolosiuk*, Fer Ceriani*, Ale Schinder*, Julio Caramelo*, Caro Carrillo* y Pablo Cerdán* por todas las charlas y los consejos

A Marielita*, Julia*, Eleonora* y toda la gente del INTA* que nos ayudó incondicionalmente

A toda la gente de la FIL* y de QB* que sin darse cuenta ayudan a que esta y otras tesis existan!

*** Todos merecen igual agradecimiento, por lo que comparten el primer lugar.**

"Nature shows us only the tail of the lion. But I do not doubt that the lion belongs to it even though he cannot at once reveal himself because of his enormous size."

Albert Einstein

Transporte y Adhesión en *Brucella suis*.

Brucella es un patógeno intracelular facultativo, responsable de una infección zoonótica llamada brucelosis. Un aspecto clave en la virulencia de este género es su habilidad para invadir y proliferar dentro de células fagocíticas y no fagocíticas, en las que se establece. En esta tesis se identificaron y caracterizaron factores imprescindibles para la interacción de este patógeno con su hospedador. Uno de estos factores fue la proteína BepC, que pertenece a la familia TolC de proteínas de membrana externa. BepC resultó crucial en la detoxificación de la bacteria tanto *in vivo* como *in vitro*, probablemente formando parte de sistemas tripartitos de eflujo. Los otros factores fueron tres adhesinas que pertenecen a la familia de autotransportadores de tipo I. Estas proteínas, a las que denominamos BmaA, B y C (por *Brucella monomeric autotransporter*), participarían en: i) la adhesión de *Brucella suis* a las células del hospedador, ii) la interacción con otras superficies como la matriz extracelular y iii) las interacciones bacteria-bacteria, para ambas, BmaA y BmaB. Estos factores pueden ser base de estudios futuros más específicos y profundos que lleven al desarrollo de vacunas o terapias que mejoren el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la brucelosis.

Palabras clave: *Brucella*; transporte; sistemas de eflujo; TolC; autotransportadores; adhesión; virulencia.

Transport and Adhesion in *Brucella suis*.

Brucella is an intracellular pathogen responsible of the zoonotic disease called brucellosis. A key feature of *Brucella* virulence is its ability to invade and proliferate inside professional and non-professional phagocytic cells, where it establishes. In this thesis, essential factors for the interaction of this pathogen with its host were identified and characterized. One such factor was the BepC protein, that belongs to the TolC family of outer membrane proteins. BepC was shown to be crucial for the detoxification of the bacteria both *in vivo* and *in vitro*, probably as part of tripartite efflux systems. The other factors were three adhesins belonging to the type I autotransporters family. These proteins that we called BmaA, B and C (*Brucella monomeric autotransporter*) were shown to be involved in: i) *Brucella suis* adhesion to host cells, ii) the interaction of *B. suis* with other surfaces such as the extracellular matrix and iii) for both BmaA and BmaB, in bacteria-bacteria interactions. These factors can be the basis of future studies, more specific and profound, that lead to the development of vaccines or therapies that improve the diagnosis, prevention and treatment of brucellosis.

Key words: *Brucella*; transport; efflux systems; TolC; autotransporters; adhesion; virulence.

Índice

Introducción.....	10
Brucelosis, una antropozoonosis	10
Brucelosis animal, una enfermedad re-emergente.....	12
Brucella spp. Características del género y factores de virulencia	13
Sistemas de transporte bacterianos	19
Sistemas de eflujo.....	19
Transportadores de la superfamilia ABC (<u>A</u> TP- <u>B</u> inding <u>C</u> ass <u>e</u> tte)	20
Transportadores de la superfamilia RND (<u>R</u> esistance/ <u>N</u> odulation/ <u>D</u> ivision)	22
Otros transportadores secundarios: superfamilias MFS, SMR y MATE.....	23
TolC	25
Adhesión al hospedador en bacterias patógenas.....	28
Sistemas de secreción de proteínas de tipo V	29
Autotransportadores en B. suis	32
Phage Display.....	34
Ensayos heterólogos.....	40
Materiales y Métodos.....	44
Cepas y plásmidos	44
Medios y condiciones de cultivo	46
Antibióticos	48
Conservación de cepas	48
Amplificación de secuencias mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	48
Oligonucleótidos.....	49
Colony PCR.....	50
Ligación en pGEMT-easy	50
Extracción de ADN cromosómico.....	50
Extracción de ADN plasmídico	51
Geles de agarosa	52
Extracción de proteínas extracelulares en E. coli	52
Electroforesis de proteínas	53
Conjugación tri- o biparental en placa	53
Preparación de células electrocompetentes y electroporación.....	54
E. coli de alta eficiencia para electroporación	55
Inducción	55
Ensayo de actividad β -Galactosidasa.....	56
Sensibilidad a Colicina E1	58
Secreción de Hemolisina: Agar-sangre	58
Curvas de crecimiento	58
Ensayos de microdilución.....	59
Test de difusión en disco	60
Cuantificación de la adhesión por cristal violeta.....	60
Secuenciación de ADN, análisis de secuencia	60
Construcción de árboles filogenéticos	60
Búsqueda de promotores	61
Southern blot.....	61
Construcción de una phage display library.....	62
Panning	63

Colony PCR de colonias provenientes del panning.....	64
Obtención de fagos a partir de un único clon.....	65
Titulación de los fagos	65
Evaluación de la afinidad de los péptidos seleccionados: panning	65
Evaluación de la afinidad de los péptidos seleccionados: ELISA	66
Screening por expresión del E-tag (colony blot)	67
Test de aglutinación en acriflavina	67
Ensayo autoagregación.....	68
Líneas celulares y mantenimiento	68
Ensayos para evaluar adhesión e invasión a células eucariotas	68
Ensayos de replicación intracelular en células eucariotas.....	70
Infección HeLa/competencia con candidatos del panning.....	70
Inmunofluorescencia, Microscopía de fluorescencia y confocal.....	70
Infección en ratones BALB/c.....	71
Generación de anticuerpos policlonales anti-BmaC en ratón.....	71
Purificación de ARN.....	72
Degradación de ADN genómico	73
Síntesis de cDNA.....	73
Reacción de PCR.....	73
Obtención de mutantes por inserción: bepC.....	74
Confirmación de la mutante bepC por PCR (B. suis).....	75
Obtención de mutantes por inserción: bmaA y bmaB.....	75
Confirmación de las mutantes bmaA y bmaB por PCR.....	77
Obtención de mutantes por delección: bmaC.....	77
Confirmación de las mutantes bmaC por PCR	78
Resultados.....	79
Capítulo I	79
Identificación de un OMF en el genoma de B. suis.....	80
Construcción de plásmidos	81
Amplificación y clonado del gen bepC de B. suis: construcción de un plásmido de expresión de amplio rango	81
Ensayos de complementación funcional en E. coli	83
Obtención de transformantes con bepC de B. suis.....	83
Inducción de la expresión de BepC	84
Sensibilidad a Colicina E1	85
Secreción de α -hemolisina	86
Sensibilidad a compuestos tóxicos: test de difusión en disco	87
Sensibilidad a compuestos tóxicos: CIM.....	89
Ensayos de caracterización de la mutante bepC de B. suis.....	93
Amplificación y clonado del gen bepC de B. suis: obtención de mutantes bepC ⁻ por recombinación homóloga.....	93
Confirmación de la mutante bepC por southern blot	95
Expresión de bepC in vitro	95
Ensayos de sensibilidad a drogas en B. suis.....	96
Virulencia: ensayos en modelos celulares	98
Virulencia: ensayos in vivo.....	99
Capítulo II	100
Construcción de una phage display library	101
Algunas consideraciones sobre el vector	101

Tamaño y representatividad	102
Rondas de panning.....	103
Controles del panning y obtención de candidatos	107
Selección de candidatos	109
Caracterización del binding: ELISA.....	112
Caracterización del binding: panning	113
Bloqueo de la infección de B. suis con fagos.....	114
Bloqueo de la infección concentración-dependiente	115
Inmunofluorescencia	116
Obtención de la mutante Δ bmaC en B. suis.....	120
Control de la mutante: test de disociación.....	123
Dot blot anti-BmaC	124
Formación de Biofilms en B. suis.....	125
Resistencia a suero	126
Propiedades de adhesión/invasión a células epiteliales.....	127
Replicación intracelular	129
Capítulo III	130
Búsqueda de posibles adhesinas: Autotransportadores de tipo I	131
Detección de la expresión de bmaA y bmaB por RT-PCR.....	136
Control de la mutante: test de disociación.....	137
Autoagregación/sedimentación.....	137
Microscopía: formación de agregados	140
Formación de Biofilms	142
Adhesión/invasión a células epiteliales	143
Replicación intracelular	145
Resistencia a suero	145
Expresión heteróloga.....	146
Adhesión/invasión a células epiteliales	147
Autoagregación y sedimentación	148
Discusión.....	150
Transporte	150
Adhesión	155
Phage Display.....	155
Autotransportadores.....	158
Bibliografía	163
Anexo A.....	175
Marcadores de peso molecular	175
ADN	175
Proteínas.....	175
Anexo B.....	176

Introducción

Brucelosis, una antropozoonosis

Brucella es una pequeña bacteria Gram-negativa, responsable de la Brucelosis, una infección zoonótica que afecta rumiantes, cerdos, perros, roedores, cetáceos¹ e incluso humanos. A pesar de que las primeras descripciones de esta enfermedad se remontan al imperio Romano, el género *Brucella* recién fue descrito alrededor de 1880 por un eminente médico de la armada Británica, Sir David Bruce. Bruce descubrió que el microorganismo causante de la fiebre de Malta, o fiebre Mediterránea, era una pequeña bacteria presente en fluidos y articulaciones de enfermos, y decidió denominarla *Micrococcus melitensis*. Un siglo más tarde, el género fue renombrado como *Brucella*.

La brucelosis humana, o fiebre de Malta, es una infección crónica con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. El comienzo de la enfermedad es muy variable, habitualmente de forma aguda o subaguda, con fiebre elevada, escalofríos, sudoración profusa de olor característico, cefaleas, debilitamiento general y artromialgias, síntomas que se establecen en el intervalo de unos días o semanas²; luego estos síntomas ceden, dando lugar a la fase crónica de la enfermedad. Si la enfermedad prosigue, como consecuencia de la dispersión bacteriana aparecen nuevos síntomas, como por ejemplo compromiso articular, alteraciones hematológicas y daño hepático entre otros. Es muy frecuente que a raíz de esta enfermedad surjan complicaciones, que se suelen confundir con otras patologías, dificultando aún más el diagnóstico. Ejemplos de estas complicaciones son artritis, sacroilítis (proceso inflamatorio de las articulaciones sacroilíacas que conectan la parte inferior de la columna vertebral y la pelvis), espondilitis (enfermedad reumática autoinmune crónica con dolores y endurecimiento paulatino de las articulaciones), etc³. En los casos en los que la bacteria se localiza en el cerebro, puede dar lugar a una meningitis, y si lo hace en el corazón a una endocarditis (inflamación del revestimiento interno de las cámaras y válvulas cardíacas); ambas son fatales⁴.

Entre las especies de *Brucella* se considera a *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* como las principales especies patógenas en humanos (el orden en que se nombran coincide con su virulencia en humanos, de mayor a menor)³. Sin embargo, se ha descrito la aparición de infecciones y complicaciones de pacientes infectados con *B. canis* y *B. maris (cetaceae)* con manifestaciones típicas de la brucelosis^{5, 6 7}. En humanos la infección ocurre accidentalmente por consumo de alimentos contaminados (leche o quesos no pasteurizados, o sus subproductos); o por exposición a animales contaminados o muestras de los mismos (sangre, placenta, fetos, secreciones uterinas); o por inhalación de aerosoles de partículas infectadas. En la mayoría de los casos los enfermos contrajeron la infección en su trabajo, por lo que se la considera una enfermedad profesional (de veterinarios, carniceros, personal de frigoríficos, laboratorios, granjeros y ganaderos)³. La transmisión lateral y congénita entre humanos ha sido reportada sólo esporádicamente⁸⁻¹¹. También se conocen casos de contagio por transfusiones sanguíneas y trasplante de médula ósea^{12, 13}.

El ingreso de *Brucella* spp. al organismo ocurre a través de las vías respiratorias o digestivas. Al inicio de la infección *Brucella* se une a las mucosas y penetra a través de ellas, luego atraviesa el epitelio y se

traslada hacia los nódulos linfáticos locales, donde invade neutrófilos y macrófagos. Una vez dentro de los fagocitos las bacterias están protegidas del sistema inmune y proliferan. Cuando el número de bacterias dentro del fagocito es muy elevado (generalmente entre la primer y séptima semana post-exposición), se produce la ruptura de las células eucariotas y las bacterias se liberan a sangre circulante produciéndose una bacteremia. Luego de haber colonizado macrófagos ubicados en ganglios linfáticos y haberse producido la bacteremia, *Brucella* spp. se disemina hacia un gran número de órganos y sistemas; como por ejemplo hígado, bazo, médula ósea, glándulas mamarias, órganos sexuales y glándulas salivales. *Brucella* es capaz de invadir y replicar en fagocitos profesionales¹⁴ como macrófagos al igual que células no fagocíticas^{15, 16}. Trabajos publicados utilizando células en cultivo, demuestran que *Brucella* spp. infecta y replica en macrófagos, células epiteliales HeLa¹⁷, células dendríticas^{18, 19}, fibroblastos (David O'Callaghan comunicación personal) y varios tipos de células epiteliales de pulmón y osteoblastos^{20, 21} (Pablo Baldi, comunicación personal).

El tratamiento de la brucelosis humana no ha sufrido variaciones significativas en los últimos años. El desarrollo de resistencia bacteriana que ha condicionado la problemática terapéutica de muchas enfermedades infecciosas aún no se ha producido en el caso de *Brucella*, aunque se ha informado de incrementos en la resistencia a ciertas sustancias^{22, 23}. Por ahora el problema estriba en la dificultad a la hora de conseguir la erradicación intracelular del microorganismo, por lo que el perfil de los antibióticos idóneos es el que reúne una buena actividad *in vitro*, una adecuada penetración intracelular y una actividad significativa en este medio intracelular. Ningún antibiótico, por sí solo, logra esta erradicación, y por ello se utilizan en combinaciones diversas con efecto sinérgico o aditivo, administradas durante varias semanas para reducir en lo posible la aparición de recaídas. Cuando éstas se presentan, la bacteria mantiene, en principio, una sensibilidad antibiótica idéntica a la del episodio inicial, por lo que puede tratarse nuevamente con una pauta antibiótica similar. Las tetraciclinas son los antibióticos más efectivos y, por ello la base de cualquier combinación terapéutica. Los aminoglucósidos, a pesar de su escasa penetración intracelular, presentan un efecto sinérgico con las tetraciclinas. La combinación de doxiciclina por vía oral durante 6 semanas y un aminoglucósido (estreptomina o gentamicina) por vía intramuscular durante dos semanas es la más activa y considerada el tratamiento clásico y de elección para la enfermedad, con una tasa de recaídas aceptablemente baja²⁴. Rifampicina, norfloxacin y ciprofloxacina son también drogas comúnmente usadas; sin embargo los tratamientos se extienden durante periodos de tiempo largos, y en algunos casos no son efectivos^{15, 25}. En la etapa crónica de la enfermedad la bacteria se halla fuera del alcance de la parte humoral del sistema inmune, y de la mayoría de los antibióticos^{26, 27}, por lo que su erradicación llegado este punto es aún más dificultosa.

Lo antes expuesto indica que, incluso si el desarrollo de múltiples resistencias no es considerado un problema mayor a la hora de tratar la brucelosis, es necesario controlar los patrones de sensibilidad de *Brucella* spp. para asegurar tratamientos apropiados y para prevenir la aparición de cepas resistentes en estas bacterias. La falta de vacunas seguras y efectivas para humanos así como la falta de un tratamiento específico acentúa la importancia de comprender la biología de la brucelosis para poder desarrollar agentes terapéuticos efectivos.

Debido a su potencial epidémico, la falta de vacunas para humanos y la posibilidad de contagio por aerosoles, *Brucella* se clasifica como un patógeno de bioseguridad de nivel 3 y también es considerado

como un potencial agente de bioterrorismo civil y militar^{28, 29}, ubicado entre los agentes de tipo B por el *Center of Disease Control* (CDC, USA).

Brucelosis animal, una enfermedad re-emergente

Brucella spp. constituye el agente causal de la brucelosis en humanos y animales. Las especies animales que pueden ser infectadas son diversas, por ejemplo ganado bovino (*B. abortus*), ovino (*B. ovis*), caprino (*B. melitensis*)³⁰, roedores (*B. neotomae*)³¹, mamíferos marinos como ballenas (*B. pinnipedalis*)³², etc. En particular, el reservorio natural de *B. suis* son los porcinos. La brucelosis (también llamada enfermedad de Bang) como zoonosis provoca en Argentina pérdidas importantes en la producción pecuaria y restricciones sanitarias en el comercio interno y en las exportaciones. Las estimaciones oficiales sobre las pérdidas anuales por brucelosis bovina en América Latina son de aproximadamente US\$ 600 millones³³. Esta enfermedad, junto con la tuberculosis bovina, fueron las principales causas de pérdida de dinero en la ganadería del siglo XX. En animales la enfermedad causa abortos, epididimitis y vesiculitis, nacimiento de terneros débiles, merma en la producción de leche, infertilidad y subfertilidad en vacas y toros, dando lugar a grandes pérdidas económicas³⁴; además de constituir una traba para el comercio nacional e internacional de animales y sus subproductos. En rebaños donde la enfermedad es endémica, luego de la exposición el animal aborta una vez, y las siguientes gestaciones y períodos de lactancia pueden ser aparentemente normales. Sin embargo, la bacteria es excretada en leche y descargas uterinas, lo cual favorece la rápida diseminación de la enfermedad. Hoy en día, la brucelosis pertenece al grupo de las zoonosis más dispersas alrededor del mundo, siendo catalogada como enfermedad reemergente. A pesar de las intensas campañas de vacunación para erradicar la brucelosis en el ganado, hoy en día sigue siendo una enfermedad endémica en ciertas áreas de los EE.UU., en países asiáticos y en América Latina³⁵.

En la población bovina la inmunidad se logra con el uso de vacunas. En el caso de las terneras es obligatoria la vacunación de las mismas entre los 3 y 8 meses de edad con la vacuna *Brucella abortus* Cepa 19 y en el caso de animales adultos sin vacunar, como ocurre con la mayoría de los rodeos en Argentina, se puede usar la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51 (ambas son cepas atenuadas que no pueden usarse en humanos). Ambas vacunas inducen una fuerte respuesta celular de defensa inmunológica, y por la naturaleza del patógeno, este tipo de respuesta es mucho más efectiva que lo que serían las vacunas compuestas por bacterias muertas, que inducirían una respuesta humoral. En algunos países el uso de estas vacunas no está aún aprobado.

En Argentina, si bien la vacunación del ganado bovino fue intensa, no se ha logrado la eliminación de otras especies de *Brucella* capaces de infectar ganado porcino, caprino y ovino³; por lo que la brucelosis se ha convertido en una patología que re-emerge en forma continua. La aparición de esta patología en humanos se asocia a la enfermedad en el ganado. Para lograr un adecuado control de la enfermedad en el hombre es fundamental el desarrollo de programas de vacunación del ganado. Asimismo, la vigilancia epidemiológica en la población expuesta es fundamental, ya que un diagnóstico temprano permite una rápida mejoría, que evita las complicaciones secundarias asociadas a la cronicidad de la enfermedad.

Las medidas de control se basan en la prevención de los factores de riesgo. La vigilancia es entonces un elemento clave para el manejo de los programas de prevención y control³⁶.

Brucella spp. Características del género y factores de virulencia

Brucella es un patógeno intracelular facultativo que penetra a través de las mucosas³⁷. Un aspecto clave en la virulencia de este género es su habilidad de entrar y sobrevivir dentro de células fagocíticas y no fagocíticas³⁸. Para lograrlo hace uso de una estrategia única en la que modifica el proceso de maduración de los fagosomas, creando un nuevo nicho intracelular en el que se multiplica^{39, 40}. En contraste con otros patógenos, no se han descrito factores de virulencia clásicos en *Brucella*, como exotoxinas, fimbrias, flagelos, fagos lisogénicos, plásmidos, lipopolisacárido endotóxico, inductores apoptóticos, etc.⁴¹ Y, comparando con otros patógenos intracelulares muy estudiados como *Salmonella*, es muy poco lo que se conoce sobre su genética.

Brucella pertenece, según su secuencia de ARN 16s, al subgrupo $\alpha 2$ de Proteobacterias, del que también forman parte *Agrobacterium* y *Rhizobium*⁴² (ver fig.1). Estos microorganismos, al igual que *Brucella*, tienen la habilidad o el requerimiento de vivir en asociación con células eucariotas. La secuenciación completa del genoma de *Brucella*⁴³ reveló grandes similitudes en transporte, capacidades metabólicas y estructura genómica con estas bacterias del suelo. El género *Brucella* comprende nueve especies de pequeños cocobacilos Gram negativos. La comparación de los genomas de las distintas especies del género *Brucella* secuenciados hasta el momento muestra una conservación de más del 98%⁴⁴ entre ellos. En base al alto nivel de conservación génica se propuso que el género sería monoespecífico, denominado *Brucella melitensis*, y que el resto de las especies pertenecerían a biovariedades o cepas de la misma^{28, 44-46}. Sin embargo, esta teoría entra en conflicto con la hipótesis de la supuesta evolución a partir del aislamiento dado por las distintas preferencias de hospedador⁴¹. En función del hospedador de preferencia, características antigénicas y bioquímicas se definieron las distintas especies que componen al género⁴⁴. Hasta el momento, el género está compuesto por: *Brucella melitensis*³⁰, *Brucella abortus*^{4, 28}, *Brucella suis*⁴³, *Brucella neotomae*^{31, 47}, *Brucella ovis*⁴⁸, *Brucella canis*⁴⁹⁵⁰, *Brucella pinnipedialis*³², *Brucella cetaceae*⁵¹, y una última especie sugerida recientemente, denominada *Brucella microtti*⁵². Las especies animales que pueden infectar son diversas, abarcando desde ganado bovino (*abortus*), ovino (*ovis*), porcino (*suis*), caprino (*melitensis*), hasta roedores (*neotomae* y *microtti*) y mamíferos marinos como ballenas y delfines (*pinnipedialis*, *cetaceae*). Algunas especies de *Brucella* poseen un único hospedador mamífero, mientras que en general si bien cada especie tiene un hospedador de preferencia, es capaz de infectar otros²⁸.

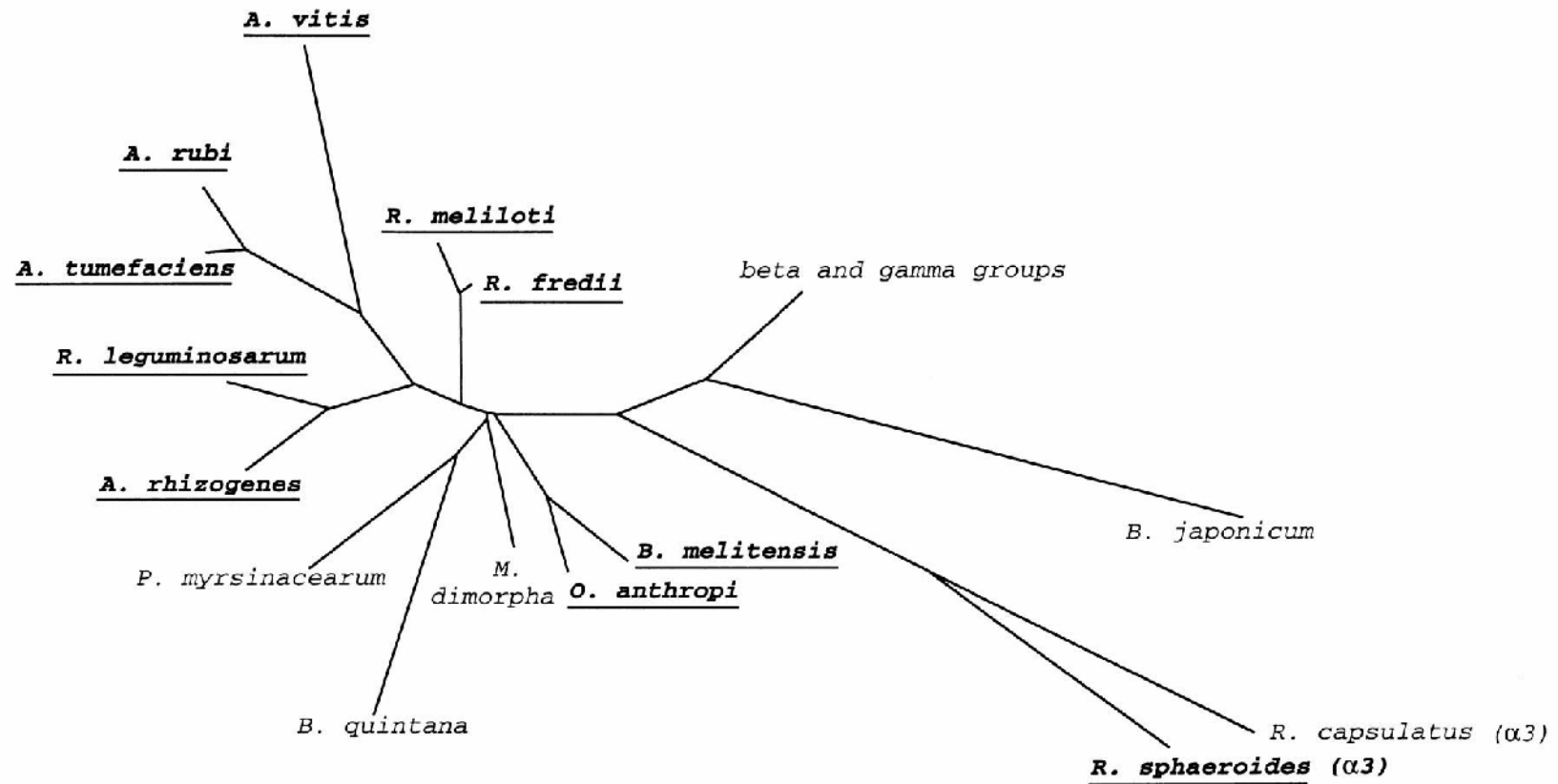


Fig.1: árbol filogenético de los microorganismos pertenecientes al subgrupo $\alpha 2$ de Proteobacterias . (También están presentes las especies Rhodobacter , que pertenecen al subgrupo $\alpha 3$). Los organismos con genomas complejos (más de un cromosoma) se muestran subrayados y en negrita . (Jumas-Bilak et al. 1998).

Los estudios sobre *Brucella* se han enfocado primordialmente en la identificación de factores que afectan el tráfico intracelular y la multiplicación de la bacteria en el interior de la célula. Y, aunque la información sobre estos aspectos de su virulencia se ha incrementado notablemente en los últimos 10 años, existen otras facetas de la infección que permanecen prácticamente inexploradas. Entre los factores de virulencia de *Brucella*, implicados en la supervivencia intracelular del patógeno, se ha identificado un sistema de secreción de tipo IV (VirB) similar al que transloca el T-DNA desde *Agrobacterium* a la célula de la planta^{53, 54}; sus sustratos aún no se han encontrado, pero se sabe que su presencia es esencial para la supervivencia y la multiplicación intracelular, ya que controla la maduración de la vacuola que contiene a *Brucella* en una organela en la cual la bacteria puede replicar⁵³. Marchesini y col. están trabajando en la identificación de efectores, y han encontrado algunas proteínas que requieren que el sistema VirB esté intacto en la membrana de *Brucella abortus* para su localización extracelular⁵⁵. Por otro lado *Brucella*, como *Agrobacterium* y *Rhizobium*, produce glucanos cíclicos β 1-2, y la biosíntesis de estas moléculas procede de la misma manera en las tres bacterias^{56, 57}. La sintetasa de estos glucanos está codificada en el gen *cgs* en *B. abortus*. En *Rhizobium* los glucanos cíclicos son necesarios en la fijación simbiótica de Nitrógeno, luego de la formación del nódulo. En *Brucella* se ha visto que los glucanos 1-2 cíclicos ayudan a prevenir la fusión fagosoma-lisosoma, permitiendo la replicación intracelular bacteriana⁵⁸ por lo que las mutantes *cgs* muestran una virulencia reducida en diversos modelos⁵⁹. La supervivencia en el interior de la célula también sería dependiente de un sistema de dos componentes (BvrR/BvrS), que regularía la expresión y presencia de ciertas proteínas en la membrana externa de la bacteria⁶⁰. BvrR-BvrS⁶¹ de *Brucella* es muy similar al sistema ChvG-ChvI⁶² de *Agrobacterium tumefaciens* y al ExoS-ChvI⁶³ de *S. meliloti*, estos sistemas de dos componentes son equivalentes al sistema PhoP-PhoQ de *Salmonella* y al BvgA-BvgS de *Bordetella bronchiseptica*.

La presencia o ausencia de la cadena O del lipopolisacárido (LPS) en la membrana externa es un carácter taxonómico, y lleva a la clasificación de las cepas de *Brucella* en lisas o rugosas. Se ha observado que la presencia de la cadena-O protege a la bacteria del fagolisosoma e inhibe la apoptosis de la célula hospedadora⁶⁴. Una gran cantidad de trabajos publicados indican que las cepas rugosas son incapaces de subsistir en ratones y que tampoco pueden replicar en los modelos celulares de macrófagos J774 *in vitro*, con lo cual parecerían ser no infectivas^{65, 66}. Otros autores han demostrado que las cepas rugosas presentan una adhesión aumentada a otros modelos celulares no clásicos, pero esta mayor adhesión no implica una mayor virulencia²⁰. Sin embargo, las cepas naturalmente rugosas de *B. canis* y *B. ovis* han demostrado ser infectivas en sus hospedadores naturales, incluso *B. canis* ha demostrado ser virulenta en humanos⁶⁷.

Por último, se describió también en *B. abortus* que PrpA, una prolina racemasa, es un mitógeno que induce la activación policlonal de linfocitos B (T-independiente). Esta proteína es, además, capaz de inducir la producción de IL-10 en esplenocitos estimulados. Estas características la vuelven necesaria para el establecimiento de una infección crónica y para la supresión inmune temprana⁶⁸.

Hasta el momento no se conocen receptores proteicos específicos para la interacción de *Brucella* con la célula hospedadora. Las interacciones *Brucella*-célula eucariota descritas indican que el contacto es dependiente de residuos de ácido siálico presentes en las membranas de células macrofágicas, epiteliales y en eritrocitos humanos^{69, 70}. El proceso de internalización de *Brucella* a células no fagocíticas

involucra seguramente algún receptor general, ya que es capaz de invadir un amplio rango de tejidos⁶¹. Castañeda-Roldán y col.⁶⁹ investigaron las propiedades de adherencia de *Brucella* spp. a células epiteliales y macrófagos, y demostraron que *B. abortus* y *B. melitensis* son capaces de unirse a estas células con una cinética característica. La adherencia de estas cepas sería dependiente de receptores sobre las células con residuos de ácido siálico y sulfato. Algunas proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, colágeno y vitronectina podrían actuar como puente en las etapas de adhesión⁶⁹. En el año 2006 se describió por primera vez una proteína asociada con la adhesión e invasión a células epiteliales del hospedador, denominada SP41. Esta proteína de *Brucella abortus*, codificada en el gen *upgB*, posee alta similitud con un transportador de glicerol-3-fosfato de tipo ABC⁷¹. Los autores demostraron que SP41 se halla presente en la membrana externa de la bacteria, y que contribuye a la adhesión e invasión de las células del hospedador. Sin embargo, las mutantes en el gen *upgB* aún son capaces de adherirse a los tejidos del hospedador, quedando claro que existen otros genes de *Brucella* que codifican moléculas de adhesión⁷¹.

Una vez en contacto con la membrana celular las bacterias adheridas se acumulan, formando microcolonias⁶⁹. Posteriormente estas bacterias ingresan a la célula en un macropinosoma. En este proceso es necesaria la presencia de *lipid rafts* (o balsas lipídicas) ricos en GM1 y colesterol⁷². Una vez dentro de la célula, *Brucella* se localiza en una vacuola denominada BCV (por las siglas en inglés de *Brucella containing vacuole*); en este estadio, la activación de la V⁺-ATPasa celular que disminuye el pH de la BCV es esencial para la activación de los genes de virulencia de *Brucella* spp.⁶⁶. La BCV redirecciona la vía fagocítica normal inhibiendo la interacción con fagosomas tardíos y fagolisosomas para formar una BCV multimembranosa, con marcadores de retículo endoplásmico y ausencia de los marcadores lisosomales típicos como LAMP-1, donde ocurre la replicación de las bacterias^{54, 73, 74}. De esta forma, *Brucella* evade los mecanismos naturales que tiene la célula para lidiar con los patógenos, y logra establecerse en su nicho replicativo (ver esquema en fig.2). En esta vida intracelular, juegan un rol preponderante todos los factores de virulencia antes descritos.

Si bien las distintas cepas de *Brucella* son capaces de alterar activamente el tráfico intracelular de vacuolas en la célula hospedadora, y evitar la inducción de una respuesta inflamatoria a gran escala, estas bacterias se encuentran con formidables fuentes ambientales de estrés durante su interacción con las defensas del hospedador. Los mecanismos que permiten superar este estrés y detoxificar a la célula bacteriana de las agresiones sufridas han sido poco estudiados. Hasta el momento sólo se ha caracterizado en *Brucella melitensis* un transportador de expulsión (NorMI) que pertenece a la superfamilia MATE, formado por una proteína integral de membrana interna que funciona como *antiporter* de Na⁺⁷⁵. La sobreexpresión de este transportador en una cepa hipersensible de *E. coli* confiere resistencia a norfloxacin, ciprofloxacina, gentamicina, acriflavina y berberina⁷⁵. Los autores proponen que esta proteína es un posible factor de virulencia en *Brucella*, y demuestran que la resistencia a drogas conferida por este sistema es producto de un eflujo activo de moléculas. Recientemente nuestro grupo de trabajo describió que *B. suis* alberga sistemas de eflujo del tipo RND, dependientes de la proteína BepC, presente en la membrana externa de la bacteria, que contribuirían a la detoxificación de la bacteria y a su virulencia^{76, 77}.

Si se tienen en cuenta las características particulares de *Brucella* como patógeno, no es sorprendente que se hayan identificado relativamente pocos factores de virulencia tradicionales. En cambio, se podría argumentar que la mayoría de los genes descritos como factores de virulencia “no-clásicos” son los requeridos para una adaptación fisiológica a las condiciones ambientales que la bacteria encuentra al ingresar al organismo del hospedador y en su nicho replicativo.

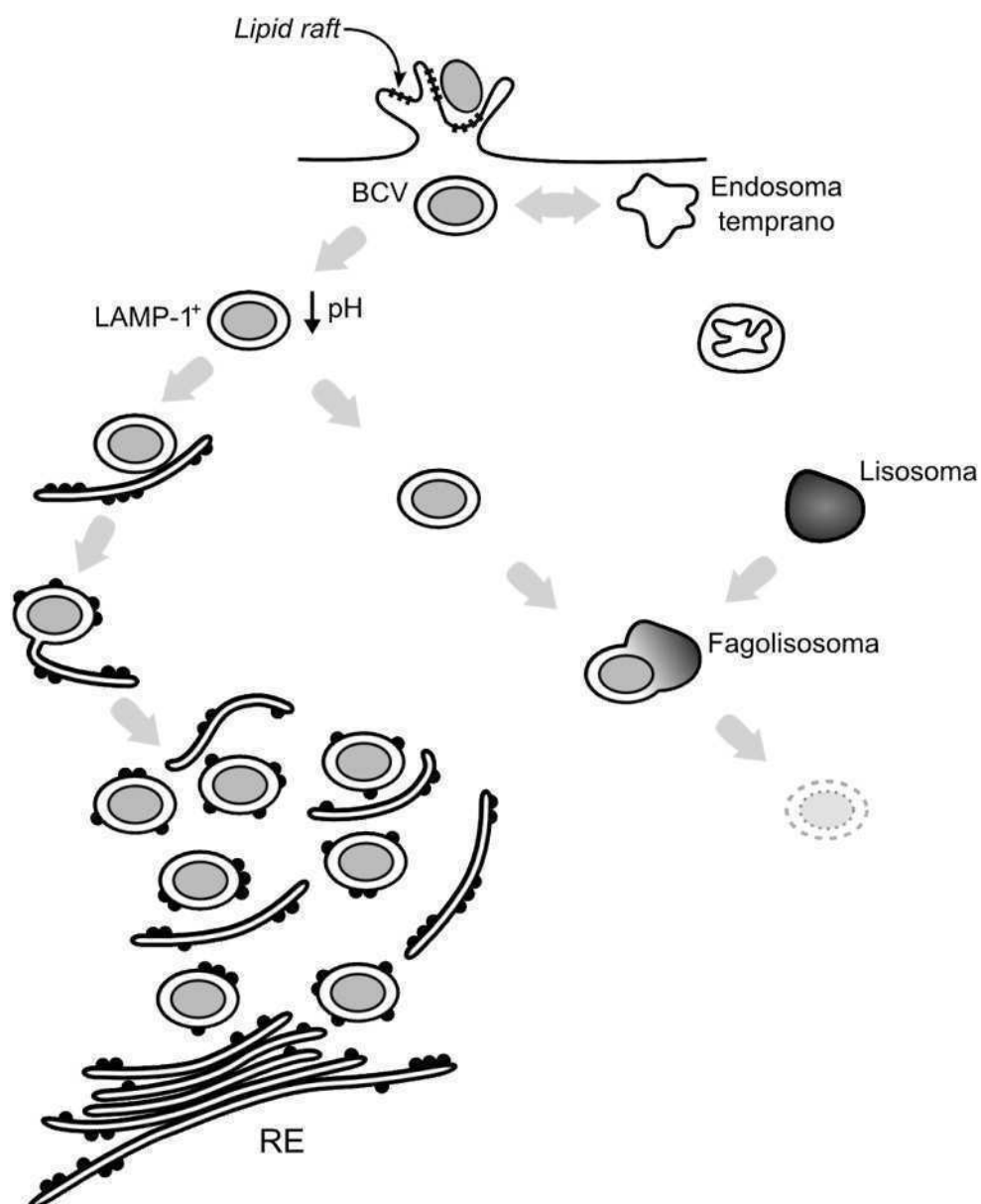


Fig.2: modelo de replicación intracelular para *Brucella* spp. Las bacterias interactúan con *lipid rafts* celulares para ingresar a la célula. En el interior, las bacterias se localizan adentro de vacuolas que las contienen denominadas BCV. En etapas tempranas esta vacuola posee marcadores como LAMP-1. La interacción de la vacuola con fagosomas tardíos y fagolisosomas se ve inhibida. Luego la BCV madura y adquiere marcadores de retículo endoplasmático. Esta nueva organela es el nicho replicativo de *Brucella*. Si el proceso de maduración de los fagosomas no puede ser modificado, como ocurre con algunas mutantes, las bacterias son eliminadas.

Sistemas de transporte bacterianos

El transporte de moléculas desde y hacia el citoplasma es necesario en numerosos aspectos del ciclo de vida bacteriano, incluyendo la biogénesis de organelas, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia. Los organismos Gram-positivos y negativos enfrentan desafíos diferentes, en Gram-negativos los sustratos secretados deben atravesar el periplasma y la membrana externa, además de la interna. En bacterias patógenas el transporte de moléculas desde el citoplasma es crucial en la interacción con su hospedador, ya sea para la secreción de efectores (como toxinas, adhesinas, etc), o para el eflujo de compuestos tóxicos. Hasta el momento, han sido descritos en bacterias Gram-negativas seis tipos diferentes de sistemas de secreción de proteínas y cinco sistemas de eflujo, ocupados de la secreción de macromoléculas al medio extracelular y de la eliminación de pequeñas moléculas provenientes del metabolismo celular o del medio ambiente. A continuación se describen algunos de los sistemas de eflujo bacterianos, haciéndose particular énfasis en los sistemas tripartitos. Además, en una de las próximas secciones se describen en detalle los sistemas de secreción de proteínas de tipo V, también conocidos como “autotransportadores”, en su rol como transportadores de factores de virulencia.

Sistemas de eflujo

Las bacterias han desarrollado muchos mecanismos diferentes de resistencia, como estrategias alternativas o conjuntas, en su lucha contra los antimicrobianos: por ejemplo, las drogas pueden ser inactivadas antes de llegar a su blanco como sucede con los antibióticos β -lactámicos, que son hidrolizados por enzimas β -lactamasas bacterianas. Alternativamente, el blanco del antibiótico puede ser modificado como sucede con las bacterias vancomicina-resistentes, que sustituyen D-lactato por D-alanina en las cadenas peptídicas unidas al ácido acetilmurámico, previniendo la unión de la vancomicina⁷⁸. Otra estrategia general consiste en prevenir la acumulación de la droga en el interior celular; mediante un sistema de transporte se expulsan las drogas fuera de la célula, reduciendo su concentración intracelular a niveles subtóxicos. Actualmente se reconocen cinco superfamilias de sistemas de eflujo, denominadas ABC, MFS, RND, MATE y SMR (fig.3). Entre ellas, las proteínas de las familias ABC, RND y MFS suelen formar parte de sistemas de transporte tripartitos, junto a otras dos proteínas de membrana. Estos sistemas de extrusión son los más eficientes, pudiendo captar y eliminar compuestos tóxicos en un único paso concertado, sin intermediarios periplasmáticos. A pesar de que el descubrimiento de estos mecanismos de transporte es aún reciente, se ha avanzado mucho en la caracterización de estos sistemas gracias a la secuenciación de los genomas de diversos organismos.

Las bacterias Gram-negativas se caracterizan por ser intrínsecamente más resistentes a los antimicrobianos que las Gram-positivas. Tradicionalmente, esta elevada resistencia se atribuía a la presencia de la membrana externa, que actúa como barrera física, retardando los mecanismos de

difusión. Sin embargo, este mecanismo por sí solo no sería capaz de impedir la entrada de un rango tan amplio de antimicrobianos, por lo que los valores elevados de resistencia a distintos compuestos tóxicos no pueden ser explicados únicamente en base a la baja permeabilidad⁷⁹.

En los años 80s se caracterizó la glucoproteína P de células de mamífero, esta proteína es una bomba de eflujo que otorga resistencia a numerosos compuestos, incluyendo agentes quimioterapéuticos, mediante un mecanismo de transporte activo acoplado a la hidrólisis de ATP⁸⁰. Este fue el primer sistema de eflujo descrito⁸¹. Hacia fines de los años 80s y principio de los 90s se descubrió que los mismos mecanismos que en células eucariotas son capaces de conferir resistencia a la terapia anticancerígena están presentes en procariontas⁸².

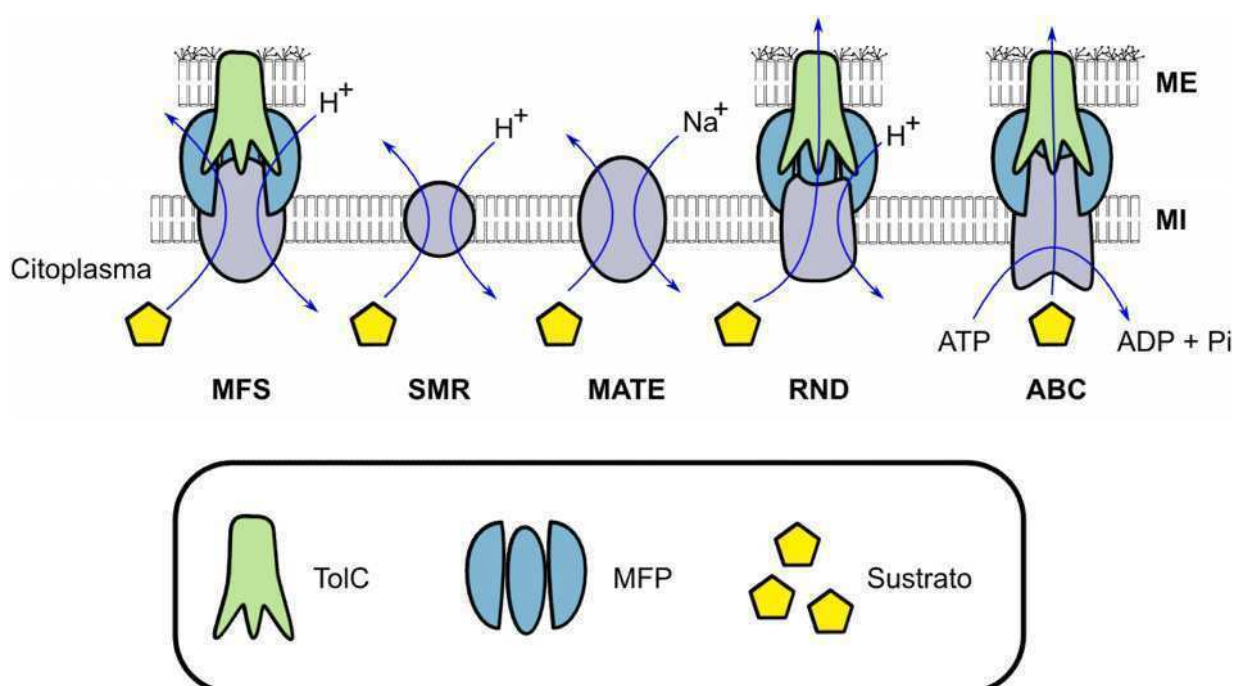


Fig.3: esquemas representativos de las cinco superfamilias de transportadores caracterizadas. ABC, RND y MFS pueden formar parte de sistemas tripartitos de transporte, junto a otras dos proteínas. Una de ellas pertenece a la familia MFP y la otra a la familia denominada OMF o TolC. En estos sistemas los sustratos son enviados al medio extracelular en un único paso. Los ABC son transportadores primarios, mientras que RND, MFS, SMR y MATE son transportadores secundarios que emplean cationes como contraiones. ME: membrana externa. MI: membrana interna

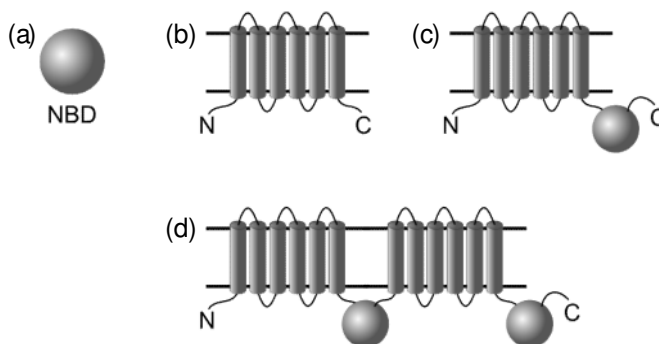
Transportadores de la superfamilia ABC (ATP-Binding Cassette)

La superfamilia de transportadores ABC incluye miembros encargados de la eliminación (eflujo) y de la incorporación de sustratos. Existen docenas de familias diferentes, clasificadas de acuerdo a su especificidad de sustrato. La fuente de energía para el proceso de transporte es, en todos los casos, la

hidrólisis de ATP, por lo que estos transportadores son definidos como “transportadores primarios”. El sistema en su menor expresión está formado por dos dominios transmembrana (que forman un canal en la membrana interna) y dos dominios ABC encargados de la hidrólisis de ATP. Estos cuatro dominios están, a veces, codificados en una única proteína. En procariotas es común encontrar hemi-transportadores (poseen un dominio de cada tipo), que dimerizan para formar un sistema funcional; o cada dominio codificado en una unidad separada, que luego se ensambla formando un complejo proteico (ver fig.4). Los dominios ABC, también conocidos como dominios NBD (por *Nucleotide Binding Domain*), se caracterizan por la presencia de los motivos Walker A (GXXGXGKS/T), Walker B (hhhhD) y un dominio “signature” ABC (LSGGQ) característico de las ATPasas implicadas en transporte^{83, 84}. Esta familia de proteínas en bacterias se encuentra implicada en la incorporación de nutrientes como aminoácidos, péptidos, iones inorgánicos y vitaminas, como también en la secreción de polisacáridos, proteínas, péptidos y compuestos tóxicos. Se han encontrado transportadores de esta superfamilia tanto en eucariotas (desde hongos y protozoos hasta plantas y humanos) como en procariotas (arqueas y bacterias). En bacterias Gram-positivas estos transportadores median gran parte de la resistencia a drogas. El primer sistema caracterizado fue LmrA de *Lactococcus lactis*, capaz de expulsar aminoglicósidos, macrólidos, quinolonas, tetraciclinas, etc.^{85, 86}. Sorprendentemente, en Gram-negativas sólo se han identificado unos pocos transportadores ABC dedicados al eflujo de drogas^{87, 88}. El primero de ellos fue la proteína MsbA, responsable del transporte del lípido A hacia la membrana externa de *E. coli*⁸⁹. En nuestro grupo, el Dr. F. Martín identificó un transportador de la superfamilia ABC, denominado BepB, en el genoma de *B. suis*. Su caracterización demostró que este transportador está involucrado en el eflujo de compuestos tóxicos como cloramfenicol, eritromicina, rodamina 6G, norfloxacina, ácido nalidíxico, acriflavina, bromuro de etidio, berberina y CTAB (resultados no publicados). Esta descripción constituye la primera caracterización de un transportador de este tipo en el grupo de la alfa-proteobacterias.

En bacterias Gram-negativas otras familias de transportadores son también relevantes en el eflujo de compuestos tóxicos; en la próxima sección se describen los sistemas de tipo RND.

Fig.4: modelos de transportadores ABC. a) NBD: dominio de unión a nucleótidos. b) TMD: dominio transmembrana. c) Hemi-transportador, por ejemplo LmrA de *L. lactis* o Tap1 de *H. sapiens*. d) Transportador completo formado por una única proteína, por ejemplo pfMDR1 de *P. falciparum* o MDR1 de *H. sapiens*. La parte superior de cada modelo representa el medio extracelular o el lumen de un compartimiento celular, dependiendo del caso.



Transportadores de la superfamilia RND (Resistance/ Nodulation/ Division)

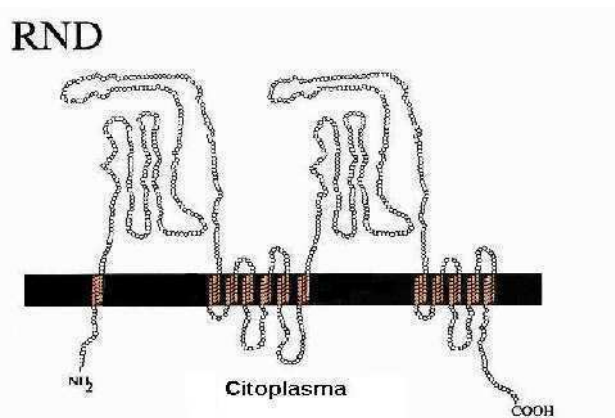


Fig.5: representación esquemática de un miembro típico de la familia RND. Cada transportador posee doce pasos transmembrana y dos grandes dominios extracitoplasmáticos, el primero de ellos ubicado entre los pasos 1 y 2 y el segundo entre los pasos 7 y 8.

Los miembros caracterizados de esta superfamilia catalizan el eflujo de sustratos desde el citoplasma, intercambiando moléculas por iones H^+ , por lo que se los conoce como “transportadores secundarios”. Se hallan presentes en bacterias, arqueas y eucariotas. En bacterias Gram negativas los transportadores secundarios son los principales responsables del fenómeno MDR (por *Multiple Drug Resistance*), por eflujo de múltiples drogas^{90, 91}. Existen tres familias de transportadores RND que son exclusivas de bacterias Gram-negativas, clasificadas de acuerdo a su especificidad de sustrato: diversas drogas (el ejemplo más conocido es

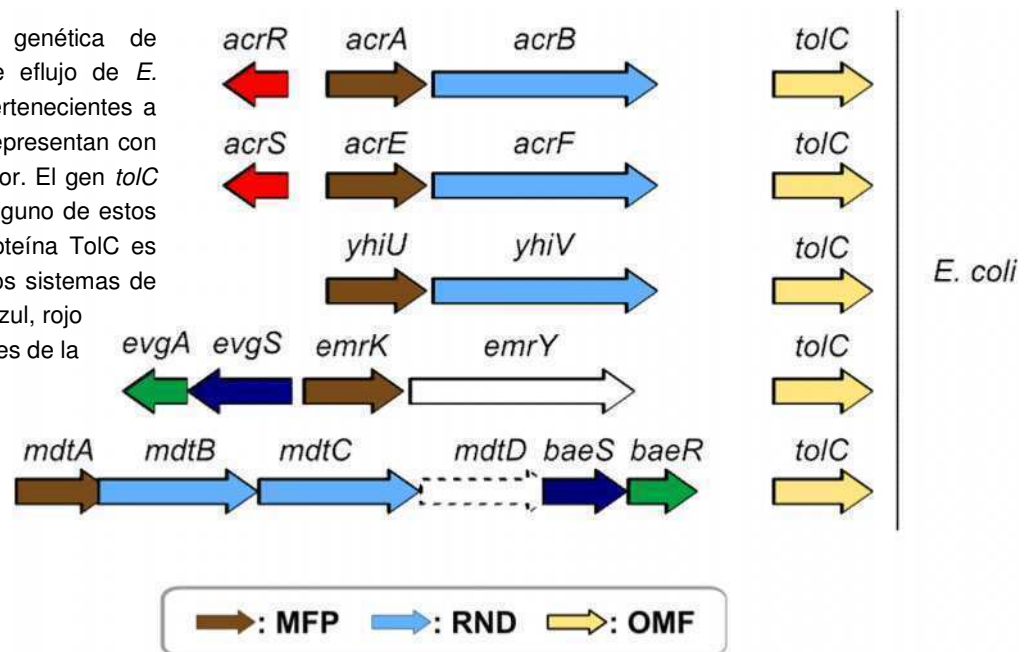
AcrB de *E. Coli*), lipooligosacáridos o metales pesados (por ejemplo CzcA⁹² de *Alcaligenes eutrophus*, recientemente renombrada como *Ralstonia eutrophus*). En la mayoría de los casos las permeasas RND poseen largas cadenas polipeptídicas que pueden alcanzar los 1300 aminoácidos de longitud y cuentan con doce pasos transmembrana y dos grandes *loops* periplasmáticos organizados de forma característica (fig.5). Se propone que los genes que codifican estas proteínas sufrieron una duplicación intragénica en tandem, debido a que la primera mitad de la cadena polipeptídica es muy similar a la segunda mitad⁹³, de hecho, existen algunos miembros que no poseen la duplicación interna (un homólogo de *M. Jannaschii*). Algunos ejemplos de transportadores RND bien caracterizados son AcrF⁹⁴, AcrB⁹⁴, MdtB⁹⁵ y MdtC⁹⁵ de *E.coli* (la proteína AcrB incluso fue cristalizada en el año 2002⁹⁶), MtrD⁹⁷ y FarB⁹⁸ de *N. gonorrhoeae*, MexB⁹⁹ y MexF¹⁰⁰ de *P. aeruginosa* entre otros; sin embargo, la descripción de transportadores RND en α -proteobacterias también es escasa. Hasta el momento sólo dos bombas de eflujo capaces de transportar compuestos tóxicos, AmeAB-AmeC e lfeAB, fueron identificadas en *Agrobacterium tumefaciens*, y otros dos sistemas RND fueron identificados en *B. suis*, también por el Dr. F. Martín⁷⁷.

El estudio de los transportadores de la familia RND estuvo siempre orientado al tipo de moléculas que son capaces de transportar, haciendo un fuerte hincapié en los compuestos con actividad antimicrobiana. Si bien esto tiene una gran importancia en la clínica, es necesario recordar siempre que los antibióticos no son los sustratos naturales de estas bombas de eflujo, y que la capacidad de transporte de los antimicrobianos está dada por la plasticidad de las bombas de eflujo al momento de reconocer los sustratos a transportar. En algunos pocos casos se han logrado identificar los sustratos naturales de los transportadores, como por ejemplo en los sistemas lfeAB de *A. tumefaciens* y AcrAB de *Erwinia amylovora*: las bombas de eflujo de ambos patógenos reconocen y transportan fitoalexinas (alcaloides, isoprenoides y flavonoides) secretadas por el hospedador como mecanismo de defensa^{101, 102}.

Las evidencias publicadas hasta el momento permiten confirmar que las bombas de eflujo de la familia RND son responsables del eflujo de moléculas endógenas y del medio ambiente, otorgando a la bacteria una ventaja evolutiva respecto de otros microorganismos.

Los transportadores de esta familia funcionan en conjunción con otros dos componentes: una proteína de la membrana externa (OMF: *Outer Membrane Factor*) y una proteína accesoria o de fusión de membranas (MFP: *Membrane Fusion Protein*), es decir, que están organizados de manera muy similar a los sistemas ABC antes descritos, y a los sistemas de secreción de proteínas de tipo I. En este caso, los sustratos a ser eliminados también son transportados a través de ambas membranas en un único paso concertado. A semejanza de los sistemas de secreción de proteínas de tipo I, los genes correspondientes a dos de los componentes (ABC/RND y MFP) se hallan generalmente codificados en un operón, mientras que la proteína de la membrana externa puede transcribirse de forma independiente (fig.6).

Fig.6: organización genética de diversos sistemas de eflujo de *E. coli*. Las proteínas pertenecientes a la misma familia se representan con flechas del mismo color. El gen *tolC* no forma parte de ninguno de estos operones, pero la proteína TolC es el OMF de todos estos sistemas de eflujo. Los genes en azul, rojo y verde son reguladores de la expresión del sistema.



Otros transportadores secundarios: superfamilias MFS, SMR y MATE

Los transportadores MFS (*Major Facilitator Superfamily*) constituyen una gran superfamilia que incluye miles de miembros identificados por secuenciación. Son proteínas únicas, de alto peso molecular, que funcionan como simportadores (soluto:cación, H⁺ o Na⁺), antiportadores (soluto: H⁺) o uniportadores de diversos sustratos. Están involucrados en la resistencia a drogas, la incorporación de azúcares a la célula, la incorporación de intermediarios del ciclo de Krebs, el antitransporte de fosfato ester/fosfato y en el transporte de aminoácidos, nucleósidos, osmolitos, neurotransmisores, aniones

orgánicos e inorgánicos y péptidos, etc.¹⁰³. Se encuentran presentes en eucariotas, bacterias (tanto Gram-positivas como negativas) y arqueas. La mayor parte de estas proteínas pueden ser divididas en dos grupos, de acuerdo a su estructura: de doce pasos transmembrana o de catorce pasos transmembrana. Algunos ejemplos pueden ser QacA de *Staphylococcus aureus*, encargada del transporte de drogas y cationes orgánicos, o los transportadores vesiculares de monoaminas (los neurotransmisores dopamina, adrenalina, etc.) de eucariotas superiores VMAT1 y VMAT2, respectivamente. En bacterias Gram negativas, estos transportadores también forman sistemas de eflujo tripartitos, interactuando con proteínas de la familia MFP en la membrana interna y con miembros de los OMF en la membrana externa para el transporte de sustratos.

Los transportadores más pequeños pertenecen a la superfamilia SMR (*Small Multidrug Resistance*); típicamente poseen alrededor de 110 aminoácidos de longitud, con cuatro pasos transmembrana. En la membrana se hallan presentes en forma de dímeros o trímeros¹⁰⁴ que, acoplados al potencial de membrana, expulsan antimicrobianos y detergentes, entre otros compuestos. El primer transportador descrito de esta superfamilia fue Smr de *S. aureus*, codificado en un plásmido conjugativo de un aislamiento clínico, capaz de conferir resistencia a una gran variedad de cationes orgánicos, incluyendo compuestos de amonio cuaternario, bromuro de etidio, etc.¹⁰⁵. Hasta ahora, este tipo de transportadores sólo se han encontrado en bacterias. En Gram negativas, el ejemplo clásico es EmrE de *E. coli*^{106, 107}, que cataliza la eliminación de compuestos como acriflavina, tetraciclina y eritromicina¹⁰⁸.

Por último, tenemos a la familia de transportadores MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*). Se han encontrado proteínas de esta superfamilia de transportadores en bacterias, levaduras y plantas. Los miembros bacterianos poseen alrededor de 450 aminoácidos que conforman doce pasos transmembrana¹⁰⁹, en levaduras las proteínas también cuentan con doce pasos transmembrana, pero alcanzan los 700 residuos. Existen docenas de transportadores de esta familia secuenciados, que aún no han sido caracterizados funcionalmente. En bacterias, los miembros caracterizados funcionan intercambiando moléculas de sustrato por iones Na⁺. Entre ellos están NorM de *Vibrio parahaemolyticus*¹¹⁰ y sus homólogos, YdhE identificado en *E. coli*¹¹¹, y NorMI y NorMII identificados en *Brucella*⁷⁵. Aunque el número de sustratos no es idéntico para todos los homólogos, en general, estas proteínas confieren resistencia a ciertas quinolonas, gentamicina, kanamicina y estreptomina^{75, 111}. Algunos autores especulan que esta familia de transportadores podría tener una función en la eliminación de subproductos metabólicos¹⁰³.

Como ya mencionamos, todos estos transportadores secundarios utilizan el gradiente electroquímico de sodio o protones para obtener la energía necesaria para el transporte de sustratos; y, en conjunto son los principales responsables de los fenómenos MDR (por *Multiple Drug Resistance*) por eflujo de múltiples drogas, en diversos microorganismos.

Tres de los sistemas de eflujo antes descritos son capaces de interactuar con proteínas accesorias del tipo MFP y OMF: los transportadores ABC, los MFS y los RND, dando lugar a sistemas tripartitos. Los ejemplos más conocidos de esta interacción son los sistemas AcrAB-TolC (RND-MFP-OMF), EmrAB-TolC¹¹² (MFS-MFP-OMF) y MacAB-TolC⁸⁸ (ABC-MFP-OMF), todos de *E. coli*. Puede llamar la atención que la proteína de la membrana externa sea la misma para estos tres sistemas distintos, más si tenemos en cuenta que TolC de *E. coli* también forma parte del sistema de secreción de

proteínas de tipo I encargado de la secreción de α -hemolisina y de los sistemas de eflujo mostrados en la fig.6. En la siguiente sección se discuten los diversos roles de esta proteína multifuncional.

TolC

Los sistemas de secreción de proteínas de tipo I y, como vimos, las bombas de eflujo de drogas ABC, MFS y RND están formados por tres componentes, uno de ellos se halla embebido en la membrana externa y pertenece a la familia OMF; el paradigma de estructura y función para estas proteínas es TolC de *Escherichia coli* (fig.7).

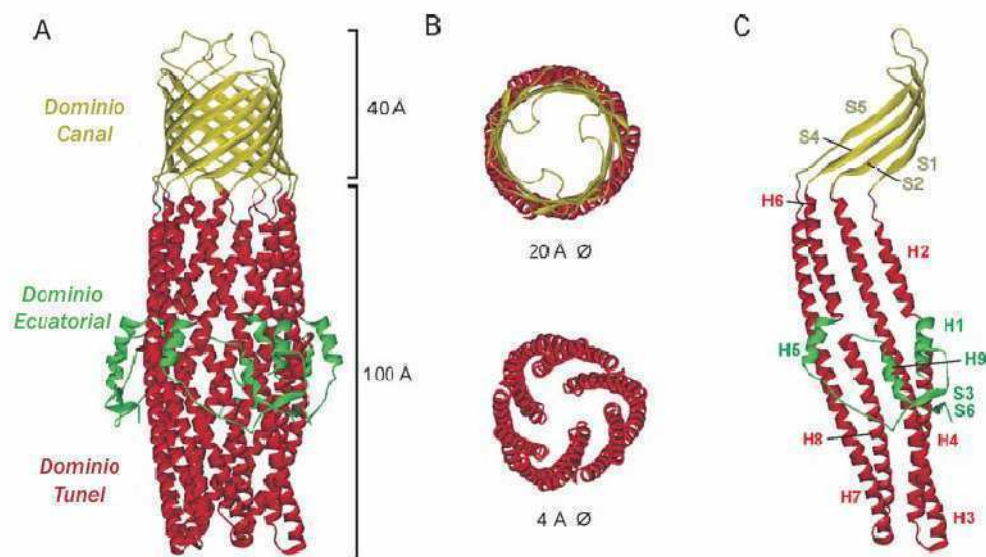


Fig.7 A-C: estructura tridimensional de la proteína TolC de *E. coli*. **A:** la proteína consiste en un trímero, en donde las subunidades se ensamblan dando lugar a una estructura tipo canal-tunel, que cuenta con tres dominios, el canal, el tunel y el dominio ecuatorial. **B:** vistas de la proteína desde arriba (arriba) y abajo (abajo) del dominio ecuatorial, se dan las medidas del diámetro interno del poro. **C:** estructura del monómero de TolC, en donde puede observarse la duplicación en su estructura. (Koronakis et al, 2000).

En todos los genomas secuenciados de bacterias Gram negativas se ha identificado al menos un homólogo de TolC¹¹³. En algunos casos como los de *E. coli*, *Brucella*⁷⁶, *Legionella*¹¹⁴, etc. existe una única proteína de esta familia; en cambio, en otros genomas, como por ejemplo el de *Francisella tularensis*¹¹⁵ o *Rhizobium leguminosarum*¹¹⁶, se encuentran entre dos a cinco homólogos con alta identidad.

En *E. coli*, el gen *tolC* no se halla ligado a ningún operón de transporte, en cambio, forma parte del regulón mar-sox¹¹⁷, que responde a condiciones de stress, induciendo la expresión de varios genes. La participación de TolC en la secreción de la α -hemolisina fue descrita en 1990¹¹⁸ y luego se descubrió que es capaz de interactuar también con diversos sistemas de eflujo (RND-MFP o MFS-MFP), en la

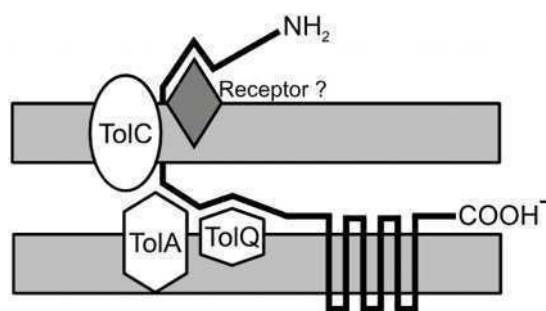


Fig.8: modelo propuesto para la inserción de la colicina E1 (ColE1) en la membrana bacteriana, dependiente de TolC.

eliminación de compuestos tóxicos al exterior celular¹¹⁹; la bomba más efectiva está compuesta por las translocasas de la membrana interna AcrAB que se unen de forma transitoria a TolC¹²⁰, y ocupa el segundo lugar el sistema EmrAB, también dependiente de TolC¹²¹. Las células que carecen de TolC en su membrana externa presentan una marcada sensibilidad a un amplio rango de compuestos tóxicos, como por ejemplo sales biliares, detergentes y antibióticos. Además de su contribución en diferentes sistemas de transporte, existen otros fenotipos descritos en mutantes *tolC*⁻ que demuestran que esta proteína multifuncional participa en otros procesos celulares¹²². Originalmente TolC recibió su nombre debido a un hallazgo de Luria y de Zwaig en 1967, que descubrieron que las mutantes *tolC* se tornaban resistentes a ciertas colicinas¹²³ (las colicinas son proteínas bactericidas secretadas por algunas bacterias para eliminar a cepas competidoras). Las moléculas de colicina pueden ser divididas en tres dominios funcionales: el dominio receptor es responsable de la unión a la superficie celular, el dominio translocador es necesario para el pasaje del dominio activo a través de la membrana externa, el dominio activo se encarga de matar a la célula formando poros (que disipan el gradiente de protones) en la membrana interna o inhibiendo la síntesis proteica en el citoplasma (en algunos casos también presenta actividad nucleasa)¹²⁴. El mecanismo de translocación a través de la membrana externa aún no es claro, en el caso de las colicinas E1 y 10 se sabe que el dominio translocador interacciona específicamente con TolC, y que esta interacción es un prerequisite para la entrada de la molécula de colicina^{123, 125} (fig.8). Algunos estudios estructurales sugieren que el pasaje del dominio activo sucede a través de uno de los barriles-β de la proteína y no a través del poro central¹²⁶, además el dominio activo de la colicina E1 ha sido cristalizado, revelando una estructura globular demasiado grande para atravesar el poro¹²⁷, sin embargo estos estudios no son concluyentes.

TolC también actúa como receptor de superficie para el bacteriófago TLS¹²⁸, siendo sus dominios extracelulares los responsables de esta interacción. Otro fenotipo hallado en las mutantes *tolC* es la aparición de células anucleadas¹²⁹, sugiriendo un posible rol en la división celular; algunos autores especulan que TolC es uno de los sitios de contacto para los orígenes de replicación, que se unen firmemente a la membrana externa y se separan cuando la célula se divide¹³⁰. Las mutantes *tolC* presentan, además, desregulada la expresión genética de ciertos genes relacionados a procesos de transporte^{131, 132}.

TolC, junto al complejo ABC-MFP (HlyBD), es responsable de la translocación de la α -hemolisina HlyA a través de las membranas interna y externa, en un mecanismo que evita la aparición de intermediarios periplasmáticos^{118, 133}. Estudios bioquímicos han demostrado que, para que ocurra un transporte eficiente, las translocasas de la membrana interna deben reclutar al trímero TolC luego de unirse al sustrato¹³⁴. Se ha propuesto que la unión del sustrato induce un estado "abierto" en el sistema

por “desenroscamiento” del túnel de α -hélices de TolC; y que este cambio conformacional permite el pasaje directo de las proteínas y drogas desde el citosol hacia el exterior de la célula^{135, 136}.

TolC de *E. coli*, fue cristalizada en el año 2000¹³⁶ (fig.7A) y presentó una estructura única, trimérica, formada por un barril- β de 12 cadenas β de 40 Å de espesor y un dominio de α -hélices que sobresale hacia el periplasma hasta una distancia de 100 Å, en donde interacciona con los componentes de la membrana interna. En contraste a otros transportadores de membrana, TolC presenta una estructura de canal-túnel (el canal es la parte de la proteína que se inserta en la membrana externa, mientras que el túnel se extiende hacia el periplasma), por análisis de la estructura se propuso que el canal permanecería abierto hacia el medio extracelular, mientras que el extremo inferior del túnel (luego del dominio ecuatorial) tendría la capacidad de cerrarse o abrirse de acuerdo a cambios conformacionales de la proteína¹³⁶ (fig.7B). Cada monómero de TolC presenta una repetición estructural evidente (ver fig.7C), que es un correlato a lo que sucede en su estructura primaria, de hecho, se propone que TolC (y todas las proteínas de la familia) es el fruto de una duplicación génica en tandem, dada la alta similitud que existe entre las dos mitades de la proteína¹³⁵.

En el cromosoma I de *B. suis* M1330 se identificó una única proteína perteneciente a la familia TolC (BR0945 según TIGR), que se halla conservada en todas las especies secuenciadas del género. Como se mencionó antes TolC (de *E. coli*) y sus homólogos están involucrados en el eflujo de diversas moléculas, desde grandes toxinas proteicas, como la α -hemolisina, hasta pequeños compuestos tóxicos como son los antibióticos. Por lo tanto, los miembros de la familia TolC podrían conferirle a bacterias patógenas las herramientas necesarias para participar de procesos infecciosos, otorgando a la vez, la posibilidad de expulsar los compuestos tóxicos nocivos para la bacteria (antibióticos, detergentes, defensinas de plantas, etc.) y de secretar moléculas que medien en la interacción con la célula atacada (invasinas, adhesinas, etc).

Por todo lo expuesto, la porina de esta familia presente en *Brucella* era un blanco interesante de estudios genéticos y bioquímicos para avanzar en el conocimiento de sistemas de transporte en especies del grupo *Rhizobiaceae*. En esta tesis se detallan los estudios que nos llevaron a la confirmación de que esta proteína, denominada BepC (por *Brucella* Eflux Protein), interviene en la resistencia a colorantes catiónicos, detergentes, β -lactámicos, macrólidos, tetraciclina, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y sales biliares. Además, se describen los ensayos en los que se determinó que la proteína BepC fue capaz de complementar otros fenotipos asociados a la proteína TolC como la sensibilidad a colicina E1 pero falló en remplazar a TolC en la secreción de α -hemolisina en *E. coli*. Por último, también hemos descripto que la ausencia de BepC afecta la supervivencia de *B. suis* en un modelo de infección en ratones BALB/c⁷⁶.

Adhesión al hospedador en bacterias patógenas

En bacterias patógenas, la adherencia a los tejidos es esencial para la colonización del hospedador. Además de estructuras extracelulares como *pili* y fimbrias, se han descrito un considerable número de adhesinas no poliméricas que reconocen distintos elementos sobre la superficie de la célula eucariota, incluyendo componentes de la matriz extracelular como colágeno, proteoglicanos, lamininas y hialuronos y glicoproteínas adhesivas como fibronectina y vitronectina. Los receptores de la membrana celular como integrinas y cadherinas pueden interactuar con algunas de estas adhesinas mediando la unión o internalización de la bacteria¹³⁷. En patógenos intracelulares, la invasión puede ocurrir por contacto directo con receptores celulares (como integrinas) o por translocación directa de proteínas de la bacteria al citosol de la célula hospedadora, lo cual promueve rearrreglos de la membrana y la entrada de la bacteria¹³⁷. Entre las proteínas que pueden presentar función de adhesina o invasina se encuentran algunos miembros de los sistemas de secreción de tipo V. Estos sistemas se describen en la próxima sección.

Sistemas de secreción de proteínas de tipo V

A este sistema pertenecen proteínas que median su propio transporte al medio extracelular, por lo que las proteínas de estos sistemas también son conocidas como “autotransportadores”¹³⁸. El sistema descrito por primera vez fue el de la proteasa IgA₁ de *Neisseria gonorrhoeae*¹³⁹. Los autotransportadores son proteínas modulares, sintetizadas como un precursor en el que se han identificado tres dominios: la secuencia señal del amino-terminal, la proteína madura secretada (o dominio pasajero) y el dominio carboxi-terminal¹³⁸, también conocido como dominio translocador. En la secreción de proteínas mediante este sistema el transporte ocurre en dos pasos, en el primero de ellos un precursor de la proteína atraviesa la membrana interna empleando la vía *sec*¹⁴⁰, por lo que hay procesamiento del amino-terminal; luego, el dominio carboxi-terminal media el pasaje del dominio pasajero a través de la membrana externa, aparentemente formando un poro por el que dicho dominio sale a la superficie bacteriana, donde puede quedar anclado o ser liberado al medio externo por clivaje proteolítico¹⁴¹ (ver esquema en fig.9). Algunos ejemplos de especies que cuentan con sistemas de este tipo son *Serratia marcescens*¹⁴², *Helicobacter pylori*¹⁴³ y *E. coli* enteropatógena¹⁴⁴.

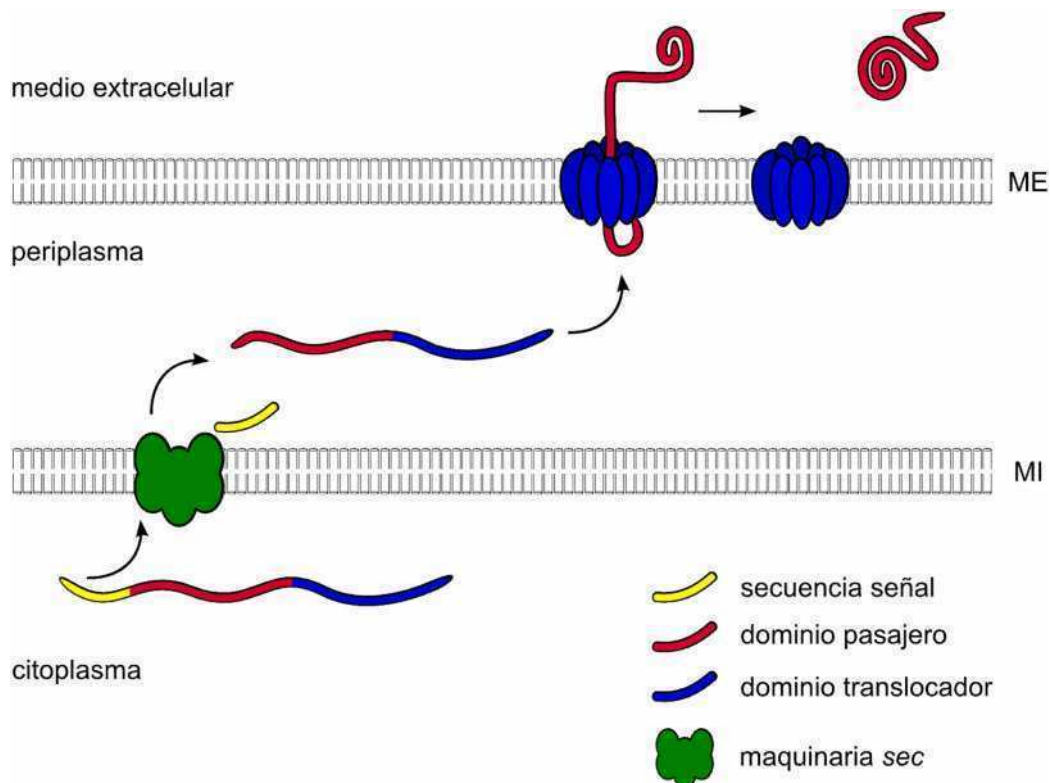


Fig. 9: sistemas de secreción de tipo V. Esquema de los dominios característicos de un autotransportador, y representación de la secuencia de eventos involucrados en su transporte hacia la membrana externa; la proteína recién sintetizada atraviesa la membrana interna, siendo procesada por la maquinaria *sec*. Luego el dominio translocador se ensambla formando un barril en la membrana externa, por el que el dominio pasajero sale al exterior de la célula. El dominio pasajero puede quedar anclado a la membrana externa o ser liberado al medio por clivaje proteolítico.

A la fecha, algunos autotransportadores han sido cristalizados, y su estructura tridimensional revelada, como NalP de *Neisseria meningitidis*¹⁴⁵, EstA de *Pseudomonas aeruginosa*¹⁴⁶ y EspP, de *Escherichia coli* O157:H7¹⁴⁷. En todos los casos estudiados fue evidente que los dominios translocadores de los autotransportadores son homólogos, contando con estructuras altamente conservadas, a pesar de que sus secuencias aminoacídicas son sumamente diversas. Este dominio, en general, está compuesto por 12 o 14 láminas β ubicadas en sentido antiparalelo que se insertan en la membrana externa de la bacteria, formando un barril. A través de este dominio es translocado el dominio pasajero de la proteína (ver fig.10 A, B y C); de acuerdo a las estructuras cristalizadas, las dimensiones del poro formado implican que el dominio secretado atraviesa la membrana externa desplegado¹⁴⁵. Algunos autores predicen que el dominio pasajero podría plegarse secuencialmente, proveyendo de la fuerza motriz para la translocación¹⁴⁶. Los dominios pasajeros son quienes portan la actividad biológica de la proteína, estos dominios no son homólogos en todos los autotransportadores; de hecho se han descrito entre ellos dominios que pueden (1) catalizar proteólisis, (2) servir como adhesinas, (3) mediar la motilidad bacteriana dependiente de actina o (4) servir como citotoxinas para células animales. Entre los autotransportadores de tipo I (AT1) la proteína precursora, previamente al procesamiento, puede poseer

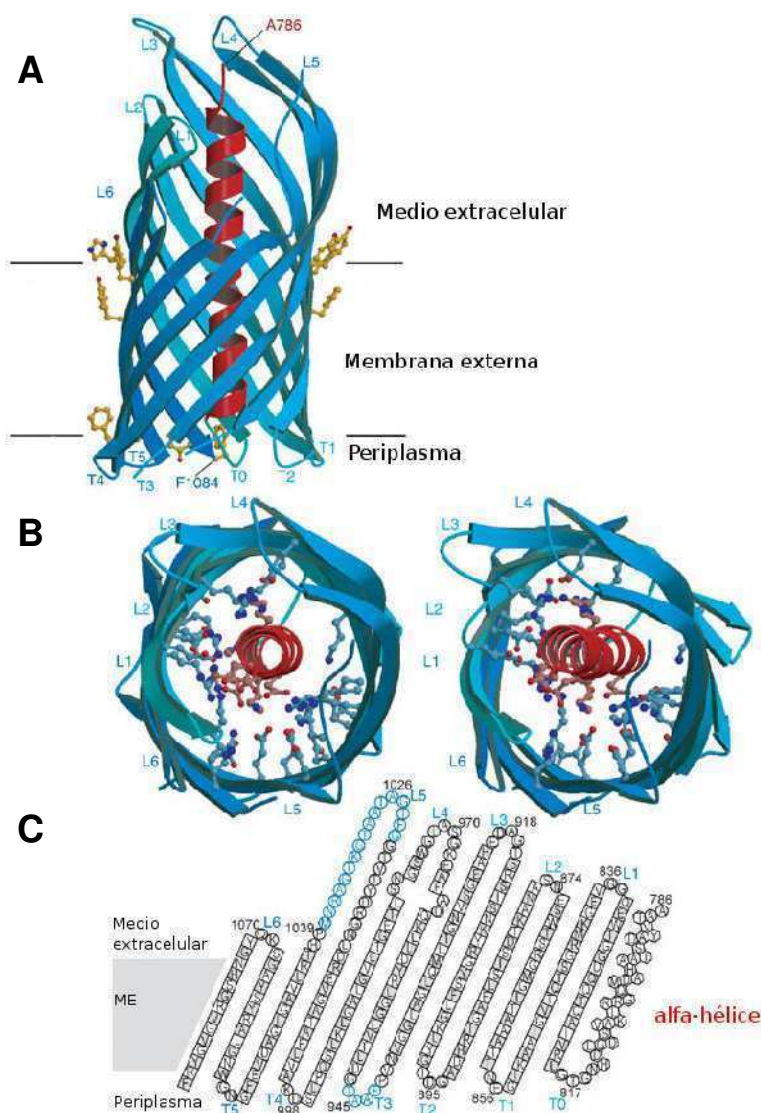


fig.10: estructura del dominio translocador (barril) del autotransportador NalP de *Neisseria meningitidis* (obtenida por cristalografía de rayos X). **A:** se observa una vista lateral de este dominio (barril en azul); en el centro se observa una porción del dominio pasajero (en rojo) compuesta por alfa-hélices. **B:** se observa una vista desde arriba de este dominio (láminas en azul); en el centro también se observa una porción del dominio pasajero (en rojo). Esta configuración es compatible con el estado adoptado por la proteína luego de la translocación del dominio pasajero. **C:** esquema de la distribución antiparalela de las láminas que conforman el barril. Tomado y modificado de Oomen *et al.* EMBO journal 2004.

entre 418 y 3705 residuos aminoacídicos. Existen algunos pocos ejemplos en los que la proteína parece contar con un único dominio, el translocador. En estos casos es muy probable que se transporten péptidos que no están unidos covalentemente a la proteína, dado que existen evidencias de falta de especificidad de sustratos en algunos autotransportadores¹⁴⁸.

Los AT1 están presentes solamente en el reino *Bacteria* y son más prevalentes en el phylum *Proteobacteria*, incluyendo las clases de α -, β -, γ -, y ϵ -proteobacterias. Los AT de una gran variedad de bacilos patogénicos, incluyendo IcsA y SepA de *Shigella flexneri*, AIDA-I de *Escherichia coli*, y BrkA de *Bordetella pertussis*, están localizados en uno de los polos de la bacteria¹⁴⁹. Esta restricción “geográfica” al polo es dependiente de la presencia de un lipopolisacárido (LPS) completo, y es consistente con efectos conocidos de la composición del LPS sobre la fluidez de membrana. Las moléculas nuevas, sintetizadas y secretadas de BrkA son polares, incluso en presencia de un LPS truncado, y todos los AT examinados son polares en el citoplasma previa su secreción¹⁴⁹. Además, NalP, un autotransportador de la bacteria esférica (coco) *Neisseria meningitidis*, contiene la información molecular para localizarse en el polo de *Escherichia coli* (en *N. meningitidis*, NalP es secretada en sitios distintivos alrededor de la célula)¹⁴⁹. Teniendo esto en cuenta, es posible suponer que la secreción de los AT probablemente ocurre en los polos de todos los bacilos Gram-negativos.

A la fecha, todos los miembros de la familia AT de tipo I que han sido caracterizados han sido catalogados como factores de virulencia, portando alguna actividad enzimática (proteasas, peptidasas, lipasas y esterases); mediando la motilidad bacteriana dependiente de actina; o actuando como adhesinas, hemaglutininas, invasinas, toxinas, citotoxinas o inmunomoduladores^{141, 144, 150-156}. La localización extracelular del dominio pasajero (en la superficie de la bacteria o en el medio extracelular) permitiría su interacción con otras moléculas bacterianas, o con los tejidos a ser infectados. Muchos autotransportadores son adhesinas caracterizadas, muy relevantes en la interacción entre la bacteria y la célula hospedadora^{152, 153}. Por ejemplo, el autotransportador TibA de *E. coli* enterotóxica tiene varias funciones: media en la autoagregación de las bacterias (a través de interacciones TibA-TibA)¹⁵⁷, participa en la formación de biofilm sobre superficies abióticas¹⁵⁷, interviene en la adhesión de la bacteria a una serie de tipos celulares humanos¹⁵⁸, y también funciona como invasina ya que fue necesaria para una invasión eficiente a varios tejidos¹⁵⁹. La capacidad de formar autoagregados sería un mecanismo de defensa común entre varias bacterias patógenas, ya que les permitiría resistir a los mecanismos de defensa del hospedador como el ataque por complemento, fagocitosis, etc.^{160, 161}; y a algunas condiciones ambientales desfavorables. Funciones similares a estas también son llevadas a cabo por los AT denominados AidA¹⁶² y Ag43¹⁶³ de *E. coli*, EstA¹⁶⁴ de *Pseudomonas* y por SdhA^{165, 166} y MisL¹⁶⁷ de *Salmonella*, entre muchos otros. La amplia ocurrencia de genes que codifican AT en los genomas de patógenos Gram negativos, su aparente uniforme rol como factores de virulencia, y su capacidad para interactuar con las células hospedadoras sugieren que estos genes representan blancos racionales si se quieren estudiar factores que condicionan la relación de un patógeno con su hospedador.

Autotransportadores en *B. suis*

Los autotransportadores representan una de las estrategias fundamentales que las bacterias Gram negativas han adoptado para destinar diversas proteínas a la superficie celular. Quizás esta vía de transporte sea el mecanismo más simple para la secreción de proteínas al medio extracelular¹³⁸; y por ello, sea uno de los métodos de secreción más adoptado por numerosos patógenos.

Los autotransportadores son “empleados” como adhesinas por muchos microorganismos, especialmente por patógenos, para quienes es imprescindible asegurar la invasión y colonización del hospedador. En estos microorganismos, la capacidad de colonizar y multiplicarse en los tejidos del hospedador es un prerrequisito clave a la hora de establecer una infección exitosa. En algunos casos, la adhesión es vital para evitar su eliminación de los tejidos, sobre todo cuando las áreas que están siendo colonizadas son continuamente lavadas por fluidos, por movimiento peristáltico o por acción de cilios (por ejemplo en las superficies mucosas de la boca y los pulmones). Frecuentemente, las adhesinas-AT reconocen directamente proteínas de la superficie de la célula eucariota^{155, 168} u otros componentes de la superficie (como por ejemplo carbohidratos), mediando en una firme asociación al tejido del hospedador. Otras adhesinas-AT se adhieren de modo indirecto a la célula hospedadora: tienen afinidad por productos de secreción de esa u otra célula, como por ejemplo proteínas de la matriz extracelular, que están unidas a la membrana plasmática sin ser parte integral de la misma^{167, 169, 170}. En la figura 11 se pueden ver esquemas representativos de ambos tipos de interacción.

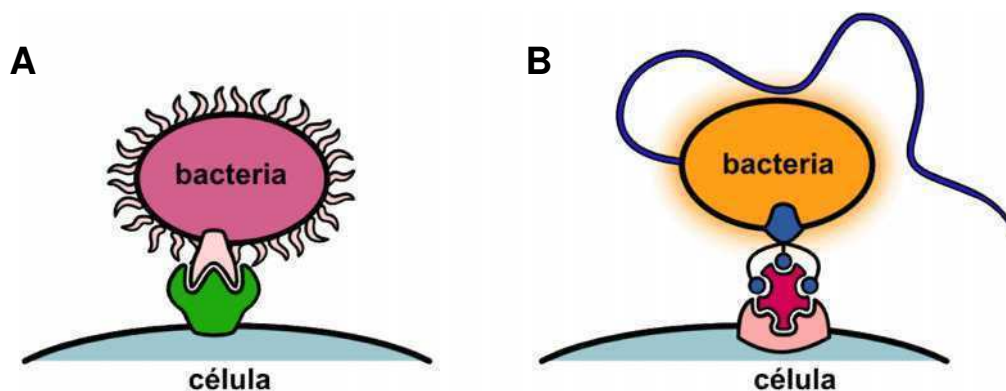


Fig.11: esquema de reconocimiento celular. En **A** el reconocimiento entre la bacteria y la célula eucariota sería directo, la adhesina bacteriana reconoce directamente al receptor presente en la superficie de la célula. En cambio, en **B** el reconocimiento sería indirecto: la adhesina de la bacteria reconoce a la célula eucariota vía una molécula intermediaria (en rojo).

La mayoría de las bacterias patógenas poseen múltiples adhesinas, que pueden actuar sinérgicamente, reforzando su capacidad adhesiva. Las adhesinas pueden también expresarse diferencialmente, reguladas por distintas señales ambientales¹⁶⁹. La síntesis de diversos tipos de moléculas de adhesión, en distintos momentos del ciclo de vida bacteriano, podrían permitir la modulación del ciclo infeccioso dentro del hospedador.

En el caso de *Brucella*, la invasión de los tejidos del hospedador es aparentemente un proceso complejo que consiste en muchos pasos entre los que se suceden interacciones específicas e inespecíficas. En el genoma de *B. suis*, así como en el de *B. melitensis* y *B. abortus*^{4, 28} se pueden reconocer por métodos bioinformáticos por lo menos seis proteínas pertenecientes a la familia de autotransportadores. Como se describirá en detalle en la sección de Resultados, tres de ellos (BRA1148, BRA0173 y BR2013) pertenecen a la familia AT1. Estos autotransportadores contienen dominios y motivos propios de las adhesinas, por lo que podrían ser relevantes en la adhesión y/o invasión de *Brucella* a sus células hospedadoras, o en procesos de interacción bacteria-bacteria. Con el fin de determinar si estas proteínas son efectivamente factores de virulencia, se mutaron los genes que codifican estos autotransportadores y se evaluaron los fenotipos de cada una de estas mutantes.

Phage Display

La técnica llamada *Phage Display* fue descrita por primera vez por George Smith en 1985¹⁷¹. En ella se emplean fagos filamentosos de *E. coli* (M13, f1, etc.) para expresar péptidos o proteínas en su superficie, fusionadas a proteínas virales. Las fusiones se disponen de una forma “inmunológicamente accesible”, por emplear las propias palabras de Smith, y permiten la interacción de los péptidos expuestos con algún ligando de interés.

Uno de los bacteriófagos más empleados por estas técnicas es el M13. Tanto es así, que las cinco proteínas mayoritarias que componen al fago han sido usadas en el *display* de péptidos foráneos. Este fago está compuesto por cinco proteínas de la cubierta (denominadas pIII, pVI, pVII y pVIII), que recubren el genoma circular; tres proteínas necesarias para la síntesis de ADN (pII, pV y pX) y otras tres proteínas involucradas en el ensamblado de la partícula fágica (pI, pIV, and pXI). La masa viral total alcanza los 16.3 MDa, que consisten en su mayoría en aproximadamente 2800 copias de pVIII, una proteína de 50 residuos aminoacídicos (codificada en el *gen VIII*) que recubre por completo al fago. En uno de los extremos del fago, además, se encuentran entre 3 y 5 copias de las proteínas pVII y pIX (provenientes de los *genes VII* y *IX*) y, en el otro extremo se hallan presentes también entre 3 y 5 copias de las proteínas pIII y pVI (*genes III* y *VI*)¹⁷² (ver fig.12).

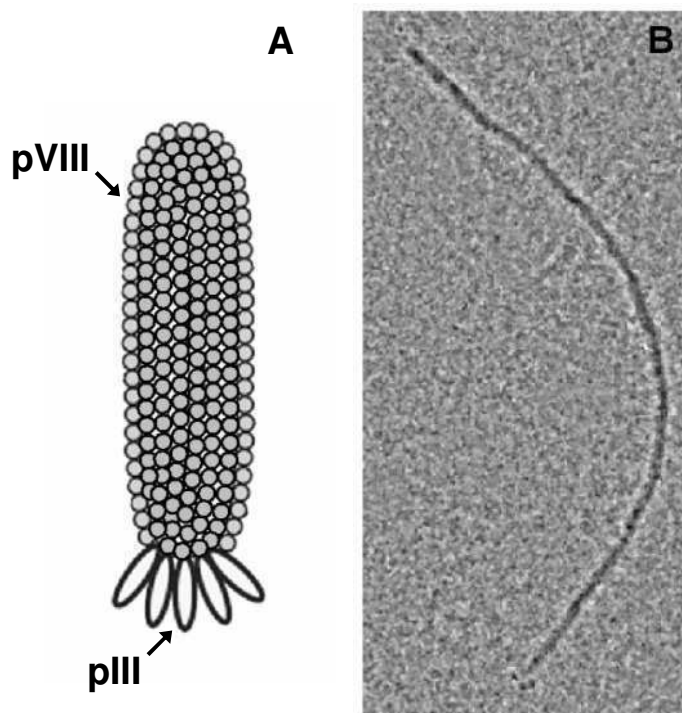


Fig.12: fagos filamentosos.

A: esquema de las estructuras presentes en el fago M13. Se muestran representadas las proteínas pIII y pVIII.

B: micrografía electrónica del fago M13 (Prof. Richard Perham, Universidad de Cambridge, UK). En el extremo inferior son visibles los dominios globulares de pIII.

Los vectores de *phage display* más utilizados emplean los extremos N-terminal de las proteínas pIII o pVIII para la presentación de péptidos en superficie¹⁷³. En la mayoría de las aplicaciones de la técnica, la proteína de adsorción pIII es la elegida para la fusión de péptidos (fig.13A). Esta proteína, de 406 aminoácidos, posee dos dominios funcionales: uno expuesto en el extremo N-terminal, que se une al pilus F, y que no es necesario para el ensamblado de la partícula fágica; y otro en el extremo C-terminal, que es parte integral de la estructura de la cápside. En las aplicaciones en las que se busca un *display* multivalente (presentación de muchas copias de la fusión en la superficie del fago) se elige, en cambio, la proteína pVIII (fig.13B). La porción C-terminal de pVIII también se localiza en el interior de la partícula fágica, cercana al ADN; mientras que el extremo N-terminal está expuesto al medio externo.

Las bibliotecas construidas con fusiones a pIII presentan en la superficie de cada fago entre 3 y 5 copias de cada péptido individual¹⁷⁴, mientras que las bibliotecas a partir de pVIII pueden presentar hasta 2700 copias de péptidos pequeños¹⁷⁵.

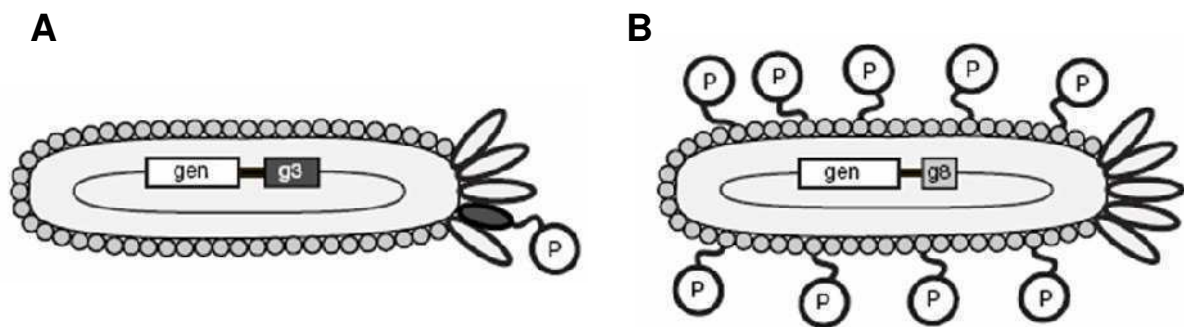


Fig.13: presentación de péptidos en superficie. Los genes que codifican los péptidos de interés se insertan adyacentes al gen de la proteína utilizada en el *display*. **A:** fusiones a la proteína pIII. **B:** fusiones a la proteína pVIII. Los péptidos-fusión serán presentados en la superficie de los fagos en ambos casos.

Existen sistemas de *display* basados en cada una de estas proteínas, optimizados para el tipo de interacción que se está buscando. En general, se considera que las fusiones a pIII son preferibles si se enfrenta una *library* de péptidos sintéticos contra un ligando seleccionado, y se buscan las interacciones más “fuertes”. En cambio, si se buscan “interacciones verdaderas” (es decir, interacciones que ocurren naturalmente, en sistemas vivos) y se enfrentan bibliotecas de ADN genómico contra ligandos seleccionados, las fusiones a pVIII dan mejores resultados¹⁷⁶. En estos sistemas, además, se puede optar entre diferentes alternativas que permiten regular la cantidad de fusiones presentes en la superficie de los fagos, y modificar el sistema de clonado que se utilizará en la construcción de la biblioteca. Por ejemplo, vimos que utilizando sistemas basados en pVIII se pueden generar fagos que presentan miles de copias de la fusión en superficie (fig.14A). Esto es deseable en algunas aplicaciones en las que el péptido expuesto es muy pequeño (hasta 6 aminoácidos); pero en otras, en las que las fusiones son mayores, es preferible generar fagos que exponen un número reducido de copias en superficie. Por ejemplo, para ganar estabilidad en la presentación de polipéptidos de tamaño medio a grande, fusionados a pVIII, se emplea una suplementación de copias silvestres de la proteína pVIII, que garantiza el ensamblado de fagos “híbridos”, que sólo poseen en promedio un 10% de proteínas fusión. Esto

puede ser logrado de dos formas distintas: introduciendo una copia *wild type* extra de *gVIII* en el genoma del fago, además de la empleada en la fusión (fig.14B), o usando un fago *helper* en combinación con el fago que porta la fusión (fig.14C). Ambos métodos producirán partículas fágicas “mosaico”, cuyas cubiertas estarán compuestas por una mezcla de proteínas pVIII-recombinantes y pVIII-wt.

Sistemas basados en *gVIII*:

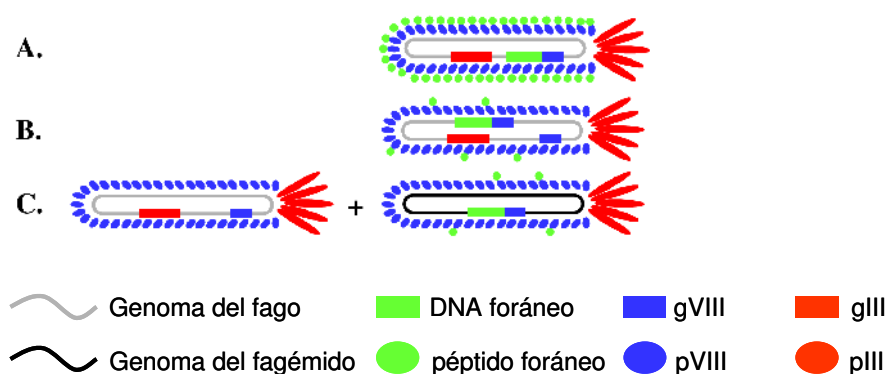


Fig.14: estrategias de display. Sistemas basados en *gVIII/pVIII*. **A:** en este sistema hay una copia silvestre de *gIII*, y una copia de *gVIII* fusionada al inserto; por lo que todas las pVIII llevarán una copia de la fusión. **B:** en este sistema hay una copia silvestre de *gIII*, una copia de *gVIII* fusionado al inserto y una copia extra de *gVIII* silvestre; por lo que se obtendrá un fago mosaico, en dónde solo algunas pVIII llevarán una copia de la fusión. **C:** en este sistema se emplea un fago, que porta copias silvestres de *gIII* y *gVIII*, junto a un fagémido que sólo posee una copia de *gVIII* fusionada al inserto; al fago se lo denomina “fago *helper*” porque aporta todas las funciones silvestres ausentes en el fagémido. Empleando este sistema se obtendrán también fagos mosaico.

En general, el sistema de producción de fagos “híbridos” elegido es el que se muestra en la figura 14C, ya que permite trabajar con vectores fagémidos de menor tamaño y más fácil manipulación, y con fagos *helper* comerciales de alto título como R408.

En los casos en los que se producen fagos “híbridos”, el número de proteínas fusión presente variará en cada partícula; por lo que la avidéz de cada fago por el ligando podrá ser diferente. Esto debe tenerse en cuenta en la caracterización de las fuerzas de unión y en las mediciones de afinidad de un péptido por un ligando seleccionado.

Para la producción de fagos recombinantes se aprovecha el ciclo de vida de M13 (ver esquema en fig.15). Estos fagos filamentosos infectan al hospedador (*E. coli*) usando al pilus F como receptor; la infección no produce la lisis de la bacteria, sino que induce un estado en el que la bacteria produce y secreta partículas fágicas al medio extracelular. Debido a esto, no se observan placas de lisis cuando se producen fagos en cultivo; sin embargo, la presencia del fago retrasa la replicación de *E. coli*, por lo que se pueden obtener “placas turbias” en cultivo. La infección comienza con la unión de la proteína pIII al pilus F de *E. coli*, luego el ADN circular, simple cadena del fago ingresa a la bacteria y es convertido por la maquinaria de replicación bacteriana en ADN doble cadena. Esta es su forma replicativa, que sirve de molde para replicación por círculo rodante y para la expresión de las proteínas fágicas. Todas las

proteínas estructurales del fago son proteínas integrales de membrana, y se dirigen hacia la membrana celular luego de su síntesis. El ensamblado y la secreción de las partículas fágicas ocurren simultáneamente, y los fagos atraviesan las membranas interna y externa al abandonar la célula^{177, 178}.

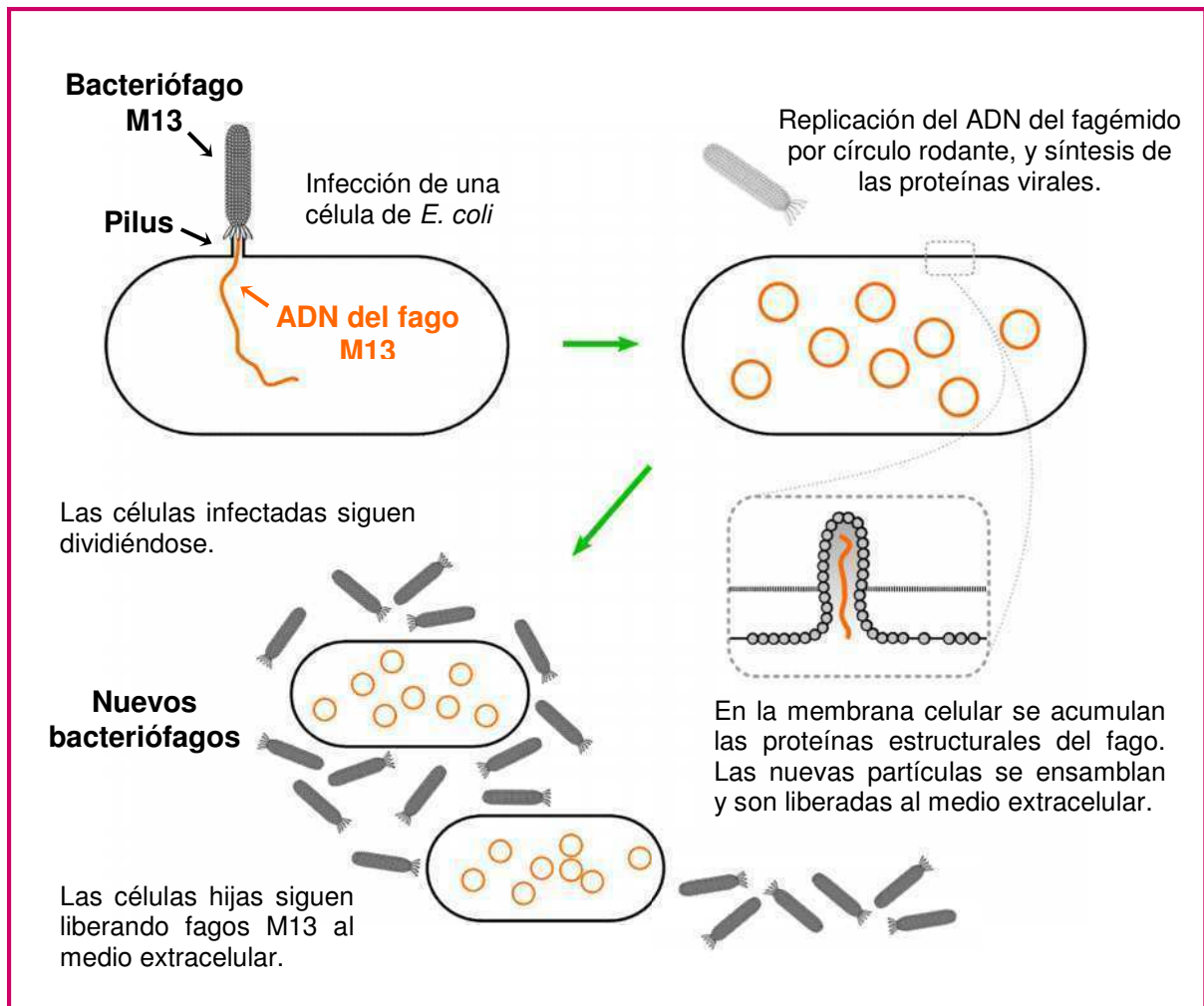


Fig.15: ciclo infeccioso del fago M13. Los bacteriófagos infectan las células de *E. coli* utilizando al pilus F como receptor. La adsorción a esta estructura está mediada por uno de los dominios de la proteína pIII. El fago inserta su genoma compuesto por ADN simple cadena al interior de la célula. Luego, la maquinaria de la célula replica el ADN del fago y sintetiza sus proteínas. Las proteínas estructurales del fago portan una secuencia señal que las dirige hacia la membrana de la célula, en donde las nuevas partículas son ensambladas. Como no se produce la lisis de la bacteria, ésta continúa creciendo y dividiéndose. Las células hijas liberan más fagos al medio extracelular. El ensamblado y la secreción de nuevos fagos ocurren simultáneamente.

La producción de los fagos recombinantes es uno de los últimos pasos en la construcción de las bibliotecas de *phage display*, y muchas veces la calidad de la biblioteca es testada en este paso, por determinación el título (cantidad de fagos presentes) y el tamaño (cantidad de insertos presentes) de la misma.

Como ya mencionamos, estas bibliotecas se emplean en una gran variedad de aplicaciones distintas, que tienen en común la búsqueda de nuevas interacciones. Se han empleado para determinar cuales son los epitopes a los que se unen anticuerpos¹⁷⁴; y los motivos de un ligando que se unen a su receptor, como en el caso de las integrinas que reconocen al motivo RGD^{179, 180}. Estas integrinas median la unión de células a muchos tipos de proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, vitronectina y fibrinógeno^{180, 181}. También han sido identificados péptidos que se unen a ADN¹⁸², a carbohidratos^{183, 184}, y hasta a nanotubos de carbono¹⁸⁵, mediante el uso de bibliotecas de *phage display* de péptidos al azar. La técnica, además, ha sido aplicada como una herramienta en la evolución dirigida de moléculas por más de una década¹⁸⁶. En años recientes se han creado aplicaciones nuevas para usar como ligandos moléculas expresadas sobre tejidos vivos, humanos o animales¹⁸⁷. Pasqualini *et al* fueron los primeros en describir un nuevo método de selección *in vivo* que permite aislar péptidos que se unen específicamente al endotelio renal o cerebro-vascular *in vivo*¹⁸⁸. Empleando este método se han logrado identificar nuevos pares de interacción de tipo ligando-receptor en enfermedades malignas^{189, 190} y benignas^{191, 192}. Debido a esto, estas tecnologías han tenido una gran influencia en los descubrimientos llevados a cabo en áreas como la inmunología, la biología celular, la farmacología y en el desarrollo de nuevas drogas.

La utilización de bibliotecas de fagos que exponen péptidos para el aislamiento de adhesinas a un determinado ligando ha sido utilizada con éxito también en bacterias patógenas^{176, 193, 194}. La técnica ha sido utilizada para identificar adhesinas de distintas bacterias, como por ejemplo, una proteína de unión a fibronectina en *Streptococcus agalactiae*¹⁷⁶, una adhesina de *Borrelia burgdorferi* de unión a cadenas 3 de integrinas¹⁹⁴ y otra en *Pasteurella multocida*¹⁹³. También se empleó con éxito en la identificación de RapA, una adhesina localizada en uno de los polos del simbionte *Rhizobium leguminosarum*¹⁹⁵.

En esta tesis nos planteamos como objetivo la identificación de moléculas de adhesión de *Brucella suis*, para ello se empleó la técnica de *shotgun phage display*, y se generó una biblioteca en la que se exponen péptidos de *B. suis* (cepa 1330), fusionados a la proteína pVIII, sobre el fago M13.

Para generar la biblioteca, el ADN genómico de *B. suis* fue fragmentado al azar por sonicación, y los fragmentos fueron clonados en el fagémido pG8SAET¹⁷⁶. El fagémido pG8SAET es un derivado del fago M13, que posee una versión modificada de pVIII y cuenta, además, con un origen de replicación funcional en *E. coli* (colE1) y un *cassette* que confiere resistencia a ampicilina. Como estrategia de *display* se eligió un sistema de producción de fagos híbridos, similar al descrito en la figura 11C, por lo que en las infecciones a *E. coli* se empleó pG8SAET junto a un fago *helper* (R408). En el interior de la célula, el fagémido se comporta como un plásmido, y las proteínas de fusión son producidas. Éstas viajan a la membrana de la bacteria y se acumulan para el ensamblado de nuevos fagos; también se producen copias silvestres de pVIII, junto al resto de las proteínas del M13, codificadas en el fago *helper*. En el ensamblado de nuevas partículas virales se mezclan las copias silvestres con las copias fusión, y como resultado de la coinfección se obtienen fagos híbridos. El conjunto de fagos que contienen

péptidos fusionados a pVIII constituye la biblioteca y en ella se halla representado todo el genoma de *B. suis*. En esta biblioteca se buscaron las posibles moléculas de adhesión de *Brucella*, empleando un método de selección por afinidad.

Cuando una proteína de fusión es expresada en la superficie del fago, éste adquiere cierta afinidad por algún ligando (capacidad de *binding*). Los fagos que poseen esta nueva propiedad pueden ser separados de la mezcla y aislados por un proceso de selección por afinidad conocido como *panning*. La selección por afinidad reemplaza al *screening* tradicional, permitiendo el análisis de una mayor cantidad de clones en poco tiempo. Además, la molécula que participa en la interacción (proteína de fusión) está ligada físicamente a la secuencia de ADN que la codifica. Esta unión entre fenotipo y genotipo mediada por el virus (que actúa como *carrier* para el gen y para la proteína) permite el aislamiento selectivo y la amplificación de un fago particular que porta el gen de interés de un *pool* de millones de fagos.

En esta tesis se eligieron como ligandos de interés a la proteína de la matriz extracelular fibronectina y la proteína fetuína, muy sustituida con residuos de ácido siálico. Una vez identificados los fagos con aparente afinidad a cada uno de estos ligandos, se realizaron una serie de ensayos para confirmar y luego estudiar la naturaleza de cada una de estas nuevas interacciones.

Ensayos heterólogos

La caracterización funcional de genes secuenciados constituye uno de los grandes desafíos de la biología molecular en la era post-genómica. Frecuentemente, las únicas claves sobre el rol de un gen provienen de la homología de su secuencia a otros ya caracterizados. En estos casos se pueden realizar ensayos de complementación heteróloga aprovechando contextos biológicos conocidos.

En genética bacteriana se define como un ensayo de complementación aquel en el que se prueba si un organismo mutante en un gen particular recupera su fenotipo silvestre al recibir una copia intacta del gen en cuestión. Se dirá que la complementación es heteróloga si el gen introducido y el organismo mutante pertenecen a especies distintas.

Como se mencionó antes, TolC de *Escherichia coli* es una proteína multifuncional que participa en varios procesos de transporte, en los que interacciona con diversos factores presentes en la membrana bacteriana. Entre estos procesos se destacan la secreción de proteínas (-hemolisina), el eflujo de compuestos tóxicos y la captación de colicina E1. Los sistemas de los que forma parte, representan los ejemplos mejor estudiados de secreción de proteínas y eflujo de sustancias tóxicas. En ellos, estos mecanismos han sido investigados hasta el detalle y conforman los modelos de transporte universalmente aceptados. Las mutantes en el gen *tolC* poseen un fenotipo pleiotrópico: las cepas mutantes en *tolC* son hipersensibles a un gran abanico de drogas, no pueden secretar proteínas vía sistemas de secreción tipo I y son resistentes a la colicina E1. Debido a esto, la mutante *tolC* en *E. coli* fue elegida para estudiar el posible rol de una proteína no caracterizada de *B. suis* (BepC) en alguna de estas funciones, mediante una complementación funcional heteróloga. Esta estrategia, adoptada por diversos grupos, ha resultado exitosa en numerosas ocasiones: por ejemplo en la caracterización de HasF de *Serratia marcescens*¹⁹⁶ o la identificación de TolC de *Erwinia chrysanthemi*¹⁹⁷. En estos ensayos, que se describen en el capítulo I de esta tesis, una copia silvestre del gen *bepC* fue clonada en un vector de expresión y usada para complementar a la mutante *tolC* de *E. coli* (ver fig.16 A).

La complementación funcional también fue empleada en la caracterización de otro gen de *B. suis*. En este segundo caso se la utilizó en el estudio de una adhesina-AT de *Brucella* denominada BmaA. Se empleó una cepa de *E. coli* que no es capaz de adherirse ni invadir células epiteliales, transformada con un plásmido que permite la expresión de la adhesina de *B. suis* (ver fig.16 B). Las nuevas capacidades de interacción con células eucariotas y con bacterias fueron estudiadas en la cepa que presenta al AT en superficie.

La cepa utilizada de *E. coli* es derivada de K12 y no posee ninguna mutación en particular, sino que está desprovista de los factores de virulencia que le permitirían interactuar con algún hospedador. Por estos motivos los experimentos realizados no constituyen una complementación heteróloga propiamente dicha. Es por esto que hablaremos de una “expresión heteróloga” y no de una “complementación heteróloga” en la descripción de estos resultados, presentados en el capítulo III de esta tesis.

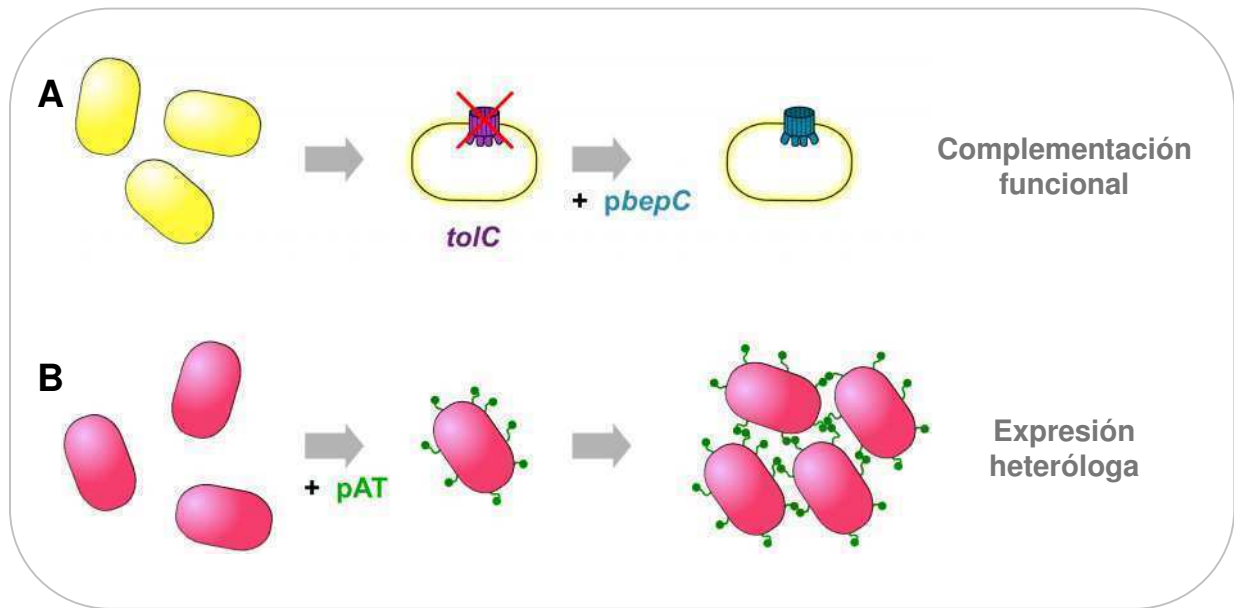


Fig.16: ensayos heterólogos. A: Complementación funcional en *E. coli*. La proteína TolC fue reemplazada por BepC de *B. suis* en la membrana de *E. coli*. Luego se evaluó que fenotipos de la mutante *tolC* eran complementados por BepC. **B:** Expresión heteróloga del autotransportador (AT) BmaA de *B. suis* en *E. coli* no invasiva ni adherente. Un vector de expresión llevando el gen *bmaA* fue usado para transformar esta cepa de *E. coli*. En la cepa obtenida se estudiaron las nuevas propiedades de adhesión adquiridas.

En esta tesis se describen muchos experimentos llevados a cabo con los patógenos intracelulares *Brucella suis* y *Brucella ovis*. Algunas cepas de *B. abortus* también fueron empleadas como control en ciertos experimentos. Estos microorganismos han sido clasificados dentro del grupo de patógenos de bioseguridad de nivel 3, por lo que toda manipulación de estas especies debe realizarse con los más estrictos controles de bioseguridad. En el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires, Fundación Instituto Leloir (FIL), se cuenta con el equipamiento básico necesario para estas tareas. Asimismo, todos los procedimientos operacionales que se desarrollan en las áreas de bioseguridad han sido evaluados y aprobados por una comisión de bioseguridad; y los investigadores que trabajan en estas áreas han sido entrenados para tal fin. Todos los experimentos que excedían las capacidades del área de Bioseguridad de la FIL, como por ejemplo las infecciones en animales, fueron llevadas a cabo en instalaciones apropiadas de los establecimientos CICVyA, INTA Castelar; Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la UNSAM o en el “Servicio de Brucelosis” ANLIS, Malbrán.

Objetivos

En esta tesis de doctorado se estudiaron diversos factores relevantes dentro de la fisiología de *Brucella* spp., que le permiten interaccionar con su hospedador. El trabajo se enfocó, en particular, en dos procesos esenciales para la mayoría de los patógenos: el transporte de moléculas desde el citoplasma (ya sea para la secreción de efectores o para el eflujo de compuestos tóxicos) y la adhesión a los tejidos del hospedador en el proceso de colonización.

Los objetivos específicos de esta tesis son:

- 1) Evaluar el rol del único componente de la familia TolC en la fisiología de *B. suis*.
- 2) Construir una biblioteca de *display* en fagos de *B. suis* y seleccionar posibles moléculas de adhesión a partir ella.
- 3) Abordar una estrategia de mutación de genes blanco para identificar y caracterizar posibles adhesinas. Los blancos seleccionados serán los autotransportadores de tipo I presentes en el genoma de *B. suis*.

Materiales y Métodos

Cepas y plásmidos

Las cepas de *Escherichia coli* y *Brucella suis*, así como los plásmidos utilizados, se detallan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: cepas bacterianas y plásmidos

Cepa	características relevantes	origen o referencia
Escherichia coli		
DH5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169 deoR, recA1, endA1 hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺ phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1.	New England Biolabs
C600	F ⁻ , e14, mcrA, thr-1 supE44, thi-1, leuB6, lacY1, tonA21, [[lambda]] [-].	Dr. Delepelaire ¹¹⁸ Inst. Pasteur
C600 tolC::Tn5	F ⁻ , e14, mcrA, thr-1 supE44, thi-1, leuB6, lacY1, tonA21, [[lambda]] [-], tolC::Tn5.	Dr. Delepelaire ¹¹⁸ Inst. Pasteur
GM 2163	F ⁻ , dcm-6, dam-13::Tn9, hsdR2.	CGSC Yale University
HB101(pRK600)	Cepa helper para conjugación triparental, tra+.	New England Biolabs
TG1	Cepa para phage display supE thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM)5(rK- mK-) [F' traD36 proAB lacIqZ] M15].	BioSite
S17	Cepa para conjugación biparental en B. suis.	Dr. Luis Ielpi
K12 (cc118)	Cepa no invasiva ni adherente de E. coli.	Dr. Luis Ielpi
K12 bmaA+	Cepa no invasiva ni adherente de E. coli que expresa en superficie el gen bmaA de B. suis.	Esta tesis
Brucella suis		
M1330	Cepa silvestre de Brucella suis.	Dr. Pablo Baldi
B. suis GFP	Cepa silvestre M1330 que expresa la proteína GFP (+ pGFP).	Esta tesis
bepC:: Δ	M1330 con el gen bepC interrumpido por un cassette de resistencia a espectinomicina Δ .	Esta tesis
bepC ⁺	mutante bepC complementada (+ pBBR1 bepC).	Esta tesis
bepC lacZ-Gm	M1330 con el promotor del gen bepC fusionado a un cassette de lacZ-gentamicina.	Esta tesis

Tabla 1 cont.

bmaB::genta	M1330 con el gen bmaB interrumpido por un cassette de resistencia a gentamicina.	Esta tesis
bmaA:: Ω	M1330 con el gen bmaA interrumpido por un cassette de resistencia a espectinomicina Ω .	Esta tesis
Δ bmaC	M1330 con el gen bmaC deletado.	Esta tesis
bmaA GFP	mutante bmaA que expresa la proteína GFP (+ pGFP).	Esta tesis
bmaB GFP	mutante bmaB que expresa la proteína GFP (+ pGFP).	Esta tesis

Plásmido	características relevantes	origen o referencia
pGEM-TbepC	Fragmento de 2 Kb con bepC de B. suis.	Esta tesis
pGEM-TbepC:: Ω	El gen bepC de B. suis interrumpido por un cassette de resistencia a espectinomicina.	Esta tesis
pBBAD18TbepC	Fragmento de 2 Kb con bepC de B. suis clonado bajo un promotor inducible por L-arabinosa.	Esta tesis
pGEM-TpbepC lacZ-gm	El promotor del gen bepC fusionado a lacZ-gentamicina. Empleado para obtener inserciones del promotor + cassette en el genoma por simple recombinación.	Esta tesis
pSF4000	pACYC184 con genes hly ABCD (sistema de secreción y hemolisina).	Dr. Delepelaire ¹¹⁸ Inst. Pasteur
pBBR1-bepC	Fragmento de 2 Kb Sall-SphI con bepC de B. suis.	Esta tesis
pHP45 Ω	Cassette 2 Kb de resistencia a espectinomicina (Ω) clonado en pHP45.	Prentki,Krisch ¹⁹⁸
pJQ175	Cassette de resistencia a gentamicina, 1 Kb.	Quandt ¹⁹⁹
pAB 2001	Cassette de resistencia a gentamicina fusionado a gen lacZ. 4.5 Kb.	A. Becker ²⁰⁰
pGFP	El gen gfp (green fluorescent protein) clonado en pBBR4 bajo el promotor tac.	Lic. Lucas Bukata
pGEM-Teasy-bmaA:: Ω	Fragmento de 1000 pb del gen bmaA de B. suis interrumpido por un cassette de resistencia a espectinomicina (Ω), empleado para obtener un mutante por inserción en dicho gen.	Esta tesis

Tabla 1 cont.

pBBR1MCS bmaA	Fragmento que contiene al gen bmaA de <i>B. suis</i> .	Esta tesis
pGEM-Teasy-bmaB::G	Fragmento de 1500 pb del gen bmaB de <i>B. suis</i> interrumpido por un cassette de resistencia a gentamicina, empleado para obtener una mutante por inserción en dicho gen.	Esta tesis
pK18mobsacB	Plásmido movilizable que porta el gen sacB, empleado para la obtención de cepas con doble recombinaciones al cromosoma. (sacarosa ^S) Km ^R	A. Schäfer ²⁰¹
pK18mobsacB bmaC	Fragmento de 1300 pb de zonas lindantes al gen bmaC de <i>B. suis</i> empleado para obtener una mutante por delección en dicho gen.	Esta tesis
pBBR1MCS bmaC	Fragmento de 12 Kb que contiene al gen bmaC de <i>B. suis</i> .	Esta tesis
pG8SAET	Plásmido para la construcción de bibliotecas de phage display, por medio de fusiones a PVIII del fago M13.	Dra K. Jacobsson ¹⁷⁶

Medios y condiciones de cultivo

E. coli fue cultivada en medio Luria-Bertani (LB) y *B. suis* en medio triptona de soja (Tryptic Soy Broth®)(TSB), en ambos casos se incubó durante 16 a 24 hs, y se empleó en los medios sólidos 1,7% (p/v) de agar. Las células fueron cultivadas a 37° C, con agitación (200 rpm/min) en el caso de los cultivos líquidos. Como medio mínimo de *B. suis* se empleó medio Gerdharts modificado (GH).

® Bacto

Medios de cultivo

⊕ LB	gramos por litro de medio	⊕ TSB	gramos por litro de medio
Triptona	10 g	TSB	30 g
Extracto de levadura	5 g	(Agar	17 g)
NaCl	5 g		
(Agar	17 g)		

⊕ Medio Mínimo GH

1) Se preparó el siguiente stock de sales 10X:

	gramos cada 1000 ml
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.1 g
MnSO ₄ •4H ₂ O	0.01 g
Na ₂ S ₂ O ₃ •5H ₂ O	1 g
K ₂ HPO ₄	3 g
NaCl	7.5 g

- 2) Se preparó el “medio sales” 1X a partir de cada stock en agua milliQ.
- 3) Se fraccionó en volumen necesario.
- 4) Se agregó agar (para medio sólido): 3 g por cada 200 ml de medio.
- 5) Se autoclavó.
- 6) En el momento de usar, se agregaron los siguientes suplementos que son esterilizados por separado:

Suplemento	en 1 litro de medio
Casamino ácidos 10% (p/v)	30 ml
Glucosa 100 g/L	10 ml
FeSO ₄ •7H ₂ O 10 mg/ml	0.01 ml
Vitaminas * (en 50mM Buffer fosfato pH 7)	1 ml

*Vitaminas:	biotina	0.01 μg/ml
	tiamina	0.2 μg/ml
	D/L ácido pantoténico	0.04 μg/ml
	D/L ácido nicotínico	0.2 μg/ml

(Esterilizadas por filtración, millipore 0.22 μm).

Antibióticos

Tabla 2: drogas y concentraciones empleadas

Antibiótico	Solución Madre	Concentración final	
		<i>E. coli</i>	<i>B. suis</i>
	mg/ml	µg/ml	µg/ml
Ampicilina	200 (H ₂ O)	400	10
Cloranfenicol	25 (Etanol, Metanol)	50	6
Gentamicina	20 (H ₂ O)	20	5
Kanamicina	50 (H ₂ O)	50	25
Espectinomicina	100 (H ₂ O)	200	50
Estreptomicina	200 (H ₂ O)	400	50
Tetraciclina	5 (Etanol, 70% Etanol)	10	-
Ácido Nalidíxico	25 (H ₂ O)	-	25

Conservación de cepas

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas fue realizada por congelamiento rápido de cultivos en fase logarítmica tardía, suplidos con glicerol estéril a una concentración final de 20% (v/v) en criotubos conservados a -20° C y a -80° C. Las cepas criopreservadas de *B. suis* se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido destinado a tal fin.

Amplificación de secuencias mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

En todos los casos las reacciones de PCR fueron realizadas en microtubos de pared delgada de 0.2 ml. La composición de la mezcla de reacción por tubo fue la siguiente:

Buffer 10X libre de Mg⁺⁺	5 µl
MgCl₂ (50 mM)	*
dNTPs (40 mM)	1 µl
Primer 1* (10 µM)	2.5 µl
Primer 2 * (10 µM)	2.5 µl
Taq/pfu/ KOD polimerasa	0.5 µl
ADN molde*	1- 6 µl
H₂O (milliQ)	para llevar a volumen
Vol. final	50 µl

* Variaron de acuerdo a la reacción.

Oligonucleótidos

Las secuencias de todos los *primers* empleados se detallan a continuación en la tabla 3.

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Referencia
BepC For	GAACGGGATGACGGGAA	Esta tesis
BepC Rev	TTCCAGGATCTTCGCACA	Esta tesis
Int. Sense	CAGGCTGAACTGATGGCTT	Esta tesis
Int. Antisense	GGCGTACCGTTTTCAATGCA	Esta tesis
Omega A	CCTTGATGTTACCCGAGAG	D. Russo
Omega D	CTAGCGAGGGCTTTACTA	D. Russo
Omega B	CTGCCCTGGCTTCAGGAGA	F. Martín
Omega E	CGTAAAAGGCGAGATCACCAA	F. Martín
Gent A	TATCTAGAGCTTCAAGGAAGATTTC	F. Martín
Gent B	AAATCTAGACGCTCAGTGGAACGAA	F. Martín
E BmaA For	AGCTCGAGGTTTCGCGAGCTGCGGCGTCTGGTTC	Esta tesis
E BmaA Rev	CTGGATCCTTCTATCAGCTGATTAGCAGTAAGG	Esta tesis
M BmaB For	CACGAGCACCTGGAGTG	Esta tesis
M BmaB Rev	GCCAGGAATGCTTCCTGT	Esta tesis
M BmaA For	AATTGATGGAGGGCAGTCTGA	Esta tesis
M BmaA Rev	CGCCGCCGGTATTGTCA	Esta tesis
▯ BmaC For 1	GAATTCTTGTCTAGGCGACGTTCTG	Esta tesis
▯ BmaC Rev 1	GGTACCACTCAAAATGTAGCCCGTC	Esta tesis
▯ BmaC For 2	GGTACCACGGCTCTATCGAATCGT	Esta tesis
▯ BmaC Rev 2	GTCGACTCATAGTTCCACCCAGA	Esta tesis
▯ BmaC int. 1	CGGTGTTCTTCAACGAGCCA	Esta tesis
▯ BmaC int. 2	TTATCAGCCTGGTGTTCCTACT	Esta tesis
Phage D. For	TATCTGGTGGCGTAACACCTGCT	K. Jacobsson
Phage D. Rev	GATCGTCACCCTCGGATCCCTAGG	K. Jacobsson
RTbmaA Fwd	TGACGGTACCATCGTCTTCA	Esta tesis
RTbmaA Rev	GATTCACCACCTGCACATTG	Esta tesis
RTbmaB Fwd	AGTCGATTTTCGGTACGTTGG	Esta tesis
RTbmaB Rev	GGTACCGTTACCAAGCTGGA	Esta tesis
RTbmaC Fwd	AACTTGCGCACAACCTAACC	Esta tesis
RTbmaC Rev	ATAGGTGCTGTCCGAATTGG	Esta tesis
RT IF Fwd	GCCAGGTGGCCATAGACC	F. Martín
RT IF Rev	CACTCAAAGCCTGCATAGAC	F. Martín

Colony PCR

Se empleó como molde ADN total proveniente de colonias bacterianas, que fue preparado de la siguiente manera: se emplearon escarbadiantes estériles para picar colonias de los clones de interés; una punta de escarbadiantes de bacterias fue resuspendida en 50 μ l de agua milliQ estéril. Esta suspensión fue sometida a 94° C durante 5 min, luego fue centrifugada a 10000 rpm por 30 seg. y 5 μ l del sobrenadante fueron utilizados en la reacción de amplificación (de la forma antes descrita).

Ligación en pGEMT-easy

Ciertas polimerasas termoestables (usadas frecuentemente en PCR) agregan al extremo 3' de los fragmentos amplificados una deoxiadenosina (A) no apareada. Esta característica es aprovechada por los sistemas de vectores pGEM-T® y pGEM-Teasy®, que poseen una deoxitimidina (T) no apareada en cada uno de sus extremos 3', proporcionando un extremo cohesivo compatible. Además, la base extra incorporada al vector lineal impide el religado del mismo, elevando la eficiencia de ligación vector-inserto.

Todos los amplicones fueron clonados en el vector pGEM-Teasy®, usando una relación molar inserto:vector 3:1, en la siguiente reacción de ligación:

2X Rapid Ligation Buffer®	5 μ l
Vector pGEM-Teasy® (50 ng)	1 μ l
Producto de PCR	X μ l
T4 ADN Ligasa® (3 Weiss u/ μ l)	1 μ l
H ₂ O milliQ	a 10 μ l

® Promega

Extracción de ADN cromosómico

Para purificar ADN cromosómico de *B. suis* se empleó el siguiente protocolo:

1. Se cultivó la cepa de interés por 3 días, hasta obtener un pre-cultivo en fase estacionaria (2 - 5 ml en medio TSB con antibióticos).
2. Se inocularon 25 ml de medio TSB con 0.25 ml del pre-cultivo en fase estacionaria.
3. Cuando el cultivo llegó a una DO₆₀₀=0.6 (en medio TSB 24 hs. *B. suis*) se cosecharon las bacterias por centrifugación (8000 rpm en rotor SS34 de Sorvall a 4°C por 5 min.).
4. Luego se realizaron los siguientes lavados, centrifugando el pellet por 5 min. y resuspendiendo:
 - dos veces con 5 ml de TE20-0.1% sarcosil.
 - dos veces con 5 ml de TE20.
5. Se resuspendieron las células en 1ml de TE-25% sacarosa.

6. Se agregaron 30 l de lisozima (50 mg/ml) y 400 l de EDTA (0.25 M) a las células en TE-25% sacarosa (1ml) y se mezcló por inversión.
7. Se incubó a 37°C por 10 minutos.
8. Se agregaron 2 ml de H₂O milliQ y 200 l de SDS 10% y se mezcló.
9. Se agregaron 50 l de RNAsa (10 mg/ml).
10. Se mezcló e incubó a 37°C durante 15 min.
11. Se agregaron 50 l de proteinasa K (10 mg/ml), se mezcló e incubó durante 5 min a 37°C.
12. Se extrajo con un volumen igual de fenol:cloroformo (aprox. 4ml). Se centrifugó (5000 rpm 4°C por 15 min.) y se transfirió la fase superior (acuosa) a un tubo limpio. Se repitió hasta que la interfase se hallase limpia.
13. Se extrajo con igual volúmen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
14. Se agregaron acetato de potasio pH 4.8 (0.3 M final) y dos volúmenes de EtOH absoluto. Se mezcló por inversión.
15. Se centrifugó 10 min. máxima velocidad y se lavó el pellet con Etanol 70% (500 l).
16. Se retiró todo el Etanol, y se resuspendió en *buffer* TE.

Buffers:

TE20: 50mM Tris (pH 8), 20mM EDTA, 1M NaCl.

TE: 10mM Tris (pH 8), 1mM EDTA.

Extracción de ADN plasmídico

Se ensayaron diferentes técnicas para la extracción de plásmidos: técnica de lisis alcalina, descrita por Birnboim *et al*²⁰² y STET prep (método de *boiling*), que se describe a continuación:

Miniprep STET

1. Se cultivaron las bacterias por 16 hs. en 2 ml de LB con antibióticos.
2. Se traspasaron las bacterias a un tubo de polipropileno de 1.5 ml.
3. Se centrifugaron máxima velocidad por 30 segundos, luego se descartó el sobrenadante.
4. Se resuspendió el pellet con pipeta en 200 l de STET.
5. Se agregaron 20 l de lisozima (10mg/ml), se mezcló por inversión, y se incubó 5 min. a temperatura ambiente.
6. Se colocó la muestra en agua hirviendo (100°C) durante 1 minuto exacto.
7. Se centrifugó 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Se removió el pellet con un escarbadietes estéril.
9. Se extrajo con 200 l de fenol:cloroformo (1:1). Se recuperó la fase acuosa.
10. Se agregó igual volumen de isopropanol (si fue necesario se llevó a volumen el sobrenadante con H₂O milliQ estéril) y se dejó a temperatura ambiente 15 min.

11. Se centrifugó 5 min. a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante.
12. Se lavó el pellet con 200 l de etanol 70%.
13. Se resuspendió el pellet en H₂O milliQ estéril

Buffer STET

8% sacarosa
50 mM EDTA pH 8
50 mM Tris-HCl pH 8
0.5 % Tritón X-100

Geles de agarosa

La separación de los fragmentos obtenidos por: restricción, amplificación, extracción de ADN genómico o plasmídico, etc. fue realizada mediante electroforesis en geles de agarosa, generalmente entre 0.8 y 1.2 % (p/v) conteniendo 1-2 g/ml de Bromuro de Etidio. El perfil de bandas obtenido fue fotografiado en un sistema digital de adquisición de imágenes Bio-Rad.

Extracción de proteínas extracelulares en *E. coli*

Se prepararon proteínas extracelulares, a partir de cultivos de *E. coli*, mediante el siguiente protocolo:

1. Se cultivó la cepa de interés por 3 días, hasta obtener un pre-cultivo en fase estacionaria (2 - 5 ml en medio LB con antibióticos).
2. Se inocularon 25 ml de medio LB con 0.25 ml del pre-cultivo en fase estacionaria.
3. Cuando el cultivo llegó a una DO₆₀₀=0.6 se cosecharon las bacterias por centrifugación (8000 rpm en rotor SS34 de Sorvall a 4 °C por 60 min.).
4. Se traspasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se repitió la centrifugación tantas veces como fue necesario para que el sobrenadante estuviese totalmente libre de bacterias.
5. Se traspasó el sobrenadante con cuidado a un tubo de vidrio *corex* de 35 ml.
6. Se precipitaron las proteínas del sobrenadante (medio extracelular) con TCA 10 % final y se mezcló por inversión.
7. Se dejó precipitar en hielo por 1- 2 horas.
8. Se centrifugó la muestra durante 60 min. a 9000 rpm (rotor SS34, Sorvall).
9. Se descartó el sobrenadante, cuidando no perder el precipitado.
10. Se lavó cuidadosamente el precipitado con 2 ml de acetona fría (-20 °C), girando el tubo en forma horizontal de modo tal que todas las paredes se lavasen.
11. Se descartó con cuidado la acetona.
12. Se resuspendió el precipitado directamente en 100 µl de *buffer* de siembra para proteínas, con SDS.
13. Se analizó el perfil de proteínas en un SDS-PAGE 12%.

Electroforesis de proteínas

Las muestras proteicas fueron resuspendidas en *buffer* de siembra²⁰³ y calentadas a 100° C por 5 min. Luego fueron sometidas a electroforesis en gel discontinuo²⁰³ de poliacrilamida 12 % con SDS (desnaturalizante), cuya composición se describe a continuación (tabla 4):

Tabla 4: composición geles discontinuos de poliacrilamida.

<i>Sol. STOCK</i>	Gel de corrida 12%	X2	Stacking Gel 5%	X2
H ₂ O bd	1,65 ml	3,3 ml	0,78 ml	1,54 ml
Tris HCl	1,25 ml (1.5 M pH 8.8)	2,5 ml	1,25 ml (0.25 M pH 6.8)	2,5 ml
Acrilamida:bisacrilamida 30% (p/v) (29.2:0.8)	2 ml	4 ml	0,425 ml	0,85
SDS 20%	25 µl	50 µl	12,5 µl	25 µl
TEMED	3,5 µl	7 µl	3,0 µl	6 µl
APS 10%	50 µl	100 µl	30 µl	60 µl
Volumen Final	5 ml	10 ml	2,5 ml	5 ml

Las proteínas fueron teñidas con *coomassie brilliant blue* R-250. La solución de tinte fue usada 0.25 % (p/v) en metanol: ácido acético: agua (40:10:30). La decoloración se llevó a cabo mediante lavado con metanol 50 % (v/v) y ácido acético 12 % (v/v).

Conjugación tri- o biparental en placa

Se empleó esta técnica para lograr la transferencia de plásmidos autotransmisibles desde cepas movilizadoras (dadoras) de *E. coli* a cepas receptoras de *B. suis*, utilizando las cepas de *E. coli* S17 (biparental) o HB101 (triparental). En el caso de la conjugación triparental se empleó, además de la cepa dadora, una cepa *Helper* para lograr la transferencia de plásmidos no-autotransmisibles.

Se emplearon cultivos frescos de las cepas. El método se describe a continuación (Fig.1):

- Se cultivaron las cepas a DO estandarizada.
- Se lavaron los cultivos tres veces para retirar posibles restos de antibióticos.
- Los *pellets* se resuspendieron en aproximadamente 100 l de PBS cada uno.
- Se dividió en dos una placa sin antibióticos: zona de conjugación y zona control (se usó medio TSB).
- Se sembró por separado una pequeña estría de cada cepa en la zona control. Se mezclaron las cepas y se sembraron en la zona de conjugación sobre el filtro.
- Se incubó la placa durante 24 hs. a 30 °C.
- Se realizó una réplica a una placa con los antibióticos necesarios para seleccionar las transconjugantes.
- Se aislaron colonias (transconjugantes) en una placa nueva con antibióticos.

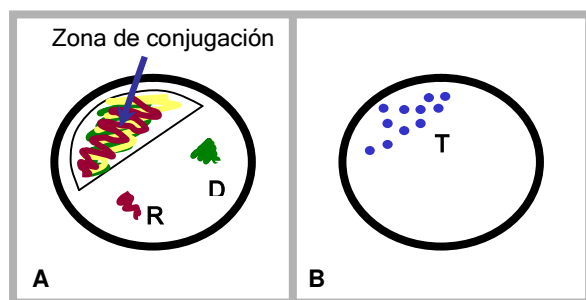


Fig.1: conjugación en placa. A:
R: cepa receptora
D: cepa dadora
B: lugar de la réplica,
T: transconjugantes (notar que las cepas parentales son incapaces de crecer en el medio selectivo).

Preparación de células electrocompetentes y electroporación

Se prepararon las células de alta eficiencia de acuerdo al protocolo descrito más adelante.

Se emplearon en cada electroporación 50 μ l de suspensión de células electrocompetentes y 1 a 2 μ l (1-10 μ g) de ADN (disuelto en agua milliQ). El procedimiento se llevó a cabo en cubetas de 2 mm (Bio-Rad).

Condiciones de electroporación:

Capacitancia	25 μ F
Voltaje	2.5 kV
Resistencia	200 Ω
Intensidad del campo	12.5 kV/cm

Electroporador: *Gene Pulser. Transfection Apparatus*, Bio-Rad.

Luego de la electroporación se incubaron las células por una hora a 37^o C en medio rico SOC*. Finalmente se plaquearon en medio selectivo.

* SOC:

SOB:	Triptona	20g
	Extracto de levadura	5g
	NaCl	0.5g
	KCl 1M	2.5 ml
	H ₂ O destilada	a 1000 ml

A un litro de la solución estéril de medio SOB se le agregaron 20 ml de una solución de glucosa 1M estéril.

E. coli de alta eficiencia para electroporación

1. Se inocularon 25 ml LB con *E. coli* TG1 y se incubó ON a 37°C con agitación.
2. Se emplearon 5 ml del cultivo ON para inocular 500 ml de medio 2×YT y se incubó a 37°C.
3. Cuando $DO_{600}=0.5-0.6$ (aproximadamente 3-4 hs.), se colocaron las bacterias en mamaderas de centrífuga pre-enfriadas y se incubó en hielo por 30 min. De aquí en adelante las células se mantuvieron en hielo todo el tiempo.
4. Se centrifugó a $4000 \times g$ por 20 min. a 4°C en un rotor pre-enfriado. Se eliminó el sobrenadante.
5. Las células se resuspendieron suavemente en 500 ml de glicerol 10% frío y se incubó en hielo por 30 min.
6. Se repitieron los pasos 4 y 5 dos veces (en total tres lavados en glicerol 10%).
7. Se estimó el volumen del pellet y se resuspendió en el mismo volumen de glicerol 10% frío.
8. Inmediatamente se dividió en alícuotas de 50 μ l, que se colocaron en tubos estériles enfriados previamente.
9. Los tubos se congelaron en un baño de hielo seco-etanol y se conservaron a -80°C.

comentarios

- Modificado de "Current Protocols in Molecular Biology".
- Dos factores son importantes, mantener las células en hielo todo el tiempo y tratarlas suavemente (centrifugar sólo a $4000 \times g$ y resuspenderlas con pipetas de vidrio o tips cortados. No usar vórtex).
- Usando este procedimiento es posible obtener células que dan 10^9-10^{10} transformantes por μ g de plásmido, cuando se usan 10 ng de ADN por transformación.

2×YT por litro:

Triptona	16 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g

Inducción

Se usó L-arabinosa a una concentración final 0.02% (p/v) para inducir la expresión de los genes bajo el promotor pBAD²⁰⁴ (vector pBBAD 18T)²⁰⁵, en ensayos en *E. coli* (Fig.2).

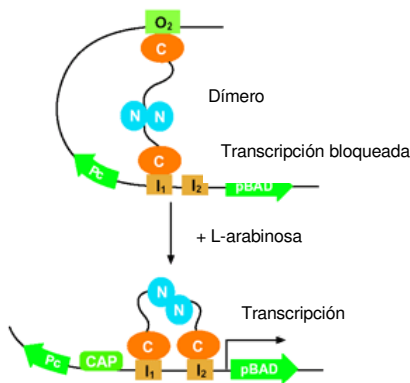
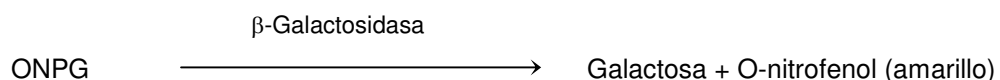


Fig.2: modelo de inducción para el promotor pBAD, L-arabinosa dependiente.

Ensayo de actividad β -Galactosidasa

1. Se preparó un cultivo ON de las bacterias a ensayar y se transfirió 1 ml a un tubo *ependorf*.
2. Se centrifugó por 60 seg. para obtener el *pellet*. Se descartó el sobrenadante.
3. Se resuspendió en 0.5 ml de *buffer Z*.
4. Se centrifugó por 60 seg. y se descartó el sobrenadante.
5. Se resuspendió en 1 ml de *buffer Z*.
6. Se leyó la DO a 600nm.
7. Se lisaron las células: se agregaron 2 gotas de cloroformo y 1 gota de SDS 0.1% a cada tubo. Se mezcló bien (20 seg. con vórtex).
8. Se transfirieron 0.5 ml de cada tubo a *ependorfs* nuevos.
9. Se incubaron los *ependorfs* a 28°C por alrededor de 5-10 min. (para llevarlos a temperatura). Se agregaron 0.1 ml de ONPG y se empezó a tomar el tiempo. Se incubó a 28°C hasta que se desarrolló un color amarillo/verde.
10. Se detuvo la reacción por agregado de 0.2 ml de 1.5 M Na_2CO_3 y se detuvo la toma de tiempo.
11. Se centrifugó por 2 min. para remover los restos celulares.
12. Se leyó la DO del sobrenadante a 420 nm.
13. Idealmente la aparición del color amarillo/verde debería tomar entre 5-10 min. Si el color aparece muy pronto se debe volver a la muestra original, diluirla en *buffer Z* y repetir desde el paso 11.
14. Se calcularon las unidades :



La cantidad de o-nitrofenol es proporcional a la cantidad de enzima presente y al tiempo tomado para que la enzima reaccione con el ONPG.

Transformación a unidades Miller:

$$\text{unidades } \beta\text{-Galactosidasa} = \left(\frac{\text{lectura a 420nm}}{\text{lectura a 600 nm} \times \text{tiempo reacción ONPG en min.} \times \text{dilución usada}} \right) \times 1000$$

↓

Vol. del cultivo usado

Materiales

- ❖ *buffer Z* 250 ml
 - Na₂HPO₄ • 7H₂O 4.025 g (0.06 M)
 - NaH₂PO₄ • H₂O 1.375 g (0.04 M)
 - KCl 0.188 g (0.01 M)
 - MgSO₄ • 7H₂O 0.062 g (0.001 M)
 - β-mercaptoetanol 0.675 g (0.05 M)
- NO AUTOCLAVAR!! ajustar pH= 7.0
- ❖ *buffer fosfato*
 - Na₂HPO₄ • 7H₂O 4.025 g (0.06 M)
 - NaH₂PO₄ • H₂O 1.375 g (0.04 M)
- ❖ SDS 0.1%
- ❖ Cloroformo
- ❖ ONPG 4 mg/ml en *buffer fosfato* 0.1M, pH 7.0
- ❖ Carbonato de sodio(Na₂CO₃) 1.5 M
- ❖ vortex
- ❖ baño de agua a 28 °C

Sensibilidad a Colicina E1

Se estudió la sensibilidad a Colicina E1[®] (ColE1) de cepas *wild type* C600 (sensibles), mutantes C600 *tolC::Tn5* (resistentes) y las transformantes C600 *tolC::Tn5 + bepC* en un ensayo en placa. En placas LB sin antibióticos se sembraron las cepas antes mencionadas con hisopos estériles (la cepa a ensayar se sembró en placas LB + 0.02% L-arabinosa, para inducir la expresión del gen *bepC* bajo el promotor pBAD). Se dejaron secar por 30 minutos y luego se inocularon sobre las bacterias concentraciones decrecientes de la proteína (ColE1) en sentido horario (5 μ l de cada concentración). Se emplearon 4 concentraciones (Fig.3). Las placas se incubaron por 8 horas a 37^o C y luego se observó si había inhibición del crecimiento por incorporación de ColE1.

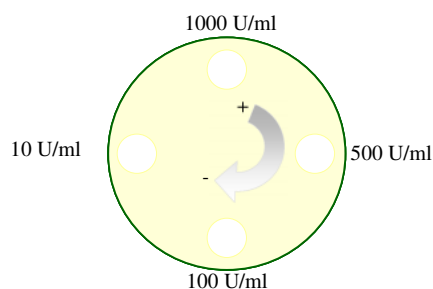


Fig.3: esquema general, ensayo de sensibilidad a Colicina E1.

[®] Sigma

Secreción de Hemolisina: Agar-sangre

Se estudió la capacidad de secretar α -hemolisina de *E. coli* en cepas *wild type* C600, mutantes C600 *tolC::Tn5* y las transformantes C600 *tolC::Tn5 + bepC* en un ensayo en placa. En la preparación de las placas se usó Agar-Base[®] y sangre de carnero defibrinada[®] (5%). Las cepas se sembraron con escarbadiantes estériles y las placas se incubaron por 24 horas a 37^o C, luego se observó si se producía halo de hemólisis debido a la difusión de la alfa-hemolisina.

[®] Britania

[®] Lab. Gutierrez

Curvas de crecimiento

Se cultivaron las células en 50 ml de medio rico, de la forma antes descrita. Se tomaron alícuotas de 1 ml en forma estéril a intervalos regulares y se midió absorbancia de la suspensión bacteriana a 600 nm. Se graficó la Densidad Óptica en función del Tiempo (OD_{600nm} vs. T).

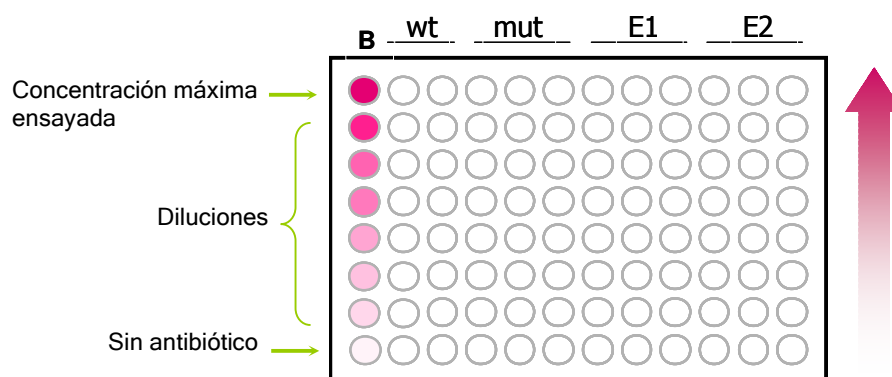
Ensayos de microdilución

Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) de distintas drogas (antibióticos, detergentes, etc.) por el método de diluciones seriadas en medio líquido Müller-Hinton® (MH). Este medio es el recomendado para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en medio líquido. Se utilizaron placas de 96 pocillos, primero se preparó la placa con las diluciones seriadas de la droga a ensayar: en la primer fila (la fila superior) se colocaron 200 μ l de medio MH con la droga en su concentración máxima ensayada. En las filas siguientes se colocaron las diluciones seriadas al medio. En la última fila (fila inferior) se colocaron 200 μ l de medio MH sin la droga. Luego se inocularon 50 μ l de suspensión de bacterias en cada pocillo: en todos los casos la primera de las columnas sirvió de blanco para los ensayos (en esta columna no se inocularon bacterias); en las dos columnas siguientes (2º y 3º) se inoculó la cepa silvestre, en las tres columnas siguientes (4º, 5º y 6º) se inoculó una cepa hipersensible, en las columnas restantes (7º-12º) se inocularon las cepas a ensayar (cada una por triplicado); ver Fig.4.

Se emplearon como controles la cepa silvestre C600 de *E. coli* y la cepa hipersensible C600 *tolC::Tn5*.

® Britania.

Fig.4: Preparación de la placa *multiwell* para los ensayos de microdilución.



Las placas se incubaron 16 hs. en agitación (200 rpm/min). Luego, la densidad óptica fue medida en un lector Elisa y se graficó OD_{600nm} vs. $\text{Log}(\text{conc. droga})$.

Estos ensayos se llevaron a cabo de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (ex-NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards)²⁰⁶.

Test de difusión en disco

Los ensayos de difusión en agar en *E. coli* fueron realizados empleando agar MH suplementado con 0,2% de L-arabinosa, según lo indicado en el estándar M2-A9 del CLSI. Las placas se inocularon con 200 μ l de una suspensión de bacterias conteniendo 10^5 ufc/ml. En cada placa se colocaron discos de papel Whatman de 6 mm de diámetro conteniendo 5 μ l de la droga en estudio. En el caso de *B. suis* se empleó medio TSB. Las células fueron incubadas durante 16 h (*E. coli*) o 24 h (*B. suis*). El halo de inhibición del crecimiento se consideró como medida inversa de la resistencia de las cepas analizadas.

Quantificación de la adhesión por cristal violeta

La adhesión bacteriana a placas de poliestireno fue ensayada por el método de cristal violeta.

1. Se cultivó un pre-inóculo en medio TSB (o medio mínimo GH) con agitación hasta llegar a una DO_{600} de aproximadamente 1.0.
2. Luego se realizó una dilución 1:1000 de este cultivo, que se inóculo en placas de 96 pocillos. La placa se incubó por horas o por 1, 2 y 3 días para medir el progreso de la adhesión.
3. En cada tiempo se eliminó el medio de cultivo y las bacterias no ancladas fueron removidas mediante dos lavados con PBS.
4. Las bacterias adheridas fueron cuantificadas por tinción con 0.01 % (w/v) cristal violeta (Acros Organics, Geel, Belgium). Se agregaron 100 μ l de cristal violeta a cada pocillo y se incubó por 15 min. a TA, en oscuridad.
5. El exceso de cristal violeta fue removido por aspiración y luego se realizaron tres lavados sucesivos con 150 μ l de PBS.
6. El cristal violeta unido fue disuelto con 100 μ l de etanol absoluto y cuantificado por medición de la absorbancia a 595 nm utilizando por lo menos seis réplicas por muestra. Se empleó un lector de placas Beckman.

Secuenciación de ADN, análisis de secuencia

En todos los casos, las muestras se secuenciaron con los kits *Big Dye Terminator Chemistry* (v1.0) de *Applied Biosystems*, en un secuenciador ABI 377.

Para el análisis por computadora de las trazas se empleó el programa Chromas Lite, versión 2.0 de Technelysium Pty Ltd.

Construcción de árboles filogenéticos

Se emplearon métodos filogenéticos para estudiar posibles relaciones evolutivas entre moléculas.

En la construcción de alineamientos múltiples se empleó el programa ClustalX²⁰⁷ (versión 1.81), disponible para uso público en <http://inn-prot.weizmann.ac.il/software/ClustalX.html>. En la construcción de árboles filogenéticos se empleó PAUP 4.0²⁰⁸ <http://www.sinauer.com>. Este programa usa los archivos creados por ClustalX para la construcción de los árboles. Se empleó Treeview²⁰⁹, de distribución gratuita

en <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>, para visualizar y editar el diseño de los árboles contruidos.

En la construcción de árboles se utilizó el método de distancia *Neighbor Joining*, la confiabilidad (la probabilidad de que miembros de un clado dado pertenezcan siempre a ese clado) de los árboles y la estabilidad estadística de cada nodo fueron estimadas por los métodos de *Bootstrapp* y *jackknife* (1000 repeticiones).

Búsqueda de promotores

Las búsquedas se llevaron a cabo usando la metodología CPR-MOSS* disponible para uso público en el sitio web <http://soar-tools.wustl.edu>. Brevemente, se ingresa como entrada una secuencia de ADN de longitud mayor o igual a 46 pares de bases y un criterio de búsqueda (%FP: porcentaje de falsos positivos o SCC: Coeficiente de Correlación Estandarizado (*Standardized Correlation Coefficient*)). La elección de un criterio de búsqueda permite fijar el umbral que determina si una cadena es o no promotora. Como salida se devuelven todos los promotores predichos que satisfacen este criterio de búsqueda.

* V. Cotik, "UNA PROPUESTA CONEXIONISTA PARA EL RECONOCIMIENTO Y PREDICCIÓN DE PROMOTORES EN SECUENCIAS DE ADN DE PROCARIOTAS"

Southern blot

Los ensayos de Southern Blot se realizaron siguiendo el protocolo establecido en "Molecular Cloning". El ADN genómico fue cortado a totalidad empleando al menos dos enzimas de restricción. Una vez realizada la separación en gel de agarosa, este se transfirió por capilaridad a membranas de HyBond N+ (GE Life Sciences). Para cada una de las mutantes se diseñaron sondas específicas marcadas radiactivamente con dCT32P utilizando el sistema Prime-a-Gene (Promega). Para la eliminación del exceso de nucleótido marcado se utilizó el sistema NucAway Column (Ambion, Applied Biosciences). El ADN se fijó por U.V. a la membrana siguiendo las indicaciones del fabricante, la cual se incubó durante 2 hs. a 42 °C en solución de PreHibridización: 2x SSC; SDS 1%; solución Denharts 5x (polivinilpirrolidona 10 g/l, BSA 10 g/l, ficoll 10 g/l) y ADN de esperma de salmón. Posteriormente, se adicionó la sonda marcada y se incubó durante 12-14 h a 42 °C. Luego se realizaron dos lavados de astringencia creciente con 2xSSC y SDS 0,1% durante 15 min a 65 °C y un tercer lavado con 0,2xSSC y SDS 0,1% durante 15 min a 42 °C. La radioactividad se detectó utilizando el Storm Image System (GE HealthCare). Las diferentes diluciones de la soluciones SCC fueron hechas a partir de una solución madre 20XSSC (NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M pH=7,0)

Construcción de una phage display library

Nos basamos en el sistema descrito por Jacobsson *et al*¹⁷⁶, que permite expresar péptidos o proteínas, fusionados a proteínas virales (en nuestro caso pVIII), en la superficie de ciertos fagos (M13). Para la construcción de la biblioteca (fig. 5) se extrajo ADN cromosomal de *Brucella suis*, el mismo fue cuantificado y se pusieron a punto las condiciones de sonicación para obtener fragmentos del tamaño deseado (0.8 a 4 Kb). Paralelamente se extrajo DNA del fagémido pG8SAET mediante una *maxiprep* y se purificó por columna. Luego se linealizó el vector, tratando con la enzima de restricción *Sna*BI.

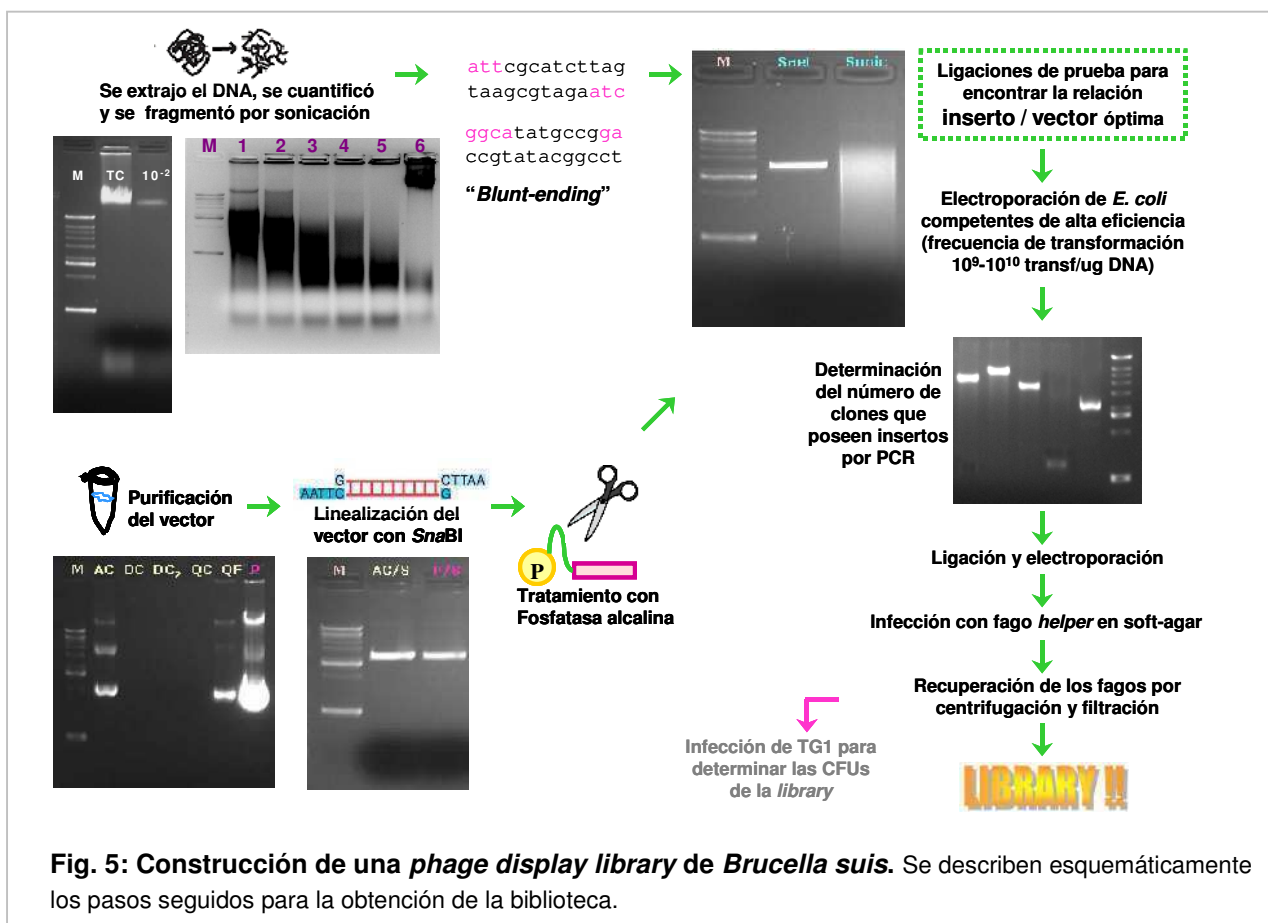


Fig. 5: Construcción de una phage display library de *Brucella suis*. Se describen esquemáticamente los pasos seguidos para la obtención de la biblioteca.

Ambos ADNs (vector y genómico) fueron tratados con enzimas modificadoras: se empleó T4 DNA polimerasa para generar extremos romos en el DNA sonicado y Fosfatasa alcalina para evitar la recircularización del vector en los pasos posteriores de ligación. Posteriormente se realizaron seis ligaciones de prueba para encontrar la relación de masa inserto/vector óptima. Se prepararon células competentes (*E. coli* TG1) de alta eficiencia, se optimizó el proceso hasta obtener células con eficiencias de transformación iguales o mayores a 1×10^{10} transf/ g DNA. Las ligaciones de prueba fueron introducidas por electroporación a estas células, junto a un control de re-ligación del vector puro. Se estudió el número de transformantes en cada caso y se identificaron las condiciones apropiadas para la ligación. Luego se determinó qué porcentaje de los clones positivos (amp^R) poseían insertos, por restricción (*Eco*RI o *Nco*I) y PCR (usando *primers* específicos complementarios al vector en zonas lindantes al sitio de clonado múltiple, Phage D. *forward* y *reverse*). En las condiciones elegidas,

aproximadamente el 90% de los clones portaban insertos de diversos tamaños. Se realizaron ligaciones a gran escala para obtener material suficiente para la *library*, se electroporó y se recuperó en 20 ml de medio LB. Luego de transcurrida una hora de recuperación se agregó ampicilina al cultivo a una concentración final de 50 g/ml y, simultáneamente, se tomó una alícuota para determinar la cantidad de clones amp^R, obteniéndose 4×10^6 clones.

Al día siguiente 2 ml del cultivo fueron infectados con fago *helper* R408 (Promega, 1.3×10^{13} PFU/ml) (moi 100) y se plaqueó en *soft agar*. Más tarde los fagos se recuperaron por centrifugación y filtración, se alicuotaron en porciones de 500 l y se conservaron a -80°C . Para determinar el número de unidades formadoras de colonias en la *library* se infectaron *E. coli* TG1 con una alícuota diluida de la misma. El título obtenido fue de 5.2×10^{11} cfu/ml, también se volvió a determinar el porcentaje de clones que poseían insertos por PCR, obteniéndose nuevamente que el 90% de los clones portaban insertos. Estos dos valores juntos indican que el tamaño de la *library* supera ampliamente el número de clones necesarios para obtener una buena representatividad del genoma.

Un protocolo detallado de cada uno de estos pasos se puede obtener en Jacobsson *et al*¹⁷⁶.

Panning

El *panning* consiste en el enriquecimiento de una *library* de fagos presentadores de péptidos de *B. suis* con afinidad al ligando al que se lo enfrenta. En este caso el enriquecimiento se realizó enfrentando estos fagos a Fibronectina o Fetuína. Para ello se siguió el protocolo establecido en el trabajo de Jacobsson *et. al.*¹⁷⁶. Para las eluciones se emplearon dos variantes, la primera es la descrita en el protocolo, que se basa en un cambio drástico en el pH. La segunda es por competencia y consiste en eluir los fagos utilizando una solución del ligando cinco a diez veces más concentrada que la que se utilizó para inmovilizarlo (100 g/ml de ligando en Carbonato de Sodio 50mM para inmovilizar, 500 g/ml para eluir).

Los pasos para realizar el *panning* fueron los siguientes:

1. Se inmovilizó el ligando en los pocillos de una placa de 96 *wells* (MaxiSorp, Nunc) a una concentración final de 10-100 g/ml en *buffer* carbonato de sodio 50 mM pH 9.7, se incubó por una hora a temperatura ambiente. En este caso se eligió utilizar una solución cuya concentración fue de 50 g/ml.
2. Se enjuagaron los pocillos con PBS-T (*buffer* fosfato salino con 0.05% Tween20), y se bloquearon con PBS-T BSA 0.1% durante 30 minutos.
3. Se lavaron con PBS-T y se agregaron 200 l de la biblioteca de fagos. Se permitió que el *panning* proceda durante cuatro horas a temperatura ambiente o a 4°C ON. Como se utilizó BSA para bloquear, entonces esta misma proteína se agregó a la *library* antes de colocarla en los *wells*.
4. Se lavaron exhaustivamente los pocillos con PBS-T. (25-30 lavados).
5. Se eluyeron los fagos adheridos al ligando por un cambio drástico de pH (que consiste en adicionar 50 mM citrato de sodio con 150 mM cloruro de sodio pH 2 y dejar durante cinco minutos). Inmediatamente se retiró el líquido del pocillo y se neutralizó el pH de esta solución adicionando 25 l de Tris pH 8, 2M. Alternativamente se realizaron eluciones por competencia, empleando una

solución de ligando libre 5-10 veces más concentrada que la fase inmovilizada. En ambos casos se empleó el eluato obtenido para realizar las infecciones subsiguientes.

6. En las infecciones se emplearon 50 μ l de cultivo en fase exponencial de *E. coli* TG1 en medio LB más 50 μ l del eluato obtenido en el paso anterior. Se incubó durante 20 minutos.
7. Se rastrilló la mezcla sobre placas LB-amp. y se incubó a 37°C ON. Nota: los autores encontraron que incrementar la cantidad de eluato utilizado en las infecciones no produce un incremento lineal en el número de ufc, por lo cual no se utilizaron más de 50 μ l por infección.
8. Se utilizaron dos infecciones de 1 y 10 μ l de eluato para determinar el título de los fagos recuperados.
9. Se contaron las colonias de la titulación y se empleó este valor para estimar el progreso de la selección por afinidad.
10. En las otras placas se resuspendieron las colonias adicionando 1 ml de medio LB líquido por placa.
11. Las bacterias resuspendidas fueron infectadas con 10-50 μ l de fago *helper* (1×10^{12} pfu/ml) durante 30 minutos para iniciar el proceso de producción de nuevos fagos.
12. Se agregaron 5 ml de agar blando (0.5%) por cada mililitro de suspensión de bacterias+fagos y se volcó la mezcla sobre placas LB amp. Se incubó toda la noche a 37°C.
13. Se transfirió todo el agar blando de cada placa a un tubo de centrifuga y se incubó bajo fuerte agitación durante cuatro horas para liberar a las partículas fágicas.
14. Se centrifugó a 35.000 xg durante 20 minutos para separar a los fagos. Se removieron las bacterias remanentes por filtración (0.22 μ m).

Luego de cada ronda de *panning* se obtiene una fracción enriquecida en fagos que presentan afinidad al ligando inmovilizado. Se espera que esta afinidad aumente en las sucesivas rondas.

Se realizaron tres rondas de *panning* para cada ligando; luego de cada ronda se aislaron y secuenciaron diferentes clones para corroborar el buen funcionamiento del proceso.

Colony PCR de colonias provenientes del *panning*

Los insertos clonados en el fagémido pG8SAET fueron amplificados y secuenciados con los *primers* Phage D. *Forward* y *Reverse*. Estos oligonucleótidos son complementarios al vector y aparean en zonas lindantes al sitio de clonado múltiple, por lo que el tamaño del fragmento amplificado está determinado por el tamaño del inserto (Ver Fig.6). Se empleó el mismo protocolo de *colony* PCR antes descrito.



Fig.6: esquema básico del vector usado en la biblioteca. Zonas de apareamiento de los *primers*.

Obtención de fagos a partir de un único clon

Se aislaron e identificaron clones de interés (TG1+ fagémido que porta algún gen de interés, amp^R). Se inocularon 3 ml de LB y se incubó a 37 °C, con agitación hasta llegar a fase exponencial, aproximadamente 5 hs. Los cultivos en fase exponencial fueron infectados con el fago *helper* R408 (Promega) y se incubó nuevamente a 37°C toda la noche.

Se centrifugó el cultivo a 10000 rpm por 5 minutos y se filtró el sobrenadante (filtro de 0.22 μm). De esta forma se obtuvo un *stock* de fagos libres de bacterias. Estos se conservaron a -80°C, en alícuotas de 500 μl.

Titulación de los fagos

Tanto cuando se avanza con el enriquecimiento de la biblioteca como cuando se obtiene un *stock* de fagos proveniente de un único clon se debe conocer el título de fagos con el que se trabaja. Para ello se realizó el siguiente protocolo:

1. Se infectaron 50 μl de un cultivo de *E. coli* (TG1) con 1 μl del fago a titular (se utilizaron diluciones seriadas del fago 10^{-4} - 10^{-8}).
2. Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente, de modo que proceda la infección.
3. Se depositaron cuatro gotas de 10 μl cada una sobre una placa LB ampicilina previamente secada, de cada una de las infecciones y se incubó a 37°C ON.
4. Se contaron la cantidad de colonias presentes en cada placa (provenientes de cada gota) y se realizaron los cálculos pertinentes teniendo en cuenta que cada colonia corresponde a una única bacteria que fue infectada por una única partícula de fago.
5. Se expresó el título de cada preparación de fagos como UFC/ml.

Evaluación de la afinidad de los péptidos seleccionados: panning

Una vez finalizadas las rondas de panning se obtuvieron candidatos que cumplían con todos los criterios de selección estipulados (ver Resultados). Con el fin de evaluar la afinidad de cada péptido de *B. suis* expuesto en la superficie de los fagos de interés se emplearon diversos métodos. En primer lugar se obtuvo un *stock* de cada uno de estos fagos de la forma antes descrita; con ellos se llevaron a cabo ELISAs y pannings para comparar la afinidad del fago al ligando con el que fue seleccionado vs. otros ligandos control. Para empezar se estudió la afinidad por *panning* de un *stock* puro.

1. Se inmovilizaron el ligando de interés y un control negativo en pocillos de una placa *MaxiSorp* (Nunc), en este trabajo se empleó como control negativo seroalbúmina bovina (BSA).
2. Luego se adicionaron 200 μl de *stock* de fago a cada pocillo, y se incubó durante 2 hs. a temperatura ambiente.
3. Se realizaron 25 lavados con PBS-T para eliminar a las partículas del fago que no se unieron al ligando, y para liberar a las que se unieron de modo inespecífico.

4. Se eluyeron los fagos adheridos específicamente, y con estos se infectó *E. coli* TG1 del modo antes descrito. Estas bacterias se plaquearon en medio selectivo y se incubaron toda la noche.
5. Se contaron las colonias, y se calculó el título de los fagos recuperados en cada pocillo.
6. Se comparó el título de los fagos obtenidos en los *pannings* con el ligando de interés y los obtenidos con BSA.

La idea es que cuanto mayor sea la afinidad del fago por el ligando, más fagos quedaran retenidos con lo cuál el título de fagos eluidos debiera ser mayor. Se espera entonces que si el péptido presenta una afinidad específica por el ligando seleccionado, entonces se han de recuperar más fagos al haberlos enfrentado a éste que a BSA. En teoría, cuando un péptido es aislado debido a una interacción específica a un ligando, esto se manifiesta con una adhesión a este ligando de 100 a 1000 veces mayor que a otro ligando no relacionado¹⁷⁶.

Evaluación de la afinidad de los péptidos seleccionados: ELISA

1. Se inmovilizó el antígeno en la placa (MaxiSorp, Nunc). Se empleó 1 µg/pocillo. Se realizó una dilución del stock en PBS y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente (TA).
2. Se lavó 3 veces con PBS 1X – Tween (0,05%)
3. Se bloqueó con PBS BSA 3%, 150 µl por *well* durante 2 hs a TA, o alternativamente ON a 4º C.
4. Se lavó 3 o 4 veces con PBS 1X – Tween (0,05%)
5. Se agregó una dilución del *stock* de fago a ensayar* (150 µl por *well*) y se incubó durante 2 hs a TA, o alternativamente ON a 4º C.
6. Se lavó 3 veces con PBS 1X – Tween (0,05%)
7. Se agregó el anticuerpo primario, (dilución 1:1000 en PBS 1X, molico 1%) Este anticuerpo monoclonal reconoce al fago M13 y está conjugado a HRP.
8. Se lavó 3 veces con PBS 1X – Tween (0,05%)
9. Se reveló con solución de OPD: se pesó OPD y se obtuvo una solución 2mg/ml en buffer OPD, se agregó a último momento H₂O₂ (0.03% final). Se colocaron 50 µl por pocillo, y luego de que apareció color, se frenó la reacción con 50 µl de H₂SO₄ 4N. Se midió la absorbancia a 480nm en un lector de placas Beckman.

Como control negativo se reemplaza el ligando inmovilizado por otro no relacionado.

* En los casos en que se empleó esta técnica para dosar anticuerpos, en este paso se reemplazaron los fagos por diluciones del anticuerpo que se quiere titular y, en paso posteriores, se usó un anticuerpo secundario comercial anti-ratón conjugado a HRP.

Buffer OPD:

Llevar a pH 5 la solución base con la solución ácida.

Solución base: 0,1M NaH₂PO₄, 0,1M Citrato de sodio

Solución ácida: 0,1 M NaH₂PO₄, 0,1 M ácido cítrico.

Screening por expresión del E-tag (colony blot)

Una forma de evaluar el buen progreso del experimento es corroborar la expresión de un tag codificado en el vector para este fin. El pG8SAET posee un E-tag que sólo se expresa si hay expresión de la proteína fusión. La expresión de esta fusión se puede detectar mediante *colony blot*.

Se realizó un ensayo similar al que describe Jacobsson¹⁷⁶ en su trabajo. Para la detección se empleó un anticuerpo primario comercial que reconoce al *E-tag* (Amersham), y un anticuerpo secundario anti-ratón (Sigma). Los pasos con las variantes incluidas fueron los siguientes:

1. Se humedecieron membranas de nitrocelulosa sobre placas de LB con ampicilina.
2. Se transfirieron las colonias de interés y un control negativo (resistente a la ampicilina), se incubó ON.
3. Se colocaron las membranas en una caja de Petri de vidrio y se lisaron las células con vapores de cloroformo.
4. Se dejó la placa cerrada por 10 a 15 minutos.
5. Se transfirió la membrana a un contenedor con PBS-T 0.05% Tween20, y se la lavó durante 30 min. con agitación.
6. Se bloqueó la membrana con 0,1% BSA en 10ml de PBS-T durante 20 min. a temperatura ambiente.
7. Se agregaron 10ml de anticuerpo anti E-tag (dilución 1:1000 en PBS molico 1%). Se incubó 2 hs. a temperatura ambiente o, alternativamente ON a 4°C.
8. Se lavó la membrana con PBS-T tres veces durante algunos minutos. Se agregaron 10ml de anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanito (HRP) anti-ratón (dilución 1:500 en PBS molico 1%). Se incubó una hora a temperatura ambiente.
9. Se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T.
10. Se enjuagó unos minutos en PBS de modo de lavar el Tween20.
11. Se reveló usando 4-cloro-1-naftol. Para el revelado se diluyeron 15 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma) en 3 ml de metanol. Luego se agregaron 15 ml de TBS 1X y 6 l de H₂O₂ y se volcó la solución sobre la membrana. Se dejó reaccionar hasta desarrollar color. Se detuvo la reacción por dilución.

Test de aglutinación en acriflavina

Los cultivos in vitro de *B. suis* pueden sufrir variaciones en su morfología (de lisas a rugosas) que se acompañan por alteraciones de superficie que pueden modificar su estructura antigénica, su susceptibilidad a fagos y su virulencia; este proceso se llama disociación. El método elegido para detectar disociación fue el de aglutinación en acriflavina.

1. En un tubo transparente se colocó 1 ml de solución de acriflavina 0.1% p/v.
2. Se levantó la colonia a evaluar y se la resuspendió en la solución de acriflavina.
3. Se observó su comportamiento en la suspensión. Las cepas lisas se emulsionan fácilmente y producen una suspensión homogénea de células que se encuentran bajo movimiento browniano. En cambio las cepas rugosas son difíciles de emulsionar y/o se aglutinan inmediatamente.

Ensayo autoagregación

1. Se preparó un cultivo ON, de DO estandarizada.
2. Se mezcló vigorosamente por 15 segundos en vortex.
3. A intervalos regulares de tiempo se tomaron alícuotas de 150 μ l (a 0.5 cm de la superficie del líquido). Intervalos de 10 o 40 min.
4. Las alícuotas se transfirieron a una placa multiwell mantenida en hielo.
5. Al final del experimento se midió la DO₆₀₀ de toda la placa. Ver fig.7.

Tiempos medidos para *E. coli*: 10 – 500 min.

Tiempos medidos para *B. suis*: 10 – 120 min.

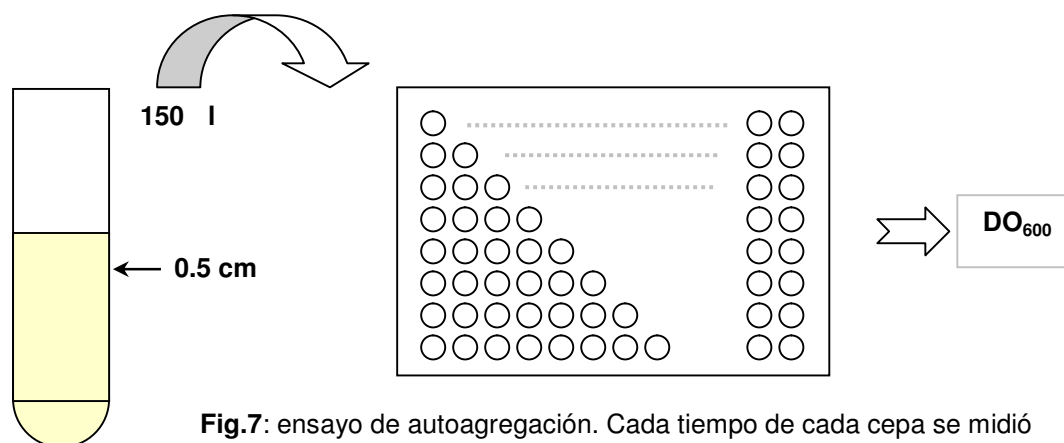


Fig.7: ensayo de autoagregación. Cada tiempo de cada cepa se midió por triplicado

Líneas celulares y mantenimiento

Para los ensayos de infección se utilizaron células HeLa (ATCC ccl-2) y la línea derivada de macrófagos murinos J774.A1 (ATCC tib-67). Las células HeLa se cultivaron en medio DMEM (Gibco Invitrogen Cell Culture) suplementado con 2 mM glutamina (Sigma-Aldrich), 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor Argentina) en presencia de 100 μ g/ml de penicilina y estreptomina. Los macrófagos J774 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Cell Culture) suplementado con 2 mM glutamina, 10% de SFB y 100 μ g/ml de penicilina y estreptomina. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera controlada con 5% de CO₂. Para el mantenimiento las células se utilizaron botellas de 25 o 75 cm³. Todos los ensayos de infección con las diferentes cepas de *B. suis* se realizaron con células entre el pasaje 4 y 12 contados partir del descongelado de un *stock* mantenido en nitrógeno líquido.

Ensayos para evaluar adhesión e invasión a células eucariotas

1. Se emplearon placas de 24 *wells* con 10⁴ células por pocillo.
2. Se reservaron 6 pocillos para cada cepa bacteriana, 3 tratados con antibiótico (de modo de contabilizar solo las bacterias que invadieron las células) y los otros tres sin antibiótico (entonces se

contabilizan tanto las bacterias que invadieron como las que sólo se adhirieron a las células). Ver esquema en fig.8.

3. Las placas se incubaron a 37°C y 5%CO₂.
4. Se emplearon diversas cepas bacterianas a una concentración de 2×10^6 ufc/ml para las infecciones. En las infecciones de células HeLa se usó medio DMEM y suero fetal bovino (SFB) 10%; sin antibióticos.
5. Se lavaron los pocillos 3 veces utilizando 500 µl de PBS por *well*.
6. Se agregaron 500 µl de la suspensión bacteriana (1×10^6 ufc totales) en cada pocillo.
7. Se incubaron las placas durante una hora, a 37°C y 5%CO₂.

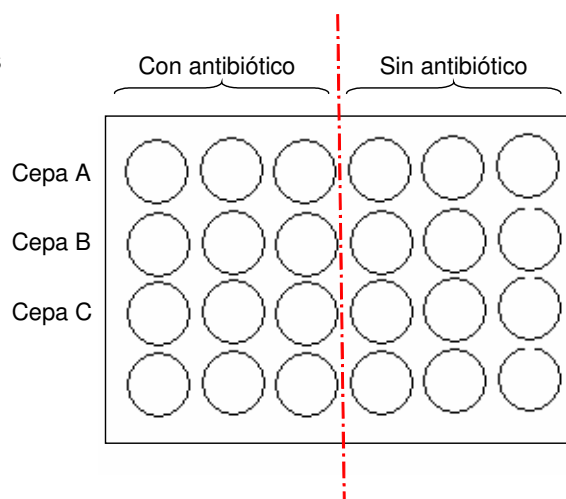
Para recuento de bacterias totales:

8. Se lavó cada well con 500 µl de PBS 2 veces.
9. Se agregaron 100 µl de Triton 0.1%.
10. Se incubó la placa 10 minutos a 37°C.
11. Se realizaron diluciones seriadas al décimo en PBS.
12. Se plaqueó en medio adecuado (5 gotas de 10 µl cada una, por cada dilución de cada pocillo) para efectuar el recuento.

Para recuento de bacterias invasivas:

13. Se incubó una hora a 37° en DMEM SFB 10% suplementado con gentamicina (20 µg/ml) para eliminar a las bacterias que no lograron invadir a las células.
14. Se lavó cada well con 500 µl de PBS 2 veces.
15. Se agregaron 100 µl de Triton 0.1%.
16. Se incubó la placa 10 minutos a 37°C.
17. Se realizaron diluciones seriadas al décimo en PBS.
18. Se plaqueó en medio adecuado (5 gotas de 10 µl cada una, por cada dilución de cada pocillo) para efectuar el recuento.

Fig.8: Esquema de la placas



Ensayos de replicación intracelular en células eucariotas

Se emplearon placas de 24 *wells* con 10^4 células por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C y 5% CO₂. En las infecciones de células HeLa se usó medio DMEM con suero fetal bovino (SFB) 10%. En las infecciones de células J774 se usó medio RPMI con SFB 10%.

Las MOI para HeLa fueron de 1:50 a 1:100; mientras que para macrófagos J774 fueron de 1:20.

Los pasos subsiguientes de la infección fueron idénticos a los descritos para medir adhesión e invasión en el protocolo anterior. Sólo se emplearon diferentes tiempos de incubación. En general se midió la cantidad de ufc intracelulares a las 8, 24 y 48 horas post-infección. Se realizaron los recuentos de la forma antes indicada. En todos los casos se incluyó un control silvestre y los recuentos se realizaron por triplicado.

Infección HeLa/ competencia con candidatos del panning

Se evaluó la capacidad de los fagos que expresan en superficie posibles adhesinas de *B. suis* de afectar la interacción de *Brucella* con la célula hospedadora. Se empleó una MOI 50:1

Para cada infección se realizaron 3 repeticiones → 3 *wells* x fago

Se incluyeron como controles: *wells* sin fago, indica el máximo de infección.

wells con fago control, se empleó un fago no relacionado.

Pasos:

1. Se emplearon placas de 24 *wells* con 10^4 células HeLa por pocillo.
2. Se estandarizó el título de los fagos a usar (1×10^8 UFC/ml).
3. Se mezclaron en *ependorfs* 1.3 ml de bacterias en DMEM (MOI 50:1) + 200 μ l fagos.
4. En los *wells* sin fagos se emplearon 1.3 ml de bacterias en DMEM + 200 μ l PBS.
5. Se inoculó cada *well* con 500 μ l de la mezcla de bacterias y fagos.
6. Se incubó 1 hora en estufa (37°C, 5% CO₂).
7. Se lavó 3 veces con PBS 1X (para eliminar las bacterias no adheridas).
8. Se agregaron 100 μ l Triton X-100 0.1% y se incubó 5 min. a 37°C (para lisar las células).
9. Se realizaron diluciones seriadas al décimo en PBS (hasta dilución 10^{-5}).
10. Se plaquearon gotas de 10 μ l de cada dilución. Se incluyó también un control retrospectivo del inóculo empleado, para asegurar la multiplicidad de infección.
11. Se incubaron las placas ON a 37°C.
12. Se hizo recuento de las colonias presentes en la menor dilución en la que se podía contar.

Inmunofluorescencia, Microscopía de fluorescencia y confocal

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos conteniendo un cubreobjeto circular de 12 mm. Los ensayos de infección se realizaron según el método previamente descrito, empleando cepas capaces de expresar GFP. A los tiempos establecidos las células se fijaron con paraformaldehído 4%, se

lavaron 3 veces con PBS y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos utilizando Mowiol 4-88 20% (Polysciences, Inc.) como protector de la fluorescencia (*antifade*). Las muestras fueron observadas por microscopía de fluorescencia (Leica DM, IRB) o por microscopía confocal (Pascal).

En los casos en los que sólo se querían observar bacterias al microscopio, se emplearon diversas cepas capaces de expresar GFP, se las fijó con paraformaldehído 4%. Se realizaron varios lavados por centrifugación y se montaron de la misma forma antes descrita.

Para las inmunofluorescencias se empleó un protocolo de fijado idéntico al anterior. Luego se incubó por 30 min. con el anticuerpo primario correspondiente a cada caso (dil 1:50). Se realizaron tres lavados con PBS BSA. Se incubó por 30 min. con el anticuerpo secundario, se empleó un anticuerpo comercial anti-ratón conjugado al fluoróforo Cy3 (dil 1:250). Se realizaron otros tres lavados con PBS BSA, y un último lavado con PBS. Se montó con Mowiol y se observó al microscopio.

Infección en ratones BALB/c

Ratones BALB/c hembras de 8 semanas de vida (5 ratones por grupo por tiempo) fueron inoculados intraperitonealmente con una suspensión de 5×10^5 ufc en PBS de *B. suis* 1330, *bepC::* o *bepC::* + pBBR1-*bepC*. A las 2, 3, 5 y 7 semanas de infección los ratones fueron sacrificados. Se les extirpó el bazo y tras el procesamiento del mismo se realizaron diluciones seriadas a fin determinar el número de bacterias por recuento en medio TSB. Las ufc fueron determinadas después de 3-4 días de incubación.

Generación de anticuerpos policlonales anti-BmaC en ratón

Materiales:

Antígeno inyectado: proteína fusión PVIII-BmaC, purificada a partir de producción de fagos.

Concentración Ag: 40 g/200 l. Inoculaciones sin adyuvante

Ratones: 5 machos C57 de 6 semanas.

El esquema de inmunización y la manipulación de los animales fueron llevados a cabo por personal entrenado del bioterio de la FIL.

Esquema de Inmunización (por ratón)

Se realizaron tres inmunizaciones subcutáneas de 0,2 ml cada una, sin adyuvante, a los días 0, 14 y 28. En las inoculaciones se empleó una solución acuosa de proteínas. Cuatro a siete días después de la tercera inoculación, se efectuó la sangría total de un animal para determinar el título de anticuerpos por ELISA. Luego se realizó una última inoculación el día 42 y se procedió a la sangría del resto de los animales, que se llevó a cabo 7 días después.

Todas las extracciones de sangre se efectuaron con los animales anestesiados con ketamina y xilacina (80mg/kg y 5 a 10 mg/kg respectivamente).

Preparación de suero a partir de sangre.

La sangre extraída se incubó durante 2 hs a 37° C y luego ON a 4° C para la formación y contracción del coágulo. Luego se centrifugó 5000 rpm durante 15 min. para separar los glóbulos rojos remanentes del suero. Se transfirió el suero a un tubo limpio y estéril y se conservó a 4°C. La especificidad del antisuero fue testeada mediante ELISA. Los sueros de los cinco ratones se alícuotaron y conservaron como antisueros independientes a -20°C. No es recomendable mezclar los antisueros de diferentes animales o de diferentes sangrados del mismo animal por la posible presencia de anticuerpos *crossreactivos* o condiciones ambientales de cada inmunización.

Purificaron de ARN

(modificado a partir de QUIAGEN RNeasy Mini Kit Cat. No. 74106).

Este protocolo se empleó en la obtención de ARN de la cepa parental *B. suis* M1330 y mutantes derivadas. Se adaptaron los procedimientos aconsejados por los manuales del *kit* a lo propuesto por Covert *et al*²¹⁰.

1. Se centrifugaron 0.5 ml de cultivo (5000 rpm por 5 min)

Lisis

2. Se resuspendió el pellet en:
 - + 84 l TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8)
 - + 15 l SDS 10%
 - + 1 l proteinasa K 10 ug/ul
3. Se incubó a 37°C por 1 hs. Luego se agregaron:
4. + 600 l RLT
5. + 6 l -mercaptoetanol

Retención en la columna. Se agregaron:

6. + 700 l EtOH 75% en H₂O DEPC
7. Se mezcló por pipeteo
8. 700 l a la columna RNeasy spin column
9. Se centrifugó a 10000 rpm por 30 seg
10. Se descartó el eluído.

Lavados. Se agregaron:

11. + 500 l RW1
 12. Se centrifugó a 10000 rpm por 30 seg
 13. Se descartó el eluído
 14. + 500 l RPE
 15. Se centrifugó a 10000 rpm por 30 seg
 16. Se descartó el eluído
 17. + 500 l RPE
 18. Se centrifugó a 10000 rpm por 30 seg
 19. Se descartó el eluído
 20. Se centrifugó a 10000 rpm por 30 seg
- Se descartó el eluído

Elucion. Se agregaron:

21. + 30 l H₂O DEPC
22. Se centrifugó a 10000 rpm por 60 seg

Visualización: 4 l en gel de agarosa 1% (se incubó a 65°C por 5 min antes de sembrar)

Degradación de ADN genómico

(Promega RQ1 RNase-Free DNase Part No. M610A)

1. Se emplearon 2 g de ARN. Se agregaron:
2. + 1 µl RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer
3. + 1 l RQ1 RNase-Free DNase
4. + hasta 10 l Agua DEPC
5. Se incubó a 37°C x 3 hs. Luego se agregó:
6. + 1µl RQ1 DNase Stop Solution
7. Se incubó a 65°C x 10 min. para inactivar la DNasa.

Síntesis de cDNA

(SuperScript. III de síntesis de cDNA para RT-PCR Cat. No: 18080-051)

1. Se partió de 1 g de ARN tratado con RQ1 DNase. Se agregaron:
2. + 1 l 50 ng/µl random hexamers
3. + 1 l 10 mM dNTPs
4. + hasta 10 l H₂O DEPC
5. Se incubó a 65°C x 5 min
6. Hielo x 1 min, y luego se agregaron:
7. + 2 l 10X RT *buffer*
8. + 4 l 25 mM MgCl₂
9. + 2 l 0.1 M DTT
10. + 1 l RNaseOUT (40 U/µl)
11. + 1 l SuperScript III RT (200 U/µl)
12. Se incubó a 25°C x 10 min
13. Se incubó a 50°C x 50 min
14. Se incubó a 85°C x 5 min
15. Hielo

Degradación del RNA

16. + 1 l de RNasa H
17. Se incubó a 37°C x 20 min
18. Se conservó a -20°C.

Idem sin SuperScript III RT como control**Reacción de PCR**

- 1 l cDNA
- 1 l 10 M oligo Fwd
- 1 l 10 M oligo Rev
- 0.25 l 10X Buffer
- 0.5 l 50 mM MgCl₂
- 0.5 l 10 mM dNTPs
- Hasta 25 l con H₂O

Ciclo:

- 94°C x 4 min
 - 94°C x 30 seg
 - 57°C x 30 seg
 - 72°C x 20 seg
 - 72°C x 7 min
- } x 33

Visualización: 4 l en gel de agarosa 1.5%

Obtención de mutantes por inserción: bepC

Los *primers* BepC *Forward* y *Reverse* fueron diseñados para amplificar un fragmento de ADN de 2519 pb, que contiene al gen *bepC* de *B. suis* y sus zonas flanqueantes (Fig.9 a). Los *primers* Int. *Sense* y *Antisense* se diseñaron para lograr secuenciar completamente el fragmento mencionado anteriormente. Los *primers* Omega A y D se utilizaron para confirmar las mutantes en *B. suis* por PCR. Los *primers* BepC *Forward* e Int. *Antisense* se emplearon, además, para amplificar un fragmento de ADN de 1933 pb, que contiene al gen *bepC* de *B. suis* exclusivamente (Fig.9 b).

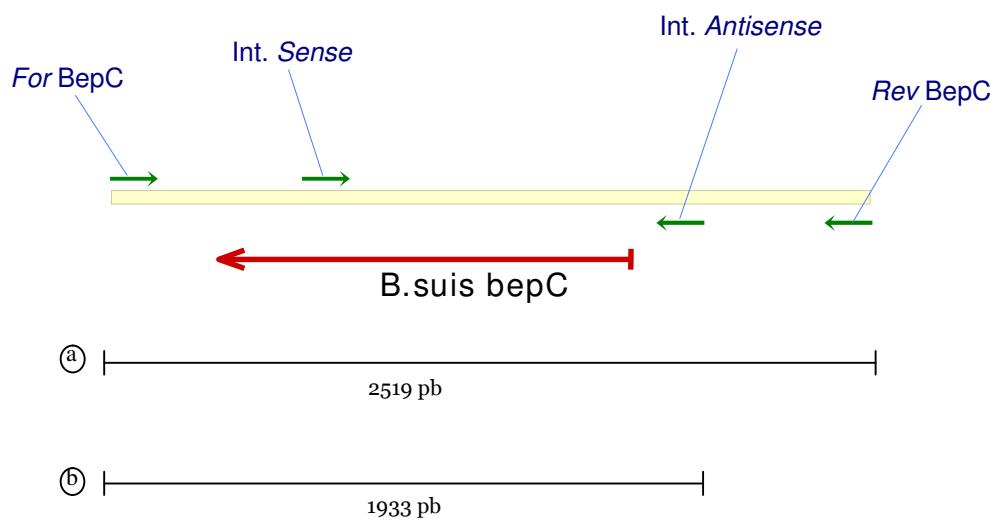


Fig.9: Esquema general, zonas de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados.

Un fragmento de ADN de 2519 pb, conteniendo al gen *bepC* de *B. suis* y sus zonas lindantes, fue amplificado con *primers* específicos y clonado en el vector pGEMT-easy. Se empleó la enzima de restricción *StuI* para introducir el *cassette* de resistencia a espectinomicina Ω en medio del amplicón. La presencia de grandes porciones de ADN (más de 1000 pb a cada lado del *cassette*) incrementa las posibilidades de que haya recombinación homóloga en estos sitios. Esta construcción fue empleada para electroporar células competentes de *B. suis*. Se obtuvieron dobles recombinantes, que incorporaron la construcción al cromosoma.

El fragmento de 1933 pb fue empleado en la construcción del plásmido capaz de complementar a la mutante *bepC* (pBBR1-*bepC*), y en el plásmido usado en los experimentos de expresión heteróloga (pBBAD18T-*bepC*).

Además, un amplicón conteniendo al promotor de *bepC* fue fusionado transcripcionalmente al gen de la β -galactosidasa (*cassette lacZ-gm*). Se obtuvieron simple-recombinantes con una copia única de la fusión en el cromosoma.

Confirmación de la mutante *bepC* por PCR (*B. suis*)

Se utilizaron los *primers* internos (*Int. sense* y *antisense*), combinados con los *primers* Omega A, B, D y E complementarios a los extremos del *cassette* de resistencia a espectinomicina Ω (Fig.10). La amplificación de los fragmentos esperados confirma la presencia del *cassette*, interrumpiendo el gen *bepC* de *B. suis*.

Las mutantes fueron confirmadas también por *southern blot*, ver protocolo más arriba.

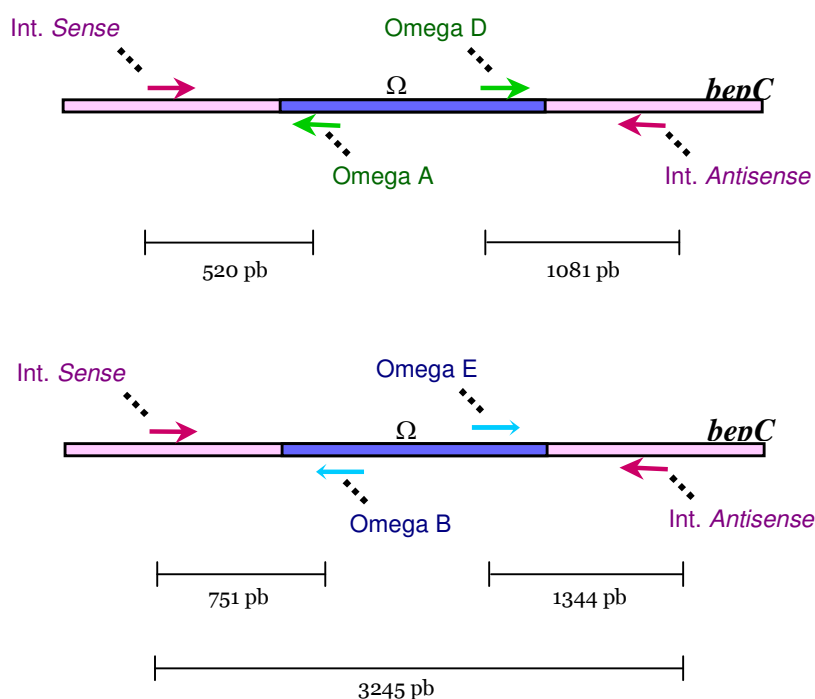


Fig.10: zona de apareamiento de los oligonucleótidos empleados y amplicones esperados.

Obtención de mutantes por inserción: *bmaA* y *bmaB*

Los *primers* M BmaA *Forward* y *Reverse* fueron diseñados para amplificar a partir del ADN genómico de *B. suis* un fragmento de 0,972 pb (aproximadamente 1 Kb) que contiene una porción del gen *bmaA* (ver fig.11). Este fragmento fue clonado en pGEMT-easy.

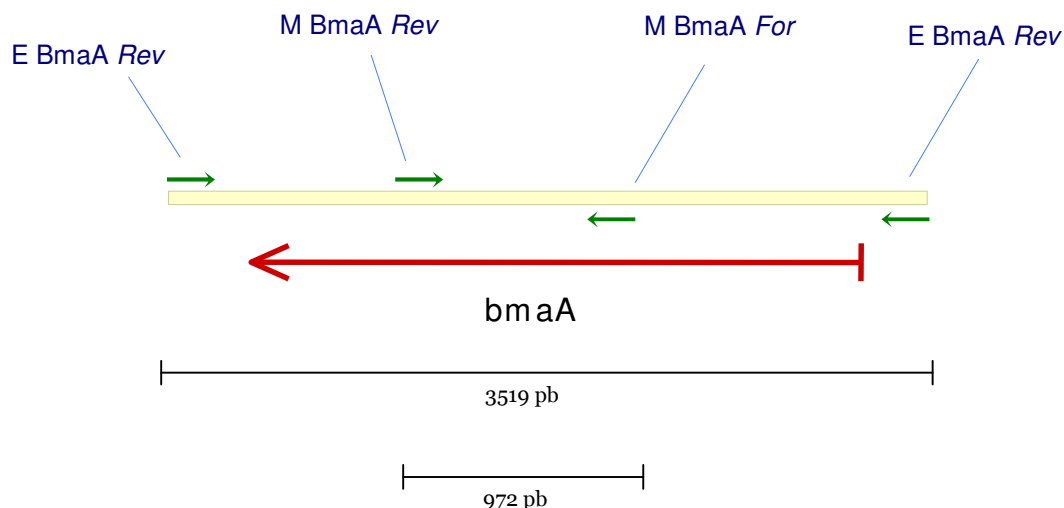


Fig.11: esquema general, zonas de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados.

Se empleó la enzima de restricción *Bam*HI para introducir el *cassette* de resistencia a espectinomicina Ω en medio del amplicón. Esta construcción fue empleada para electroporar células competentes de *B. suis*. Se obtuvieron dobles recombinantes, que incorporaron la construcción al cromosoma.

El fragmento de 3519 pb, amplificado con los oligonucleótidos E BmaA *forward* y *reverse*, fue empleado en la construcción del plásmido capaz de complementar a la mutante *bmaA* (pBBR1-*bmaA*), también usado en los experimentos de expresión heteróloga.

Los *primers* M BmaB *Forward* y *Reverse* fueron diseñados para amplificar a partir del ADN genómico de *B. suis* un fragmento de 1468 pb (aproximadamente 1,5 kb) que contiene una porción del gen *bmaB* (ver fig.12). Este fragmento fue clonado en pGEMT-easy.

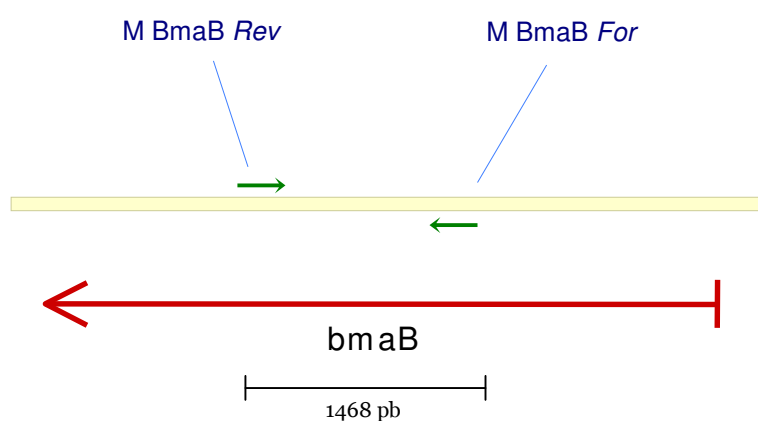


Fig.12: esquema general, zonas de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados.

Se empleó la enzima de restricción *SmaI* para introducir un *cassette* de resistencia a gentamicina en medio del amplicón. Esta construcción fue empleada para electroporar células competentes de *B. suis*. Se obtuvieron dobles recombinantes, que incorporaron la construcción al cromosoma.

Confirmación de las mutantes *bmaA* y *bmaB* por PCR

Para confirmar la mutación en *bmaA* se utilizaron los *primers* internos (M BmaA *Forward* y *Reverse*), combinados con los *primers* Omega A, B, D y E complementarios a los extremos del *cassette* de resistencia a espectinomicina Ω . La amplificación de los fragmentos esperados confirma la presencia del *cassette*, interrumpiendo el gen *bmaA* de *B. suis*. Esta estrategia es idéntica a la empleada con el gen *bepC*.

En el caso de *bmaB::genta* se emplearon los *primers* internos (M BmaB *Forward* y *Reverse*), combinados con los *primers* Gent A y B complementarios a los extremos del *cassette* de resistencia a gentamicina. Además, empleando sólo los *primers* internos, se constató la presencia de una única banda de amplificación correspondiente a la versión interrumpida del gen de 2.4 Kb (porción del gen de 1.5 Kb + *cassette* de 0.9 Kb). En este caso también la amplificación de los fragmentos esperados confirma la presencia del *cassette*, interrumpiendo el gen *bmaB* de *B. suis*.

Obtención de mutantes por delección: *bmaC*

Los *primers* BmaC *Forward* y *Reverse* 1 y 2 fueron diseñados para amplificar dos fragmentos de ADN de 600 y 700 pb, correspondientes a las zonas flanqueantes al gen *bmaC* de *B. suis* (Fig.13).

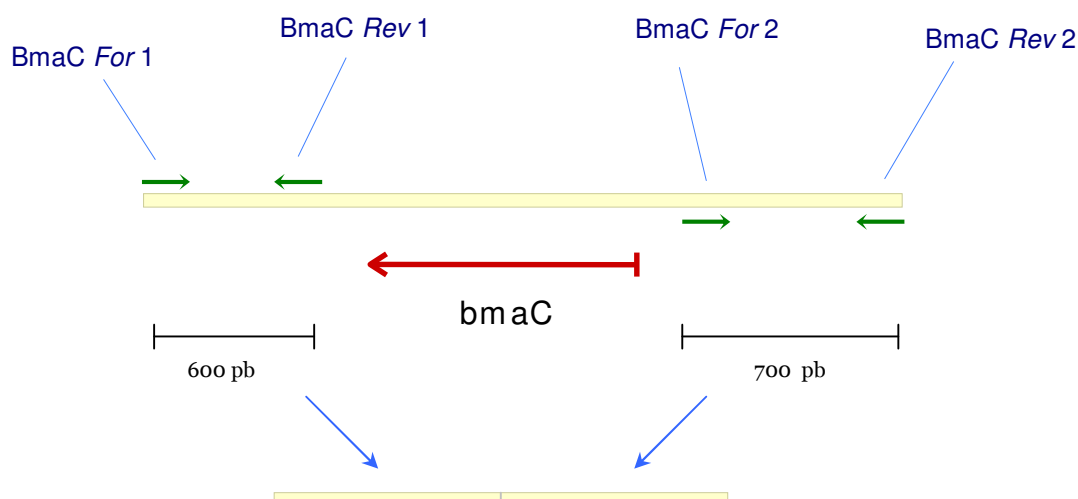


Fig.13: esquema general, zonas de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados.

Estos fragmentos fueron clonados juntos en pGEMT-easy y luego subclonados al vector pK18*mobsacB* en los sitios *SalI/SphI*, dando lugar al plásmido pK18*mobsacB bmaC*, que se empleó para obtener una mutante en *B. suis* por doble recombinación homóloga al cromosoma. La construcción fue introducida en *B. suis* por conjugación biparental, empleando a la cepa S17 de *E. coli* como dadora.

Confirmación de las mutantes *bmaC* por PCR

Para confirmar la mutación en *bmaC* se utilizaron los *primers* internos (*BmaC* int. 1 y 2), en combinación con los *primers* *BmaC* *Forward* 1 y *Reverse* 2. Los *primers* internos son complementarios a la zona delecionada, por lo que no debe existir banda de amplificación en la cepa mutante (Fig.14).

Además, empleando sólo los *primers* externos, se constató la presencia de una única banda de amplificación correspondiente a la deleción del gen de 1.4 Kb (la banda *wt* posee 12 Kb). En este caso también, la amplificación de los fragmentos esperados confirma la deleción del gen *bmaC* en la mutante de *B. suis*.

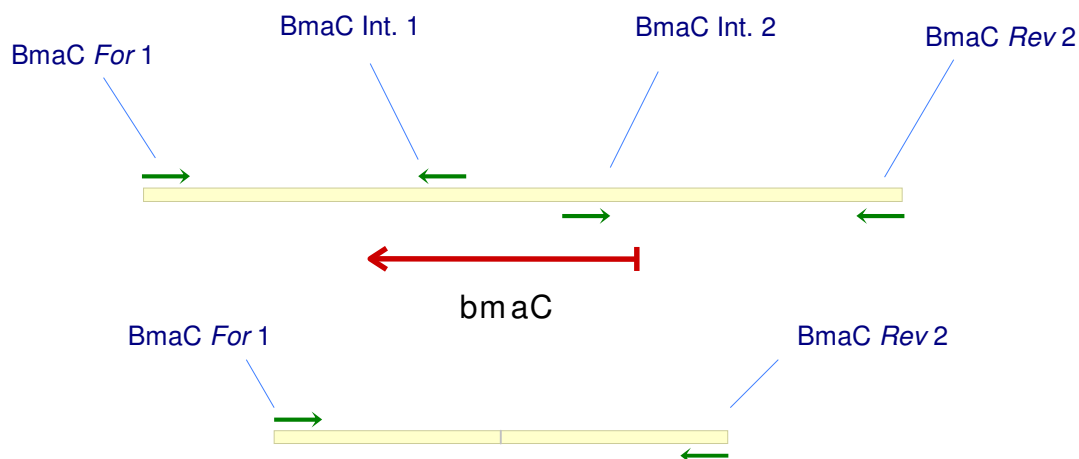


Fig.14: esquema general, zonas de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados

Capítulo I: transporte

En este capítulo nos abocamos al estudio del único miembro de la familia de proteínas OMF (*outer membrane factor*) identificado en el genoma de *Brucella*. Las proteínas de esta familia, como lo indica su nombre, son componentes de la membrana externa y forman parte de sistemas de transporte tripartitos. Están dedicadas a la secreción de proteínas o al eflujo de sustancias tóxicas, funcionando en forma conjunta con otras dos proteínas de la membrana interna que completan el sistema. Utilizando un enfoque de complementación heteróloga, demostramos que el OMF de *Brucella suis*, que hemos denominado BepC, es capaz de participar en procesos de transporte. Luego, para estudiar el rol de esta proteína en *Brucella*, obtuvimos una mutante por inserción en el gen *bepC* (*bepC::*) y estudiamos los efectos de la mutación sobre la virulencia y la sensibilidad a diversas drogas en esta cepa. De esta forma demostramos que BepC contribuye significativamente a la supervivencia de *B. suis* durante el proceso de infección y cumple un rol preponderante en la detoxificación de la bacteria. Los resultados obtenidos dieron lugar a dos trabajos publicados en 2007 y 2009:

THE TOLC HOMOLOGUE OF *Brucella suis* IS INVOLVED IN RESISTANCE TO ANTIMICROBIAL COMPOUNDS AND VIRULENCE. **Diana M. Posadas**, Fernando A. Martín, M. Julia Sabio García, Juan M. Spera, M. Victoria Delpino, Pablo Baldi, Eleonora Campos, Silvio Cravero and Angeles Zorreguieta. **Infect Immun.** 2007 Jan;75(1):379-89.

INTERPLAY BETWEEN TWO RND SYSTEMS MEDIATING ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN BRUCELLA SUIIS. Martín, F.A.; **Posadas, D.M.**; Carrica, M.; O'Callaghan, D. and Zorreguieta, A. **J. Bacteriol.** 2009 Apr;191(8):2530-40.

Resultados

Identificación de un OMF en el genoma de *B. suis*

En el cromosoma I de *B. suis* M1330 se identificó una única proteína perteneciente a la familia de los OMFs (gi: 23501829; TIGR01844 o BR0945 según TIGR) (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.sp>). Esta proteína posee un 38% de similitud a TolC de *E. coli* y 67% a un OMF de *Mesorhizobium loti* y se halla conservada en las especies secuenciadas de *Brucella*.

Las proteínas de la familia TolC se hallan ampliamente distribuidas entre los microorganismos Gram-negativos, y la similitud entre sus secuencias correlaciona con su especificidad de sustrato, de hecho, los miembros de la familia podrían clasificarse en tres grupos distintos, de acuerdo a si cumplen un rol en la secreción de proteínas, el eflujo de cationes o la eliminación de drogas. Teniendo en cuenta esto, se construyó un árbol filogenético basado en secuencias aminoacídicas de TolC de *E. coli*, su homólogo en *B. suis* y otros 17 miembros de la familia (Fig.1).

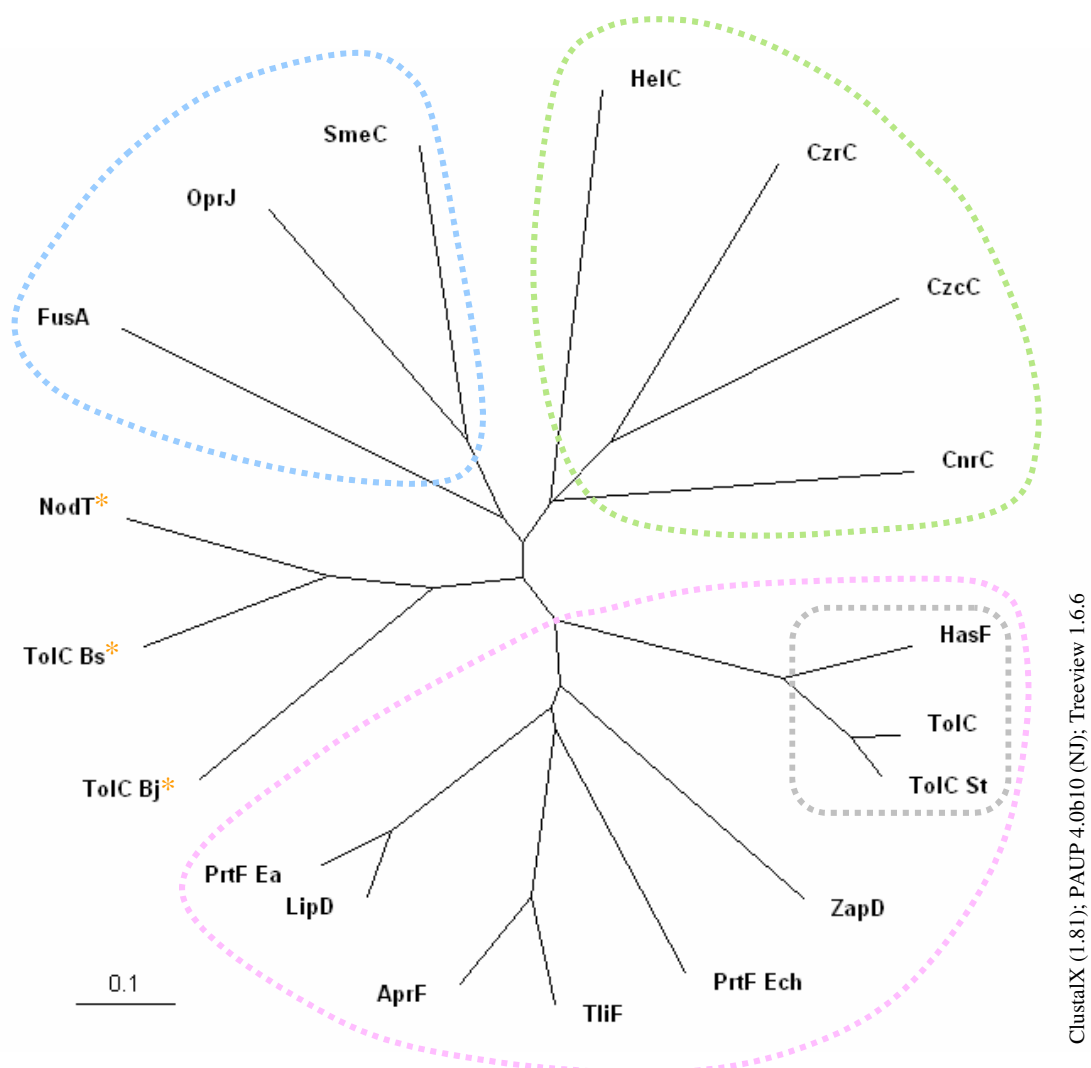


Fig.1: árbol filogenético de proteínas de la familia TolC.

Se incluyen 16 miembros de la familia TolC, pertenecientes a diversos géneros bacterianos, cuya función en eflujo o secreción a sido confirmada. * No caracterizadas.

Bj: *Bradyrhizobium japonicum*; Bs: *Brucella suis*; Ea: *Erwinia amylovora*; Ech: *Erwinia chrysanthemi*; St: *Salmonella typhimurium*.

..... Secreción de proteínas. Eflujo de drogas. Eflujo de cationes. Multifuncionales.

La caracterización funcional de genes secuenciados constituye uno de los grandes desafíos de la biología molecular en la era post-genómica. Frecuentemente, las únicas claves sobre el rol de un gen provienen de la homología de su secuencia a otros ya caracterizados. En este caso vemos que en el árbol las proteínas se agruparon de acuerdo a su función, quedando definidos tres grupos: la secreción de proteínas, el eflujo de drogas y el eflujo de cationes. TolC de *E. coli* tiene la peculiaridad de interactuar con muchos complejos de membrana interna diferentes, ya sea para la secreción de proteínas^{118, 133}, el eflujo de compuestos tóxicos¹¹⁹ o la captación de colicinas¹²⁴. Llamativamente, TolC formó un *subcluster* con HasF de *Serratia marcescens* (involucrada tanto en la secreción de una lipasa como en el eflujo de drogas) y con TolC_{St} de *Salmonella typhimurium* (capaz de eliminar compuestos hidrofóbicos y de secretar proteínas heterólogas). Podríamos decir que en este *cluster* se agrupan los miembros de esta familia que son multifuncionales.

TolC de *B. suis*, a quien denominaremos de ahora en adelante BepC, no quedó incluida claramente en ninguno de ellos; en cambio, se agrupó junto a su homóloga de *B. japonicum* y junto a NodT de *R. leguminosarum*, por lo que en principio no se le podría asignar un rol determinado por similitud de su secuencia aminoacídica a las ya caracterizadas. Esta fue una razón más para desear comprobar experimentalmente si BepC de *B. suis* es capaz de cumplir alguna o varias de estas funciones. Para ello se crearon las herramientas de biología molecular necesarias para llevar a cabo diversos ensayos de complementación funcional, y para generar mutantes en *B. suis* por doble recombinación.

Construcción de plásmidos

Amplificación y clonado del gen *bepC* de *B. suis*: construcción de un plásmido de expresión de amplio rango

Un fragmento de ADN de 1913 pb, conteniendo al gen *bepC* de *B. suis* únicamente, fue amplificado con *primers* específicos y clonado en el vector pGEMT-easy. El clonado se confirmó por ensayo de restricción *EcoRI/HindIII* y secuenciación del marco de lectura completo (Fig.2).

Este fragmento incluye al gen completo y a sus posibles zonas promotoras, ubicadas 87 bases río arriba del gen (Fig.3). Se utilizaron las dos metodologías del sistema CPR-MOSS para la predicción de promotores.

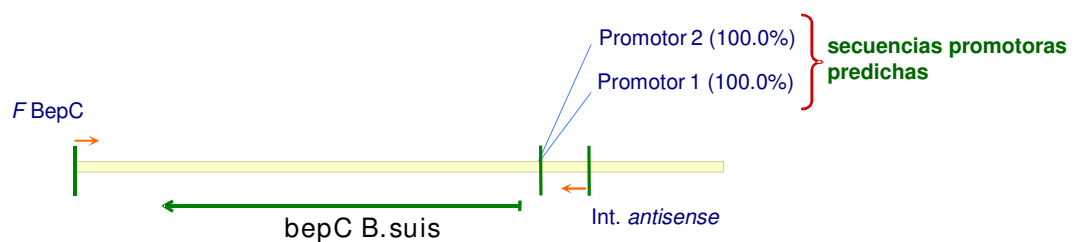
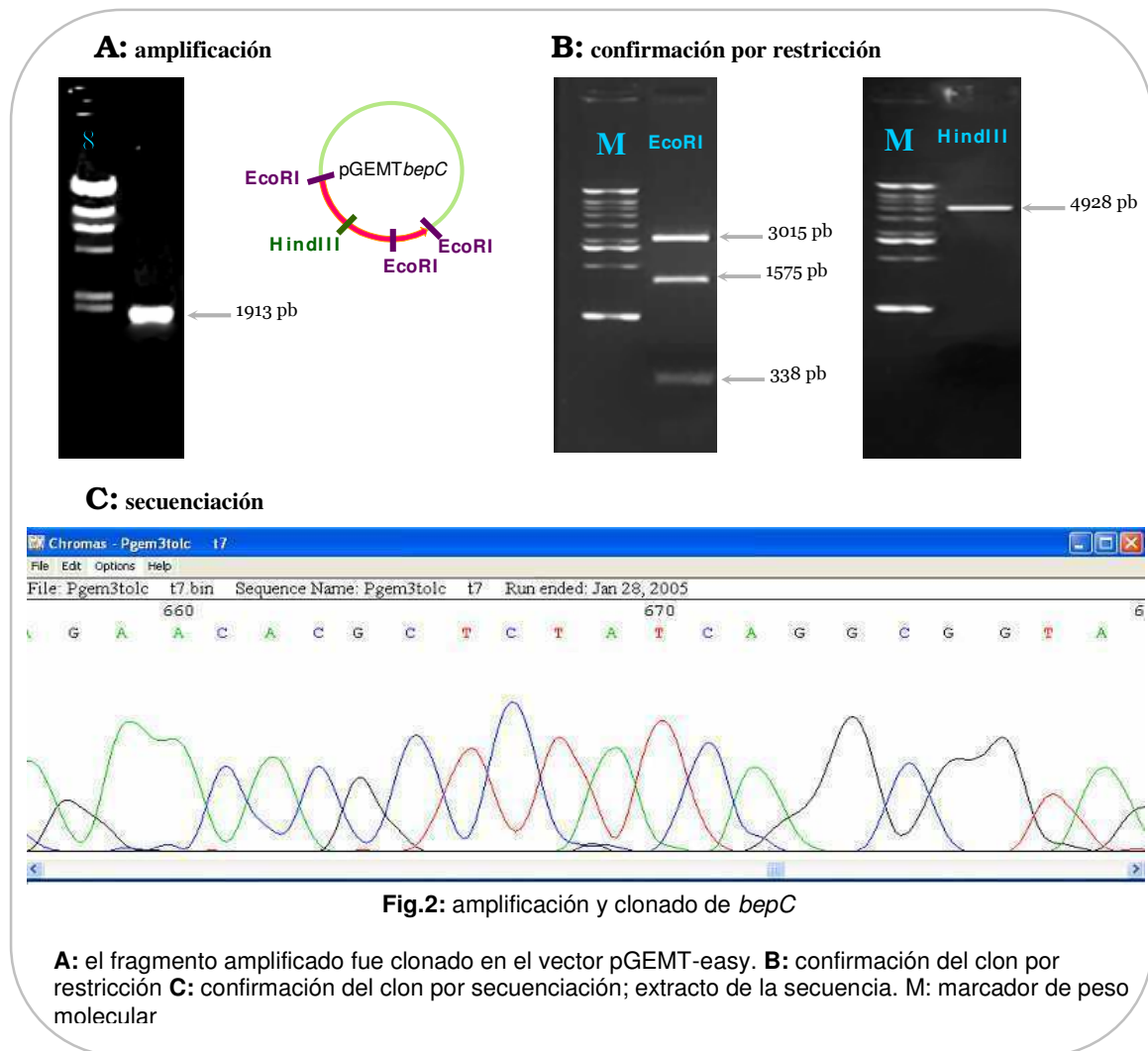
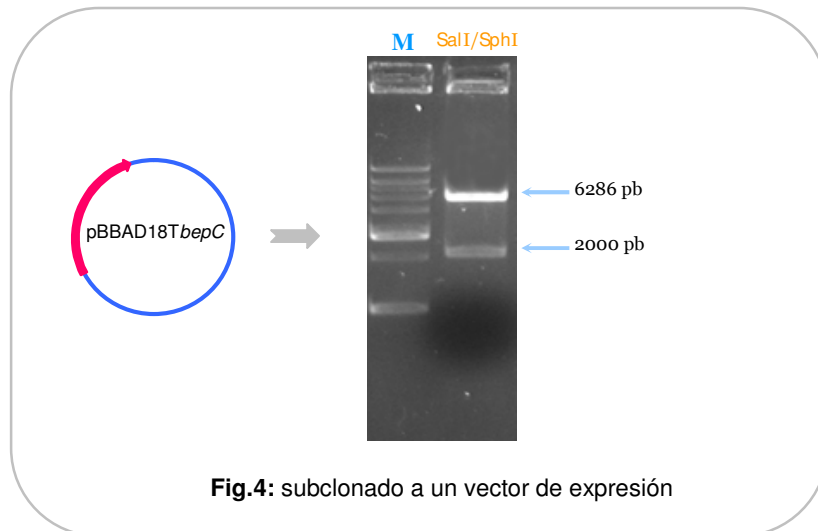


Fig.3: ubicación de las secuencias promotoras predichas

Luego, el inserto fue subclonado en el vector de expresión pBBAD18T, en los sitios *SalI/SphI* (Fig.4). Esta última construcción se utilizó en los ensayos de complementación funcional en *E. coli*.



Los ensayos de complementación funcional se detallan en la siguiente sección.

Ensayos de complementación funcional en *E. coli*

Como se mencionó antes, la proteína TolC de *E. coli* es multifuncional, es decir, participa en varios procesos de transporte, en los que interacciona con diversos factores presentes en la membrana bacteriana. Entre estos procesos se destacan la secreción de proteínas (α -hemolisina), el eflujo de compuestos tóxicos y la captación de colicina E1. Esta característica de TolC hace que una mutante en el gen *tolC* posea un fenotipo pleiotrópico: las cepas mutantes en *tolC* son hipersensibles a un gran abanico de drogas, no pueden secretar proteínas vía sistemas de secreción tipo I y son resistentes a la colicina E1. Debido a esto, la mutante *tolC* en *E. coli* es una herramienta válida si se quiere estudiar el posible rol de una proteína no caracterizada en alguna de estas funciones, por medio de una complementación funcional heteróloga. En esta sección se describen esos experimentos y sus resultados.

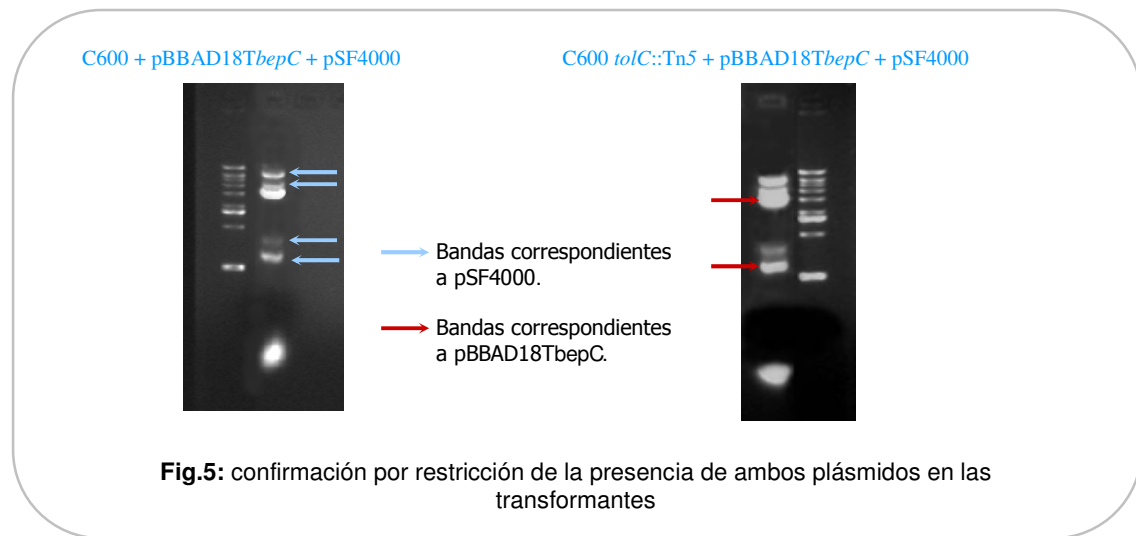
Obtención de transformantes con *bepC* de *B. suis*

Se estudió la posibilidad de que la proteína de la familia TolC identificada en *B. suis* fuera capaz de complementar cada una de las funciones que cumple su homóloga en *E. coli*. Para ello, una cepa mutante en *tolC* fue transformada con el gen silvestre *bepC* de *B. suis*. Luego se determinó si las funciones perdidas eran recuperadas en esta cepa o no. Se emplearon cepas control descritas en cada caso.

Para los ensayos de complementación funcional en *E. coli* se prepararon células electrocompetentes de las cepas silvestre C600 y mutante C600 *tolC*::Tn5, que luego fueron electroporadas con el ADN de interés. Para los ensayos de secreción de α -hemolisina C600 y C600 *tolC*::Tn5 fueron transformadas con

los plásmidos pBBAD18T*bepC* (gen *bepC* de *B. suis* clonado en el vector de amplio rango pBBAD18T, bajo el control de un promotor *araC*, inducible por L-arabinosa) y pSF4000 (operón *hly* clonado en el vector pACYC184), la presencia de ambos plásmidos fue confirmada por ensayos de restricción con *Hind*III (Fig.5).

Para los ensayos de sensibilidad a compuestos tóxicos y de sensibilidad a colicina E1 las cepas C600 y C600 *tolC*::Tn5 fueron transformadas con el plásmido pBBAD18T*bepC* exclusivamente. La presencia del plásmido fue confirmada por restricción con *Hind*III.



Inducción de la expresión de BepC

Se corroboró que el sistema de control de la expresión por L-arabinosa/D-glucosa estuviese funcionando correctamente antes de empezar con los experimentos de complementación heteróloga. Para ello se confirmó la presencia de la proteína BepC de *B. suis* en la membrana de la mutante *tolC* de *E. coli* por SDS-PAGE. Se prepararon membranas de cada una de las cepas, con y sin L-arabinosa y cada muestra se sembró en un gel de acrilamida 12% (ver Fig.6). Se observó la banda esperada para BepC (aprox. 50KDa) sólo en la muestra de la cepa que porta el gen *bepC* inducida con arabinosa.

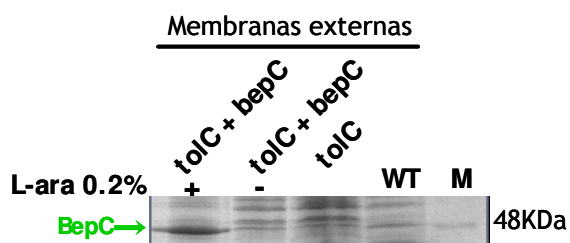


Fig.6: SDS-PAGE de proteínas de membrana. En cada calle se indica la preparación sembrada, y si fue inducida con L-arabinosa o no. Sólo la cepa *tolC* + *bepC* inducida con L-ara presenta la banda característica de BepC. M: marcador de peso molecular.

Luego de confirmar que BepC se estaba expresando correctamente se llevaron a cabo los experimentos de complementación funcional heteróloga descritos a continuación.

Sensibilidad a Colicina E1

Las cepas silvestres de *E. coli* suelen ser sensibles a la proteína Colicina E1 (ColE1); esta bacteriocina es producida por algunas cepas de la misma *E. coli*, que cuentan con el plásmido transmisible que la codifica (junto a otra proteína, ImmE1, que les confiere “inmunidad”). Se ha demostrado que para alcanzar su blanco (insertarse en la membrana interna) ColE1 debe atravesar la membrana externa y el periplasma de la célula atacada; estos pasos son dependientes de la presencia de TolC en la membrana externa (ver introducción). Debido a esto, las células que no cuentan con TolC en su membrana (por ejemplo, las mutantes C600 *tolC::Tn5*) son resistentes al ataque de la colicina, incluso a muy altas concentraciones de la misma.

Se estudió la posibilidad de que BepC de *Brucella suis* fuera capaz de complementar a las mutantes C600 *tolC::Tn5* en la incorporación de Colicina E1. De ser esto cierto, las transformantes C600 *tolC::Tn5* + pBBAD18T**bepC**, en presencia del inductor L-arabinosa, deberían perder por completo la resistencia a ColE1 o, por lo menos, mostrar un nivel de sensibilidad similar al de la cepa silvestre C600. Se prepararon placas de C600, C600 *tolC::Tn5* y C600 *tolC::Tn5* + pBBAD18T**bepC** y se observó cuan resistente era cada cepa (Fig.7).

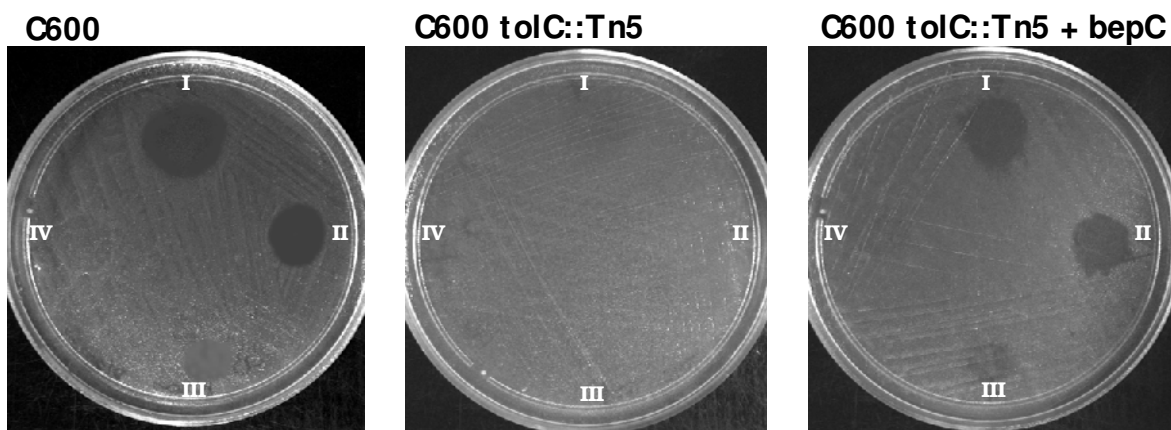


Fig.7: sensibilidad a ColE1. Se inocularon en sentido horario concentraciones decrecientes de la proteína ColE1 sobre las cepas a ensayar y se observaron halos de inhibición del crecimiento en las cepas susceptibles, en presencia de 0.2% de L-arabinosa. Obsérvese que la cepa mutante es resistente a todas las concentraciones empleadas. I: 1000U/ml. II: 500U/ml. III: 100U/ml. IV: 10U/ml.

Como puede verse en la Fig.7, la presencia de BepC de *B. suis* permite la incorporación de ColE1 a la célula. Los halos de inhibición del crecimiento son semejantes para C600 y C600 *tolC::Tn5* + **bepC**; y la concentración inhibitoria mínima de la colicina es similar para ambas cepas. Todo esto indicaría que BepC de *B. suis* se está expresando e insertando correctamente en la membrana externa de *E. coli* C600 *tolC::Tn5*, transformada con el plásmido pBBAD18T**bepC**, en presencia de L-arabinosa 0.2%. Además este resultado demuestra que BepC de *B. suis* es capaz de reemplazar funcionalmente a su homóloga en *E. coli* en la incorporación de colicina. Si bien el mecanismo por el cual la colicina ingresa a

la célula no ha sido completamente dilucidado, esto sugiere que las zonas de TolC que interaccionan con ColE1 se hallan estructuralmente conservadas entre la proteína de *E. coli* y la de *B. suis*.

Secreción de α -hemolisina

La mayoría de las bacterias Gram-negativas, incluyendo los miembros del grupo *Rhizobiaceae*, exportan proteínas al medio extracelular a través de sistemas tripartitos de secreción de proteínas (ABC-MFP-TolC), también conocidos como sistemas de secreción de tipo I (TISS por sus siglas en inglés). En *E. coli*, TolC junto a las translocasas de membrana interna HlyB-HlyD es responsable de la secreción de la α -hemolisina (HlyA)¹¹⁸. Como BepC es el único miembro de la familia TolC presente en el genoma de *B. suis*, se estudió la posibilidad de que BepC estuviese involucrada en la secreción de proteínas, analizando si BepC era capaz de restaurar la secreción de hemolisina en la mutante *tolC* expresando los genes *hlyCABD* (acilasa, α -hemolisina y componentes ABC y MFP del sistema de secreción encargado de secretarla, respectivamente)^{118, 133}.

La presencia de α -hemolisina en el medio extracelular fue determinada por ensayos de agar-sangre y por SDS-PAGE. Para ello se transformó una cepa de *E. coli* incapaz de secretar hemolisina, C600 *tolC::Tn5* con la construcción pBBAD18T*bepC* y con el plásmido pSF4000, que porta los genes *hlyCABD*. Las transformantes se plaquearon en agar-sangre junto a sus controles. La presencia de un halo de hemólisis señalaría que la hemolisina está siendo secretada. En este ensayo se observó un tenue halo de hemólisis alrededor de la colonia que porta los dos plásmidos (Fig.8C); sin embargo, este tenue aclaramiento puede deberse a que la presencia de la/s nueva/s proteína/s en la membrana la desestabilizan, produciendo la lisis de la bacteria.

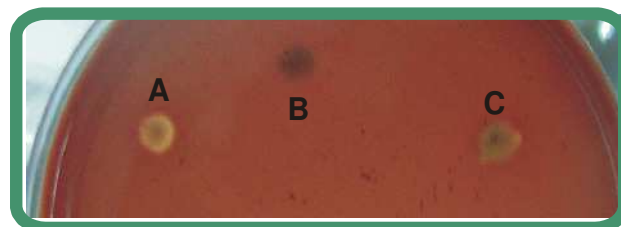


Fig.8: ensayo de hemólisis. Las cepas ensayadas junto a los controles se incubaron por 24 hs. a 37° C. **A:** wt + pSF4000, cepa silvestre C600 capaz de secretar la hemolisina (posee el sistema de secreción completo y la hemolisina), constituye el control positivo del ensayo. **B:** *tolC::Tn5* + pSF4000, control negativo (esta cepa no es capaz de secretar la hemolisina porque no posee una copia sana del gen *tolC*). **C:** *tolC::Tn5* + pSF4000 + *bepC*, cepa transformante para el gen *bepC* de *B. suis*.

Como segunda estrategia para determinar una posible complementación de este fenotipo se realizaron preparaciones de las proteínas secretadas al medio extracelular por las cepas empleadas en el ensayo anterior (todas portan el plásmido pSF4000). El análisis de las proteínas extracelulares precipitadas con TCA por SDS-PAGE mostró claramente que la secreción de HlyA no pudo ser complementada por BepC en la mutante *tolC* (ver Fig.9). La banda de 107 KDa, característica de HlyA,

se halla ausente en la preparación de proteínas extracelulares de la cepa *tolC* que lleva el gen *bepC* (*tolC::Tn5 + bepC*). Este resultado sugiere que los dominios de TolC responsables de la interacción con las translocasas HlyB-HlyD no se hallan conservados en BepC o, alternativamente, que algunas otras características estructurales intrínsecas de BepC no permiten la secreción de moléculas de gran tamaño o considerablemente hidrofílicas.

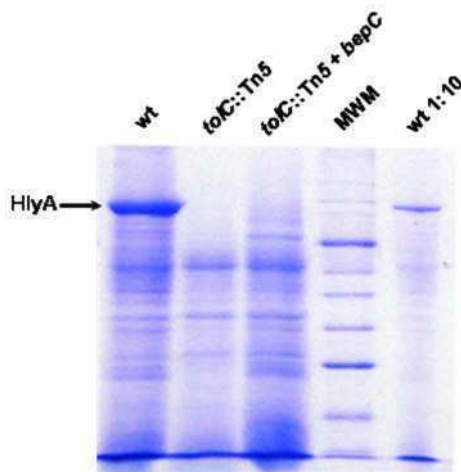


Fig.9: SDS-PAGE de proteínas extracelulares. La secreción de -Hemolisina en la mutante *tolC* no fue complementada por *bepC*. En cada calle se indica la preparación sembrada. En la última calle se sembró una dilución 1:10 de la preparación de la cepa silvestre para indicar claramente la posición esperada para la banda correspondiente a HlyA.

Sensibilidad a compuestos tóxicos: test de difusión en disco

Por último, también se analizó si *bepC* de *B. suis* es capaz de complementar en forma heteróloga el tercer fenotipo asociado a la mutación en *tolC* de *E. coli* que es la sensibilidad a drogas. Las cepas mutantes en *tolC* son hipersensibles porque no pueden eliminar por eflujo a los compuestos que intoxican a la célula. Se propone que sistemas de eflujo tripartitos, de los que forma parte TolC, son los encargados de expulsar una gran variedad de compuestos nocivos para la célula. Teniendo esto en cuenta, se estudió el efecto de la expresión de *bepC* de *Brucella suis*, clonado en un vector inducible, sobre la resistencia a determinadas sustancias en la mutante *tolC*. Para esto se realizaron ensayos de difusión en disco y de microdilución, en donde se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de distintas drogas. En estos ensayos se emplearon las cepas silvestre (C600), mutante (C600 *tolC::Tn5*) y sus transformantes (C600 *tolC::Tn5 + pBBAD18TbepC*).

Se compararon las sensibilidades de estas tres cepas frente a diversas drogas, se incorporaron compuestos pertenecientes a distintas familias y con propiedades químicas diferentes, dado que TolC de *E.coli* puede funcionar en el eflujo de las sustancias más diversas.

En el ensayo en placa se midieron los halos de inhibición sobre el crecimiento de cada cepa producido por cada compuesto. Los ensayos se repitieron tres veces, cada una por triplicado. La medida del filtro whatman colocado sobre las placas fue de 0.6 cm. Este valor es considerado como 0 (cero) en la medición del halo de inhibición, es decir, sin halo para esa concentración empleada de la droga. Es esperable que a mayor sensibilidad de la cepa ensayada a un dado compuesto, mayor sea su halo de

inhibición del crecimiento. Por ello se esperaba un halo mayor en la mutante *tolC* que en la cepa silvestre; y que en la cepa complementada los mismos fuesen similares a los de la wt (C600). En prácticamente todas las drogas ensayadas se obtuvo un halo mayor para la mutante, implicando su mayor sensibilidad a los compuestos empleados. En sólo dos drogas (cloranfenicol y acriflavina) los niveles de sensibilidad de la cepa complementada fueron casi idénticos a los de la wt. Para estas dos drogas la complementación fue total (ver Fig.10).

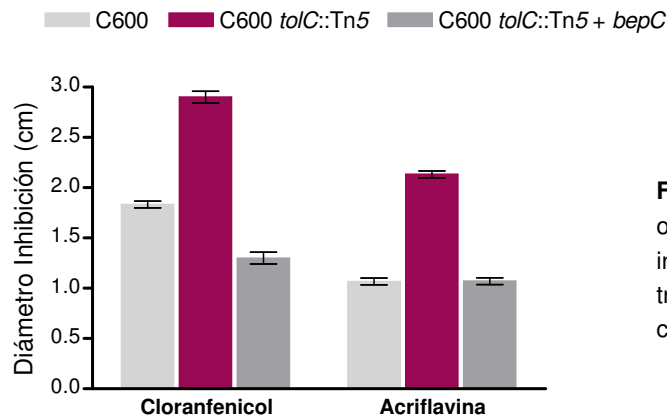


Fig.10: difusión en agar. Se observa la medida del halo de inhibición del crecimiento para las tres cepas ensayadas. En este caso la complementación fue total.

La presencia de *bepC* también resultó en una reducción considerable de la susceptibilidad a otros compuestos hidrofóbicos como ampicilina, eritromicina, rifampicina, rodamina 6G y bromuro de etidio (Fig. 11A), en donde la complementación fue sólo parcial. En cambio, la expresión de *bepC* no tuvo efecto sobre los fenotipos de hipersensibilidad de *tolC* frente a otras drogas como norfloxacin y berberina, así como a deoxicolato de sodio, ácido nalidíxico, cristal violeta, SDS, estreptomina, gentamicina y carbenicilina (Fig. 11B). En estos casos no hubo complementación alguna.

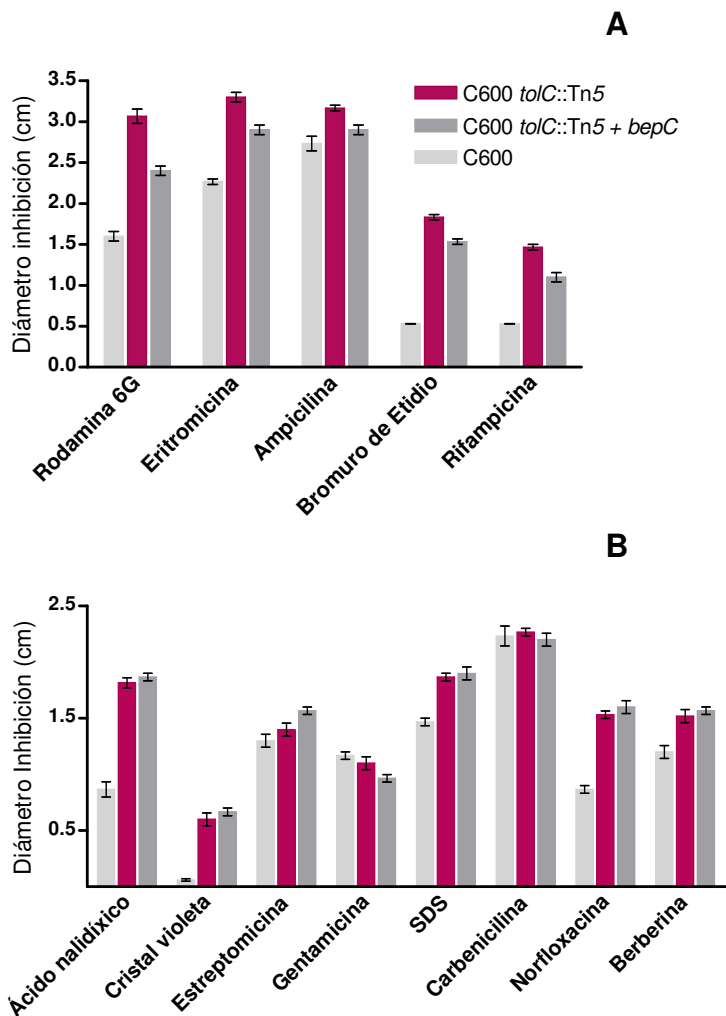
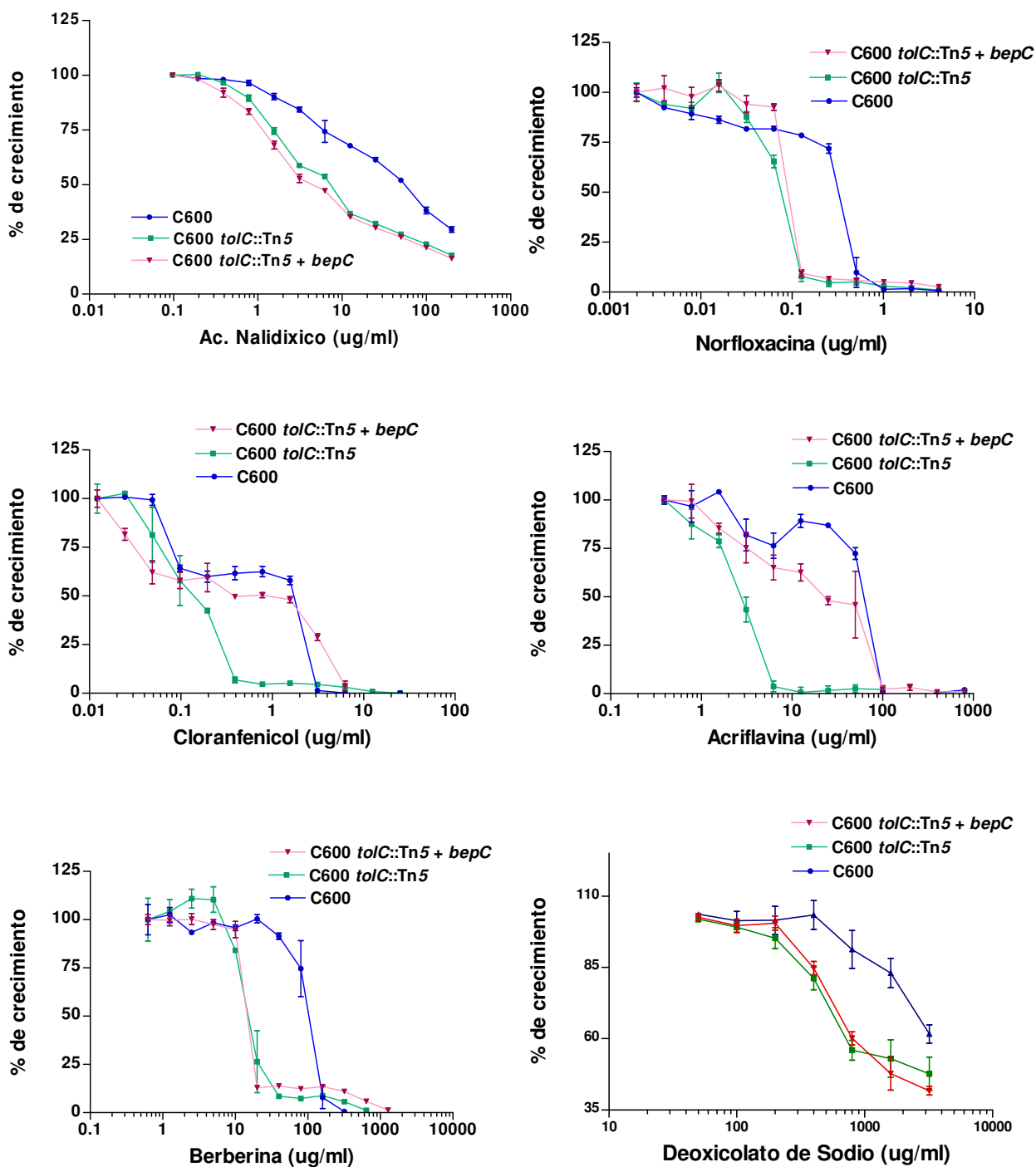


Fig.11: difusión en agar. Se observa la medida del halo de inhibición del crecimiento para las tres cepas ensayadas. **A:** en estos ensayos se observó una complementación parcial. **B:** en los ensayos con estas drogas no hubo complementación.

Sensibilidad a compuestos tóxicos: CIM

Otro enfoque para evaluar la capacidad de BepC de complementar en forma heteróloga la mutante *tolC* en cuanto a la sensibilidad a drogas fue determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de distintas drogas. Se empleó un ensayo de microdilución utilizando las mismas cepas empleadas en el ensayo en placa. Se esperaba que las CIMs fuesen menores para la cepa mutante que para la silvestre, y que las transformantes alcanzaran un nivel de resistencia parecido al del control wt por complementación de las funciones de eflujo. Se ensayaron los compuestos: deoxicolato de sodio, ácido nalidixico, norfloxacina, cloranfenicol, acriflavina y berberina, de modo de incluir algunos con los que ya se habían logrado resultados de complementación positivos, negativos e intermedios. De esta forma se espera confirmar lo obtenido por el método anterior. Las curvas correspondientes a cada uno de estos ensayos se muestran en la Fig.12.

Fig.12: ensayos de microdilución



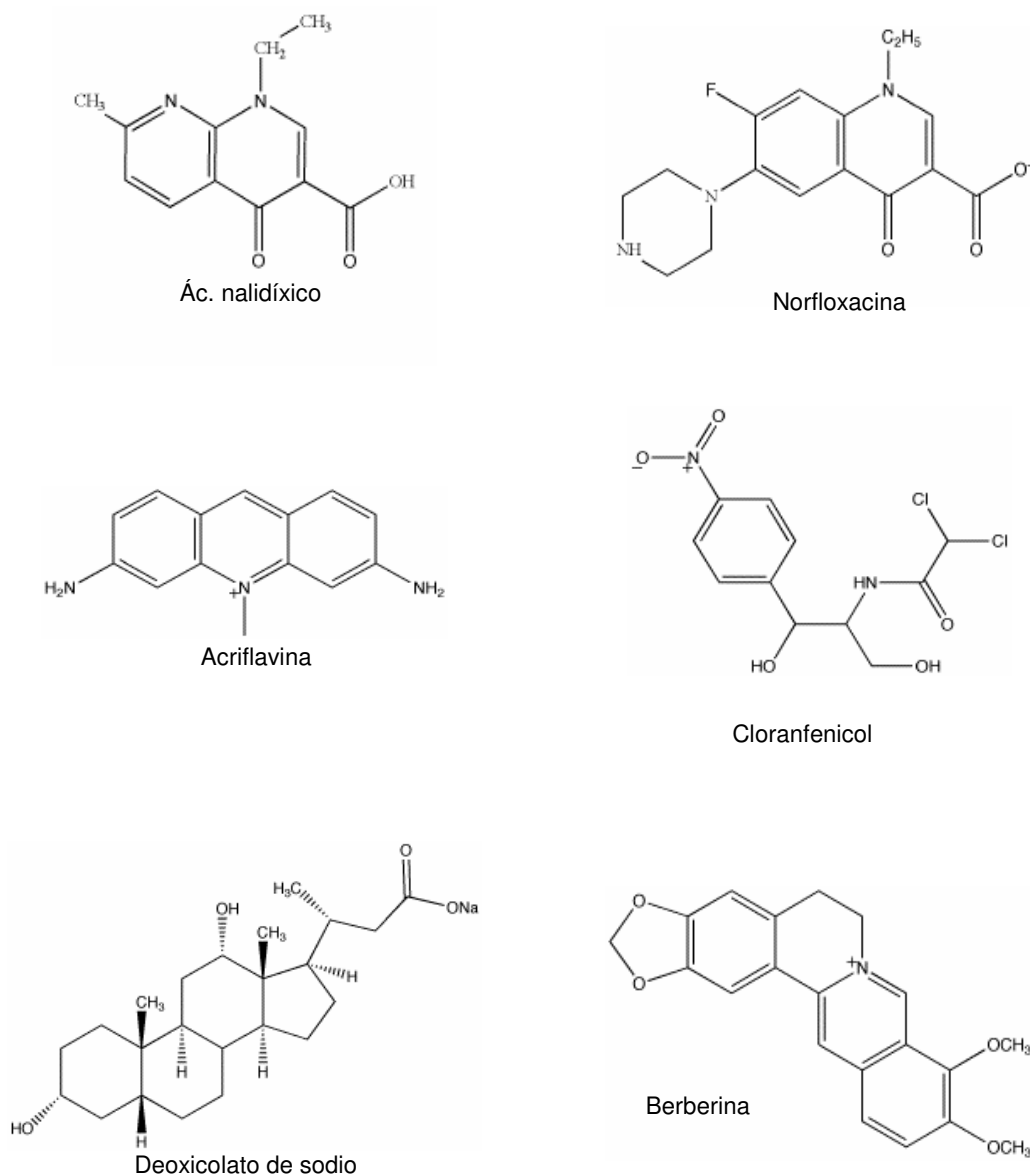
Curvas de crecimiento en función de la concentración de droga. En todos los casos los cultivos fueron inducidos con L-arabinosa 0.02%. Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos de densidad óptica se midieron en un lector de placas *multiwell*.

Se graficó el porcentaje de crecimiento (medido por densidad óptica) en función de la concentración de la droga utilizada. En el ensayo se usaron diluciones seriadas al medio de cada compuesto.

En la Fig.13 se muestran las estructuras químicas para los compuestos ensayados. En la tabla 1 se muestran las CIMs obtenidas para cada droga.

Para los compuestos norfloxacin, ácido nalidíxico, berberina y deoxicolato de sodio no se observó complementación alguna, como era de esperarse; se puede observar que en estos casos la curva correspondiente a la mutante (C600 *tolC::Tn5*) prácticamente se superpone a la de su transformante (C600 *tolC::Tn5* + pBBAD18*TbepC*), indicando que ambas cepas no presentan diferencias de sensibilidad a la droga ensayada. En cambio, sí hubo complementación de las funciones de eflujo con los compuestos cloranfenicol y acriflavina, para los que se observa un corrimiento a la derecha de la cepa complementada respecto de la mutante, alcanzando, en general, los niveles de sensibilidad de la cepa silvestre. Este resultado coincide con lo antes observado.

Fig.13: estructura química de compuestos empleados en los ensayos de microdilución.



Cloranfenicol: Parafarm; el resto de las drogas: Sigma.

El ácido nalidíxico es un antibiótico perteneciente a la clase de las quinolonas (de 1ª generación). La norfloxacin también es una quinolona, pero pertenece a la 2ª generación. Ambos interfieren con la síntesis o reparación del ADN, ya que inhiben a la DNA-girasa bacteriana. La acriflavina es un intercalante capaz de inhibir la síntesis de ADN. El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro que inhibe la síntesis proteica por unión a la subunidad ribosomal mayor. El deoxicolato de sodio es un detergente que, cuando es

Concentraciones inhibitorias mínimas			
Cepas Drogas	C600	C600 <i>tolC::Tn5</i>	C600 <i>tolC::Tn5</i> + <i>bepC</i>
Ác. nalidíxico *	50	6,25	3,125
Norfloxacin	0,256	0,064	0,064
Acriflavina	50	3,125	50
Cloranfenicol	1,56	0,19	3,125
Berberina	80	20	20
Deoxicolato de sodio *	3200	1600	800

Tabla 1: CIMs ($\mu\text{g/ml}$) calculadas a partir de los ensayos de microdilución. Se informa la concentración con la que se obtiene 90% de inhibición. * si bien hay diferencias, estas son menores a dos diluciones.

agregado al medio de cultivo, interfiere en la incorporación de azúcares a la célula y, por lo tanto, con el crecimiento. La berberina es un alcaloide producido por ciertas plantas como el bérbero, la cúrcuma y la yerba mansa, que posee propiedades antibacterianas; como mecanismo de acción se propone que funciona como un inhibidor de las bombas de eflujo bacterianas²¹¹. Se seleccionaron estas drogas debido a sus diversos mecanismos de acción, a sus diferentes propiedades químicas y a que todas son susceptibles de ser eliminadas por sistemas de eflujo conocidos.

Los resultados descriptos en esta sección indican que BepC revierte el fenotipo de hipersensibilidad de la mutante *tolC* de *E. coli* a diversos y variados compuestos hidrofóbicos. En conjunto estas evidencias de complementación funcional prueban que BepC de *Brucella* es capaz de participar en procesos de transporte, especialmente en los abocados a la detoxificación de la bacteria, esclareciendo en parte cual es su rol en el ciclo de vida de *B. suis*.

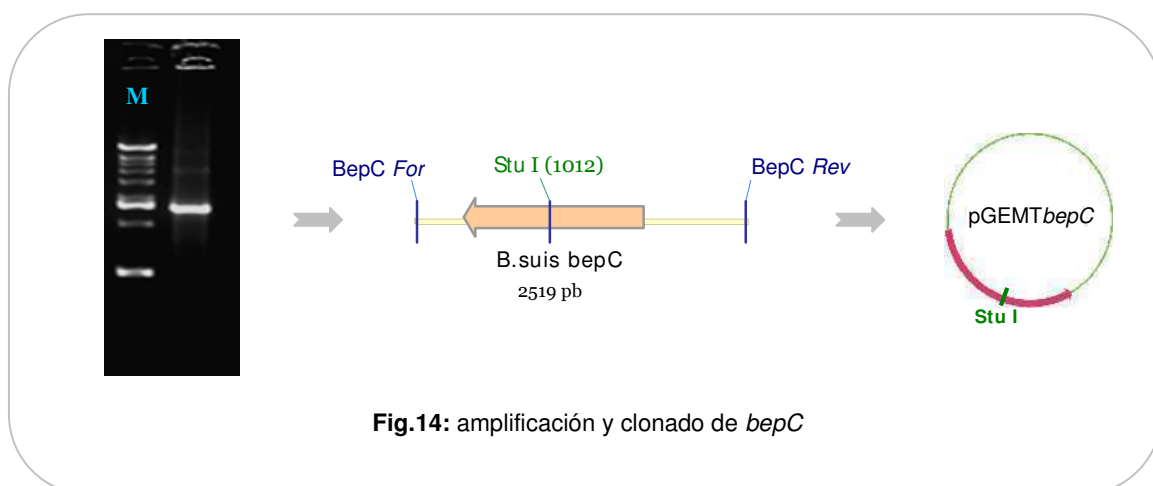
En la sección siguiente se estudian los fenotipos que se obtienen al mutar el gen *bepC* en su propio *background* genético, en *Brucella*.

Ensayos de caracterización de la mutante *bepC* de *B. suis*

Amplificación y clonado del gen *bepC* de *B. suis*: obtención de mutantes *bepC*⁻ por recombinación homóloga

Se diseñó una herramienta molecular que permite obtener mutantes *bepC* en *B. suis* por recombinación homóloga al cromosoma. Para ello, el gen *bepC*, clonado en un vector suicida (incapaz de replicar) en *Brucella* fue interrumpido por un *cassette* que confiere resistencia al antibiótico espectinomicina (Ω). Esta construcción fue empleada para electroporar células competentes de *B. suis*. Las transformantes fueron plaqueadas primero en espectinomicina y luego en ampicilina (resistencia otorgada por el vector). Esto permitió seleccionar las dobles recombinantes, espectinomicina resistentes (spec^R) y ampicilina sensibles (amp^S).

Estrategia empleada: un fragmento de ADN de 2519 pb, conteniendo al gen *bepC* de *B. suis* y sus zonas lindantes, fue amplificado con *primers* específicos (*BepC forward* y *reverse*) y clonado en el vector pGEMT-easy (Fig.14). La presencia de grandes porciones de ADN (más de 1000 pb a cada lado del *cassette*) incrementa las posibilidades de que haya recombinación homóloga en estos sitios.

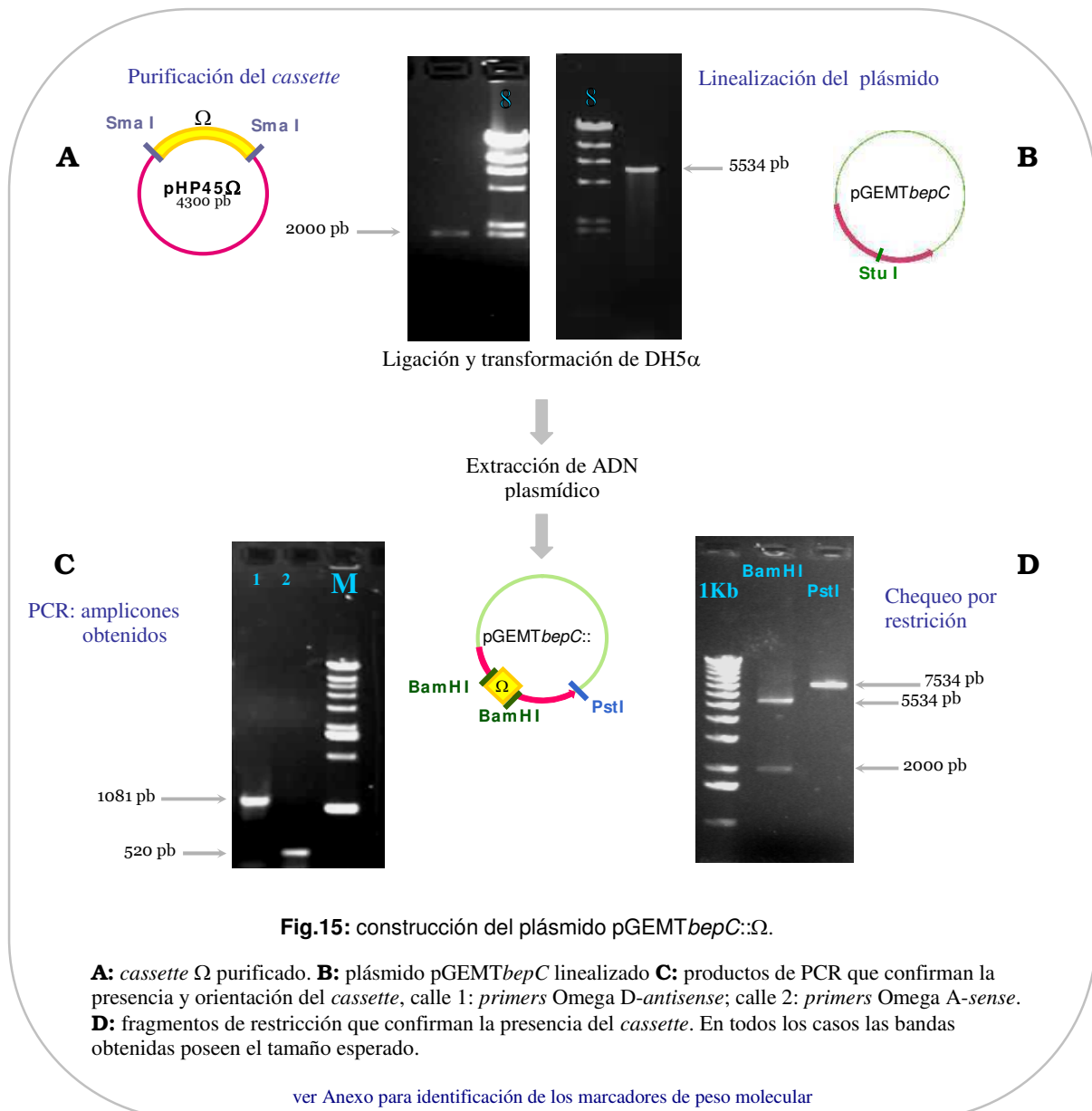


Para introducir el *cassette* se empleó la enzima de restricción *StuI*. Esta enzima es sensible a metilación (por la metilasa Dcm) si la secuencia de corte se halla superpuesta con la de metilación, como era el caso:

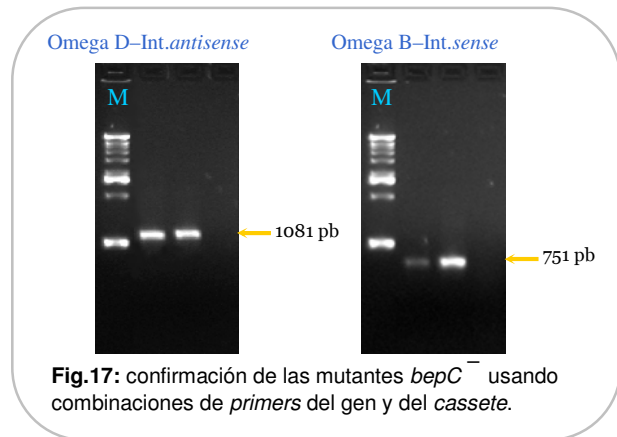
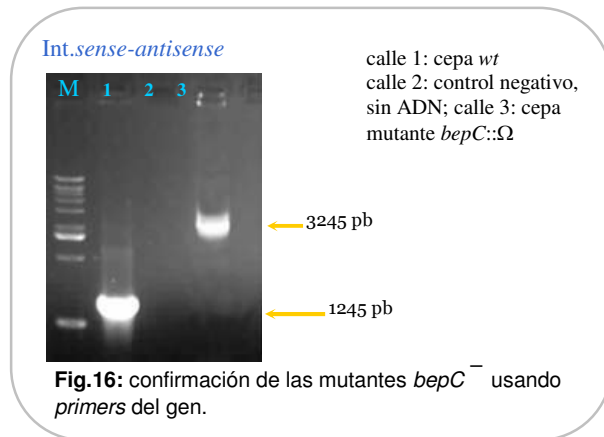


por lo que la construcción pGEMT-*bepC* se usó para electroporar la cepa *dcm*⁻ GM 2163. El ADN plasmídico purificado a partir de esta cepa era susceptible de ser cortado por la enzima *StuI*. Para

purificar el *cassette* se utilizaron los sitios *Sma*I, que lo liberan; para interrumpir el gen se empleó el único sitio *Stu*I, ubicado en la posición 1012 del inserto. Ambas enzimas dejan extremos romos al cortar, que pueden ser unidos por ligación. Se transformaron *E. coli* DH5 α con la mezcla de ligación; la presencia y orientación del *cassette* se chequeó por restricción *Bam*HI/*Pst*I y por PCR usando *primers* Omega A-Int. *Sense* y Omega D-Int. *Antisense* (ver Fig.15).



La construcción pGEMTbepC::Ω se usó para electroporar células competentes de *B. suis* M1330, obteniéndose 90 simples recombinantes (amp^R , $spec^R$) y 3 dobles recombinantes (amp^S , $spec^R$). La presencia del *cassette* se chequeó por PCR, con los *primers* Int. *sense-Antisense* (Fig.16) y usando *primers* Omega B-Int. *Sense* y Omega D-Int. *Antisense* (Fig.17).



Los ensayos realizados en la caracterización de las mutantes *bepC* de *B. suis* se describen más adelante.

Confirmación de la mutante *bepC* por southern blot

Los clones candidatos a ser mutantes en el gen *bepC* de *B. suis*, ya analizados por PCR empleando *primers* internos y externos al *cassete* de recombinación, fueron analizados por *southern blot*. Se emplearon dos enzimas de restricción diferentes: *EcoRI* y *Clal* (ver fig. 18). En ambos casos se confirmó la inserción del *cassete* de recombinación, por aparición en los clones candidatos de una banda 2 Kb mayor a la presente en el control *wt*. Uno de estos clones mutantes fue empleado en los ensayos de caracterización que se detallan a continuación.

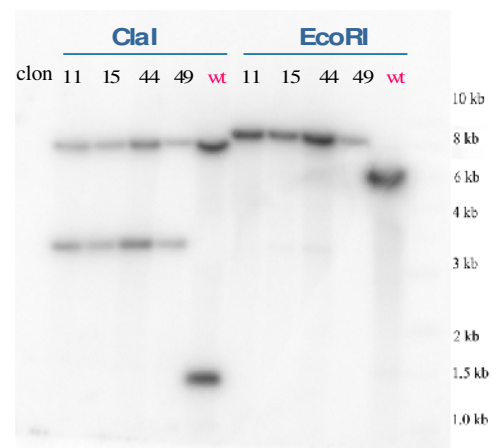


Fig.18: *Southern blot* para la confirmación de las mutantes *bepC* de *B. suis*.

Expresión de *bepC* in vitro

Antes de comenzar con la caracterización de la mutante se planteó el interrogante de las condiciones de expresión de este gen. La expresión *in vitro* era necesaria y condicionaba el hallazgo de fenotipos en los experimentos de sensibilidad a drogas planteados. Por lo tanto, se corroboró la expresión *in vitro* del gen *bepC* mediante una fusión transcripcional al gen de la β -galactosidasa. Como control negativo se empleó una fusión idéntica a la anterior, pero con el *cassete* β -gal-gentamicina clonado en sentido inverso. Se obtuvieron recombinantes con una copia única de la fusión en el

cromosoma. Se vio que el gen es de expresión constitutiva a lo largo de la curva de crecimiento en medio rico TSB, con un pico de actividad β -galactosidasa a las 24 horas (Fig.19).

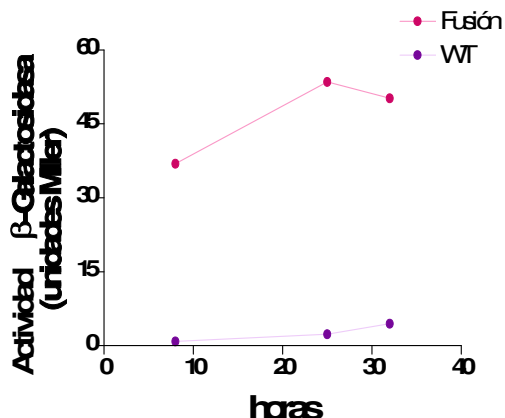


Fig.19: expresión *in vitro* del gen *bepC*.

Se estudió la expresión de este gen mediante una fusión transcripcional de su promotor al gen de la β -galactosidasa. Se vio que el gen se expresa en este medio de cultivo.

Ensayos de sensibilidad a drogas en *B. suis*

Los estudios de complementación heteróloga sugirieron la posibilidad de que BepC poseyese un rol en el transporte de compuestos pequeños y relativamente hidrofóbicos. Para investigar esta idea en *B. suis* se empleó una estrategia mutacional. La mutante *bepC:: Ω* , la mutante complementada con una copia intacta del gen y la cepa silvestre fueron empleadas en estos experimentos.

La secreción de proteínas vía un TISS en *B. suis* no fue estudiada porque existen fuertes evidencias que indican que *Brucella* spp. carece de este tipo de sistema de secreción (ver tesis doctoral del Dr. F.A. Martín). Además, es sabido que la cantidad de proteínas secretadas por esta bacteria al medio extracelular durante cultivo *in vitro* es muy baja (Dr.P. Baldi y Dr. R. Ugalde, comunicación personal).

La sensibilidad de *B. suis* a la colicina E1 fue medida en un experimento similar al realizado con *E. coli*. *B. suis* fue resistente a todas las concentraciones de colicina empleadas.

La sensibilidad de la mutante *bepC* a diversos compuestos tóxicos fue estudiada. Para poder analizar un espectro amplio de drogas se utilizó un test de difusión en agar en medio TSB, idéntico al empleado en los ensayos de complementación funcional. Se compararon los halos de inhibición para la cepa silvestre con los de la cepa mutante *bepC* y la cepa complementada (*bepC::* + pBBR1*bepC*). Se observó que la mutante *bepC* es hipersensible a una gran variedad de drogas, desde detergentes (Fig.20A) y colorantes (Fig.20B), hasta antibióticos (Fig.20C). Entre ellas se obtuvo una marcada inhibición del crecimiento en presencia de colorantes como rodamina 6G y drogas intercalantes como bromuro de etidio (Fig. 20B). Fue llamativa la marcada sensibilidad de *bepC* a la mezcla de sales biliares (Fig.20A). Este incremento en la sensibilidad también se observó en presencia del esteroide deoxicolato de sodio puro (DOC). En presencia de los detergentes SDS y CTAB también hubo incrementos significativos en la sensibilidad (Fig. 20A).

Además, la mutante *bepC* también fue significativamente más sensible que la cepa silvestre a antibióticos β -lactámicos (carbenicilina y ampicilina), macrólidos (eritromicina), aminoglicósidos (amikacina), quinolonas (norfloxacina) y tetraciclina (Fig.20C). Algunos de estos antibióticos, como por ejemplo la tetraciclina y la norfloxacina son empleados de rutina en el tratamiento de la brucelosis.

En cambio, la mutación en *bepC* no alteró los niveles de sensibilidad de *B. suis* a berberina, rifampicina y ácido nalidíxico (no mostrado). En todos los casos la cepa complementada recupera los niveles de sensibilidad correspondientes a la cepa silvestre.

Estos resultados confirman que la proteína de membrana externa BepC cumple un rol en el eflujo de compuestos tóxicos, y sugieren que BepC es más eficiente en la eliminación de moléculas relativamente hidrofóbicas o anfipáticas.

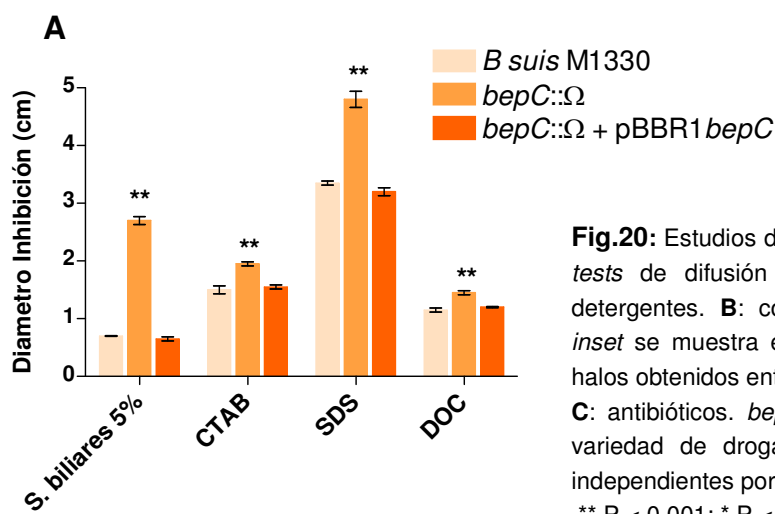
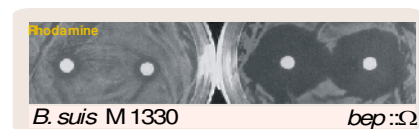
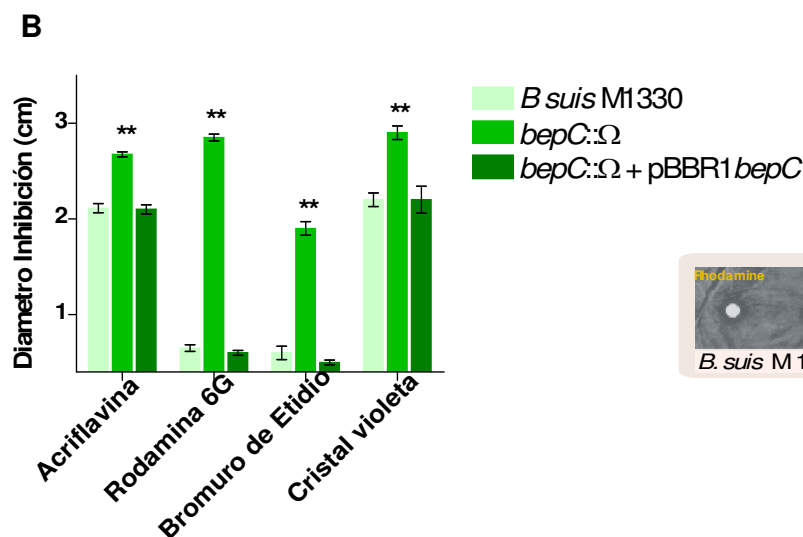
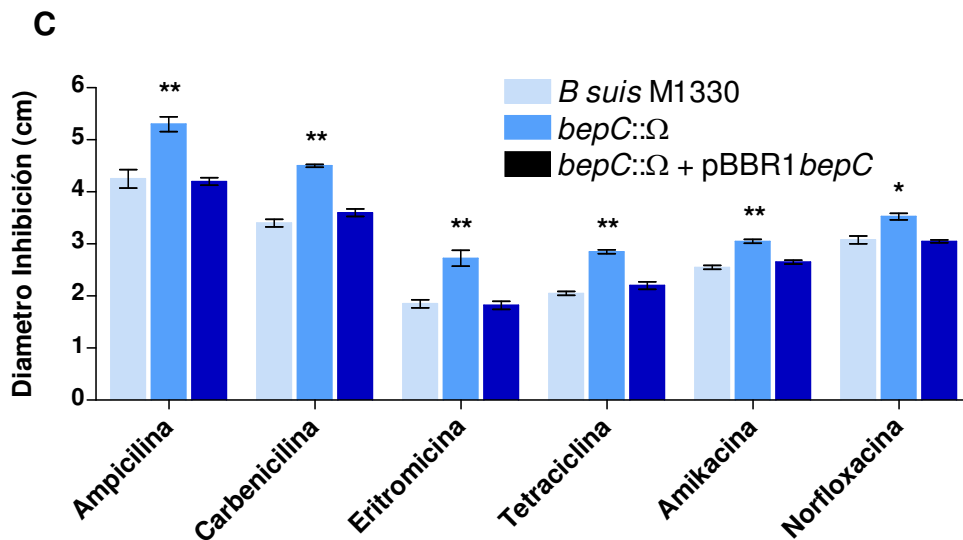


Fig.20: Estudios de sensibilidad a drogas mediante tests de difusión en disco. **A:** sales biliares y detergentes. **B:** colorantes e intercalantes. En el *inset* se muestra en detalle las diferencias en los halos obtenidos entre mutante y *wt*.

C: antibióticos. *bepC* es hipersensible a una gran variedad de drogas. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado para cada droga.

** P < 0.001; * P < 0.005.





Virulencia: ensayos en modelos celulares

Se estudiaron los efectos de la mutación en *bepC* sobre la virulencia en diversos modelos. Se analizaron primero dos modelos celulares: la línea de macrófagos J774 y células HeLa, se eligieron estos tipos celulares porque *Brucella* es capaz de invadir tanto fagocitos profesionales como no-profesionales.

No se observaron diferencias en la invasión o replicación intracelular entre las cepas silvestre, mutante y complementada en ninguna de las líneas estudiadas (Fig.21A y B). Es decir, que la mutación en *bepC* no afecta la supervivencia intracelular de la bacteria en estas líneas.

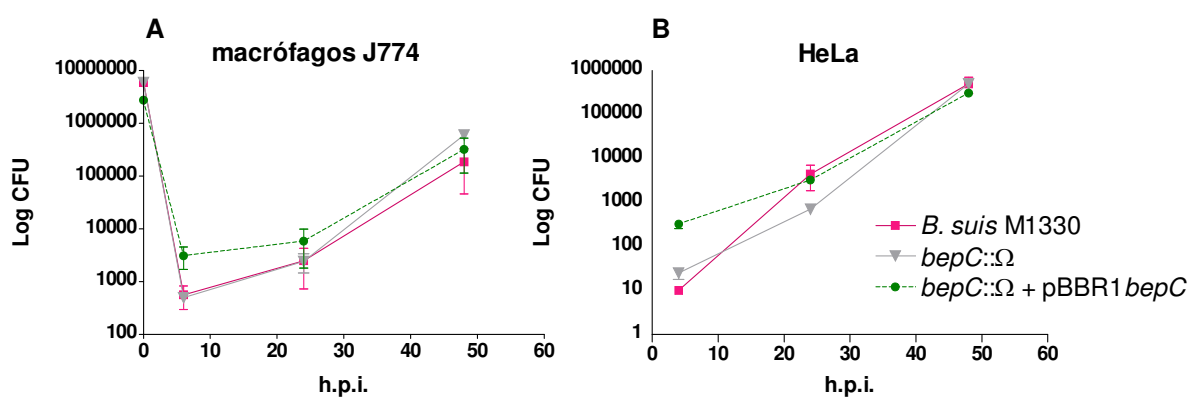


Fig.21: Virulencia en dos modelos celulares. **A:** macrófagos J774. **B:** células HeLa. No se vieron diferencias en la invasión o replicación intracelular entre las cepas estudiadas. Es decir, que BepC no es crucial para la supervivencia intracelular de la bacteria en estas líneas celulares.

Virulencia: ensayos in vivo

Se empleó el ratón (BALB/c) como modelo animal. En este modelo *Brucella* es capaz de establecer una infección crónica caracterizada por una gran acumulación de bacterias en el bazo. Para estudiar la función de BepC en la supervivencia de *B. suis* *in vivo* se inocularon cada una de las cepas en ratones de 8 semanas, se sacrificaron tandas de ratones ($n = 5$) a distintos tiempos, se extrajo el bazo y se hizo un recuento de las bacterias presentes. La mutante presentó una marcada reducción en cuanto a su presencia en el bazo de los ratones infectados en todos los tiempos medidos (3 logs respecto de la wt luego de 2 semanas p.i., y entre 2 y 3 logs en los tiempos posteriores). (Ver Fig.22). Estas observaciones muestran que BepC es necesaria para que exista un curso normal de la infección en este modelo.

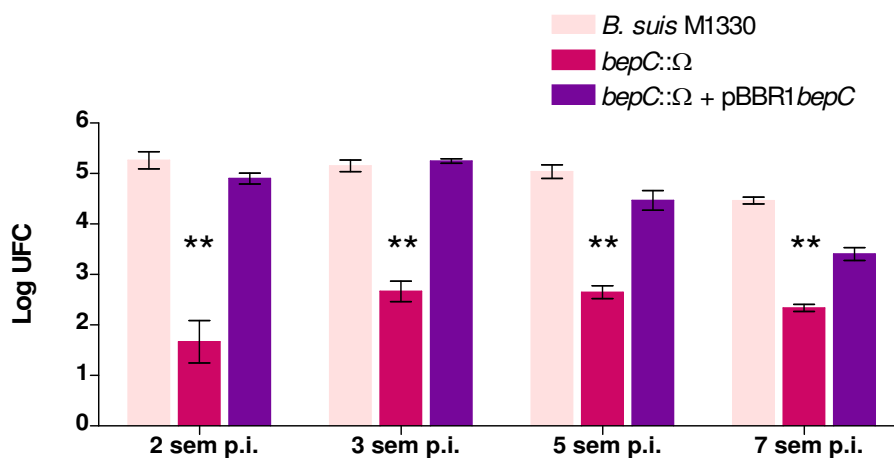


Fig.22: Virulencia en ratón: se estudió el curso de la infección en ratones BALB/c. Se calcularon las unidades formadoras de colonias para las cepas silvestre, mutante y complementada en bazos de ratones infectados 2, 3, 5 y 7 semanas post-inoculación. ** $P < 0.001$

En este caso también se observó una complementación total de los fenotipos estudiados, dado que la cepa que porta una copia silvestre del gen *bepC* (*bepC::Ω* + pBBR1 *bepC*) presenta niveles de virulencia comparables a los de la cepa silvestre en todos los tiempos estudiados.

Estos resultados prueban que BepC participa en la resistencia natural a compuestos tóxicos en *B. suis*, y potencialmente en alguna otra función de transporte. Su rol fisiológico es relevante en la supervivencia de la bacteria en el hospedador.

En conjunto, estos resultados conforman una descripción de las funciones de BepC de *B. suis*; esta proteína de membrana externa, homóloga a TolC de *E. coli*, resultó ser miembro de sistemas tripartitos de transporte, involucrados en el eflujo de compuestos tóxicos. Además, empleando diversos modelos, mostramos que contribuye significativamente a la supervivencia de la bacteria durante el proceso de infección al hospedador.

Capítulo II: adhesión, Phage Display

En este capítulo y en el próximo nos dedicamos a discernir cuáles son los factores de *Brucella* que promueven la adhesión y la invasión de las células del hospedador. Basándonos en los genomas y utilizando distintas estrategias genéticas, estudiamos factores extracelulares que podrían potencialmente influenciar la adherencia de *Brucella* spp. a las células del hospedador, a otras superficies como la matriz extracelular, o entre las mismas bacterias.

Recientemente se demostró que *B. abortus* y *B. melitensis* son capaces de unirse a células epiteliales y macrófagos con una cinética característica. La adherencia sería dependiente de receptores sobre las células que contienen residuos de ácido siálico y sulfato; y ciertas proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, colágeno y vitronectina podrían hacer de puente en las etapas de adhesión⁶⁹. Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos construir una biblioteca de *display* en fagos (tamaño 8×10^6 clones), con el fin de identificar posibles adhesinas, receptinas o invasinas de *B. suis* y sus dominios mínimos de unión. En este capítulo se detallan los experimentos realizados y los resultados obtenidos a partir del trabajo con la biblioteca.

En teoría, estas bibliotecas consisten en grandes números de fagos que, en conjunto, presentan en superficie todas las proteínas o dominios proteicos codificados en el genoma bacteriano. Se usó como base el sistema descrito por Jacobsson et al¹⁷⁶, que permite expresar péptidos o proteínas, fusionados a proteínas virales (en este caso PVIII), en la superficie de ciertos fagos (M13). A partir de ella, y mediante un proceso de selección por afinidad (*panning*), aislamos e identificamos partículas de fagos que expresaban en superficie potenciales moléculas de adhesión. Los primeros ligandos utilizados fueron fibronectina y fetuína, dado que ha sido demostrado previamente que ambos pueden mediar en procesos de adhesión entre bacterias y células eucariotas.

Como resultado de estos experimentos obtuvimos cuatro genes candidatos que codifican posibles proteínas de adhesión. Las primeras tres proteínas fueron denominadas BpcA, B, C. La cuarta de ellas, por motivos que se explican después, fue denominada BmaC. Trabajamos con los cuatro candidatos para confirmar su rol en la adhesión/invasión. Tres de ellos probaron estar involucrados en la interacción de *B. suis* con la célula eucarionte, por lo que su rol fisiológico como moléculas de adhesión es altamente probable. Luego profundizamos el análisis del candidato más interesante. Para ello obtuvimos una mutante por delección *bmaC*, y estudiamos la capacidad de adhesión/invasión de esta cepa a células, a otras bacterias y a superficies abióticas. También determinamos los efectos de la mutación sobre la virulencia en *B. suis*, empleando modelos celulares. De esta forma demostramos que BmaC contribuye significativamente a la adhesión de *B. suis* a las células del hospedador durante el proceso de infección.

Construcción de una phage display library

La técnica “Phage Display” fue descrita por primera vez en 1985 por G. Smith. Permite expresar péptidos o proteínas, fusionados a proteínas virales, en la superficie de ciertos fagos. Las fusiones se disponen de una forma “inmunológicamente accesible”, por emplear las propias palabras de Smith, y permiten la interacción de los péptidos expuestos con algún ligando de interés. Emplea fagos filamentosos de *E. coli* (M13, f1, etc.) como vectores/fagémidos. Esta técnica es particularmente útil cuando se quieren identificar nuevos pares de interacción a un ligando conocido; posee dos grandes ventajas que la definen: cuando una proteína de fusión es expresada en la superficie del fago, éste adquiere cierta afinidad por algún ligando (capacidad de *binding*). Los fagos que poseen esta nueva propiedad pueden ser separados de la mezcla y aislados por un proceso de selección por afinidad conocido como *panning*. La selección por afinidad reemplaza al *screening* tradicional, permitiendo el análisis de una mayor cantidad de clones en poco tiempo. Además, la molécula que participa en la interacción (proteína de fusión) está ligada físicamente a la secuencia de ADN que la codifica. Esta unión entre fenotipo y genotipo mediada por el virus (que actúa como *carrier* para el gen y para la proteína) permite el aislamiento selectivo y la amplificación de un fago particular que porta el gen de interés de un *pool* de millones de fagos.

Las cinco proteínas mayoritarias que componen a este tipo de fagos han sido usadas en el *display* de péptidos foráneos, explotando en diversas variantes de la técnica, las propiedades de cada una de ellas (ver introducción). La técnica ha demostrado ser una herramienta muy poderosa en la identificación y caracterización de interacciones entre proteínas bacterianas y sus hospedadores eucariotas. Debido a ello, se empleó el *phage display* para identificar adhesinas, receptinas, invasinas, y sus dominios mínimos de unión, en *B. suis*.

Como se comentó antes, se utilizó el sistema descrito por Jacobsson et al,¹⁷⁶ que emplea la proteína pVIII del fago M13 como *carrier*. Se purificó ADN genómico de *Brucella suis*, y se preparó ADN del vector pG8SAET. Ambos se utilizaron en la construcción de la biblioteca (ver Materiales y Métodos para una descripción detallada de cada paso de la construcción). Finalmente se obtuvo una *library* con un título de 5.2×10^{11} ufc/ml, y un tamaño de 8×10^6 clones. Luego se realizaron varios procedimientos para corroborar la calidad y representatividad de la biblioteca, que se describen más adelante. Estos pasos son de crucial importancia, ya que los resultados obtenidos en el *panning* dependen directamente de la calidad de la biblioteca.

Algunas consideraciones sobre el vector

En la construcción de la biblioteca de *display* en fagos se empleó el vector pG8SAET¹⁷⁶. Este fagémido permite la obtención de fusiones traduccionales a la proteína pVIII del fago M13. El vector de 3395 pb, cuenta con un marcador de resistencia (ampicilina^R), un origen de replicación en *E. coli* (*colE1*) y un *cassette* en el que están codificados los factores que garantizan la expresión de la fusión. En la primera porción del *cassette* se ubican un promotor de expresión constitutiva y una secuencia señal (que

dirige a la proteína sintetizada hacia la membrana de *E. coli*), ambos provenientes de la proteína A de *Staphylococcus* sp. En la segunda porción se ubican fusionados un E-tag y el gen *gVIII* del fago M13. Entre ambas porciones hay un cambio en el marco de lectura, por lo que no hay expresión de pVIII a partir del vector vacío (ver Fig.1). Esta disposición de las partes permite la expresión de fusiones a pVIII siempre y cuando el inserto clonado corrija el marco de lectura. En caso de producirse una fusión, la presencia del E-tag permite detectar a los clones positivos por *colony blot*, empleando un anticuerpo comercial que lo reconoce.

Las células que portan al fagémido pG8SAET sólo son capaces de producir nuevos fagos infectivos si son co-infectadas con un fago *helper* (R408) que aporta las funciones faltantes. Los fagos resultantes presentarán en superficie algunas copias de la fusión (ver estrategias de display en Introducción).

Fig.1: esquema del *cassette* de expresión. Entre la secuencia señal y el E-tag existe un cambio en el marco de lectura. Si el inserto clonado corrige el marco hay expresión de la fusión.

— Sitio de clonado *Sna*BI.



Tamaño y representatividad

El número de clones requeridos en la biblioteca para cubrir completamente el genoma fue calculado a partir de la siguiente ecuación¹⁷⁶ (ver anexo):

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - a/b) \text{ donde,}$$

N = número de clones requeridos

P = probabilidad de que un cierto fragmento esté presente

a = tamaño promedio de los fragmentos de ADN en Kb

b = tamaño total del genoma.

En este caso:

a = 2.6 Kb (tamaño medio de los insertos)

b = 3294935 pb (genoma de *Brucella*)

P = 99.9 %

Por lo que el número de clones requerido sería:

$$N = 8.75 \times 10^3 \text{ clones.}$$

Pero teniendo en cuenta que con este sistema sólo 1 de cada 18 clones tendrá el inserto en orientación y en marco correcto, el nro. de clones requeridos aumenta a:

$$N = 1.57 \times 10^5 \text{ clones.}$$

Y si además queremos que haya superposición en los insertos (x5), el N final asciende a:

$$N = 8 \times 10^5 \text{ clones.}$$

El número de clones que llevaban insertos fue estimado por *colony* PCR. El tamaño de la biblioteca obtenida fue de 8×10^6 clones, que es un orden de magnitud más que el mínimo requerido. La cantidad de fagos presentes en la biblioteca fue estimada por titulación de una alícuota. Se obtuvo un título de 5.2×10^{11} ufc/ml. Dado que los parámetros obtenidos fueron los deseables, se empleó esta *library* para la búsqueda de adhesinas en *B. suis*.

Rondas de panning

El panning se llevó a cabo de la siguiente forma (Fig.2): se inmovilizaron los ligandos elegidos en una placa *multiwell*, luego se agregó la biblioteca de fagos y se incubó por 4 horas, los fagos unidos inespecíficamente se removieron mediante lavados exhaustivos y, por último, los fagos unidos específicamente al ligando fueron liberados por alguno de dos métodos diferentes: competencia o pH. El primero consiste en eluir los fagos utilizando una solución del ligando cinco a diez veces más concentrada que la que se utilizó para inmovilizarlo; con este método se espera una elución muy específica, ya que sólo se liberan los fagos que pueden interactuar con el ligando libre. El segundo se basa en un cambio drástico y abrupto en el pH; con este método se espera liberar a todos los fagos presentes en el pocillo. Si bien ambos métodos se basan en principios distintos, con los dos se han obtenido buenos resultados¹⁷⁶.

Los fagos obtenidos se usaron para infectar *E. coli* (TG1); en esta cepa los fagos se mantienen como episomas, de modo que la secuencia clonada puede entonces determinarse fácilmente. De ser necesario, el proceso puede repetirse generando nuevos fagos (por infección con fago *helper* de la cepa antes mencionada). En este caso se realizaron tres rondas sucesivas de enriquecimiento para cada ligando.

Previamente, Castañeda-Roldán y col. propusieron que proteínas de matriz extracelular como fibronectina y/o proteínas sustituidas con ácido siálico del hospedador participarían en la unión de *Brucella* a dicha matriz o a algún receptor sobre la célula eucariota⁶⁹. Por este motivo, los primeros ligandos utilizados fueron fibronectina y fetuína, que es una proteína con alto contenido en ácido siálico. Además, ha sido demostrado previamente que ambas pueden mediar en procesos de adhesión entre bacterias y células eucariotas⁶⁹.

Luego de tres rondas de *panning* se secuenciaron 130 clones con oligonucleótidos específicos complementarios a zonas del vector. Un total de 75 de ellos provenía del *panning* con fibronectina, los 55 restantes provenían del *panning* con fetuína. Los genes correspondientes fueron identificados bioinformáticamente mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En paralelo se realizaron una serie de controles exhaustivos para garantizar la calidad de los resultados. Estos controles se detallan en la próxima sección.

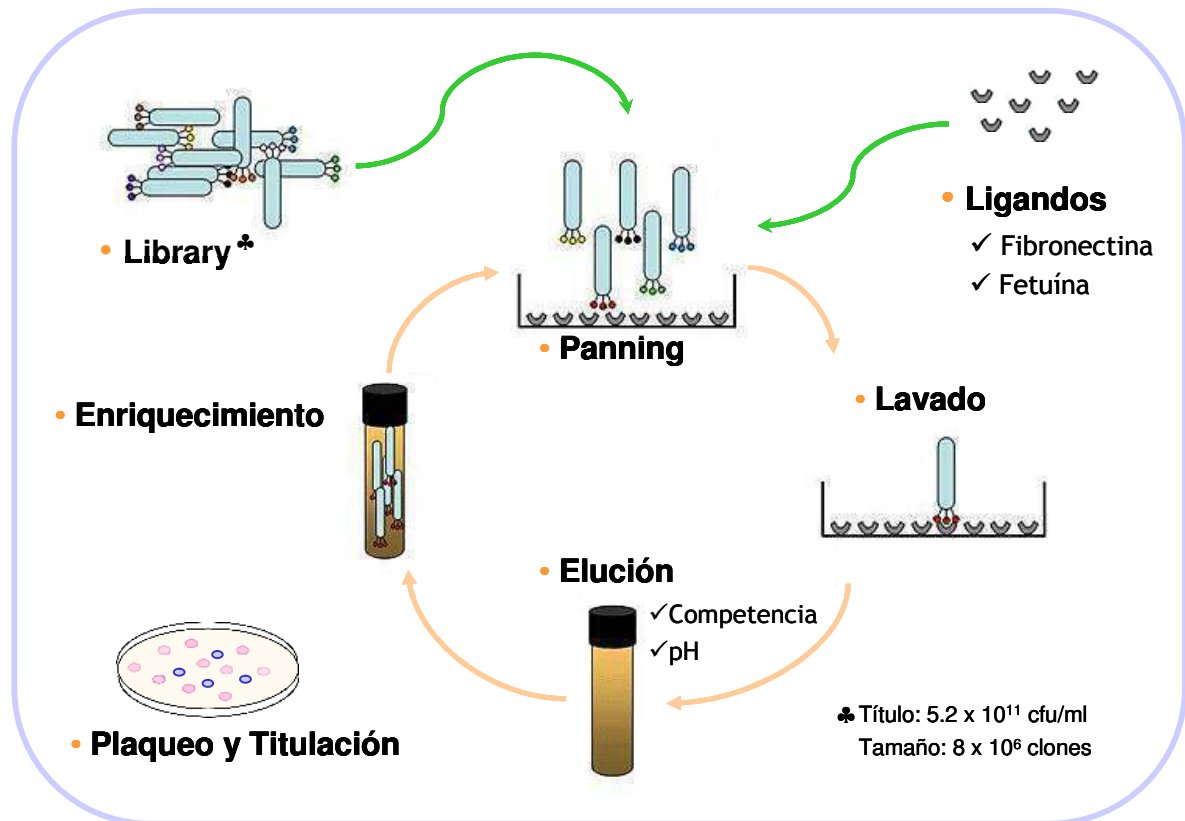


Fig.2: rondas de enriquecimiento. Luego de cada ronda se obtienen fagos con capacidad de unión específica al ligando inmovilizado.

En la tabla 2 se describen 20 de los clones que fueron obtenidos en el *panning* con fetuína y 35 de los obtenidos con fibronectina (el resto fue omitido por simplificación). Para cada uno de ellos se indica el ligando con el que fue obtenido, el número de *panning* en el que se lo aisló, el número de clon que le corresponde, la denominación del gen (de acuerdo a la anotación del genoma de *B. suis* en CMR TIGR), la función predicha y si es una posible proteína de membrana. Las funciones predichas para cada gen son las informadas en la anotación del genoma. Las proteínas hipotéticas se indicaron como “HP” por sus siglas en inglés (Hypothetical Protein), para las proteínas conservadas (presentes en toda la familia Brucellaceae) se empleó CHP (Conserved Hypothetical Protein). En algunos casos en los que el inserto clonado era muy extenso se observa que hay varios genes anotados para un mismo clon (ver tabla 2).

Tabla 1: identificación de los clones obtenidos por *panning*.

Ligando	Panning	Clon	Gen	Función	Prot. de membrana?
Fet	3º	D8.9	BRA0720	<i>ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein</i>	Si
Fet	3º	D8.13	BRA0586	VirJ	Si
Fet	3º	D8.1	BRA0434	CHP	Si
Fet	3º	D8.2	BRA0434	CHP	Si
Fet	3º	D8.9	BRA0434	CHP	Si
Fet	3º	D8-7	BR2175	<i>lipoprotein, YaeC family</i>	Si
Fet	1º	D2-3	BR2171	<i>enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase</i>	No
Fet	3º	D8.11	BR2171	<i>enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase</i>	No
Fet	1º	D2-3	BR2170	<i>methyltransferase</i>	No
Fet	3º	D8.11	BR2170	<i>methyltransferase</i>	No
Fet	1º	D1-7	BR2154	HP	No
Fet	1º	D1-7	BR2153	CHP	No
Fet	2º	D5-10	BR2032	<i>acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, alpha subunit</i>	Si
Fet	2º	D5-10	BR2029	<i>shikimate kinase</i>	Si
Fet	2º	D5-10	BR2028	<i>3-dehydroquinate synthase</i>	Si
Fet	3º	D8-5	BR2014	<i>membrane protein, putative</i>	Si
Fet	3º	D8.3	BR1629	<i>oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family</i>	No
Fet	3º	D8-12	BR1582	<i>dipeptide ABC transporter, ATP-binding protein, putative</i>	Si
Fet	2º	D4-3	BR1563	<i>MutT/nudix family protein</i>	No
Fet	2º	D4-3	BR1562	<i>membrane protein</i>	Si
Fet	2º	D4-3	BR1561	<i>glutathione S-transferase domain protein</i>	No
Fet	2º	D5-8	BR1559	CHP	No
Fet	1º	D2-10	BR1304	<i>membrane protein</i>	Si
Fet	1º	D2-10	BR1303	<i>membrane protein</i>	Si
Fet	1º	D2-10	BR1302	CHP	No
Fet	1º	D2-10	BR1301	<i>precorrin-3B C17-methyltransferase</i>	No
Fet	1º	D2-10	BR1300	<i>precorrin-4 C11-methyltransferase</i>	No
Fet	1º	D1-8	BR1046	<i>phosphoribosyltransferase</i>	No
Fet	2º	D5-3	BR0855	<i>acyl carrier protein, putative</i>	No
Fet	3º	D8.10	BR0793	<i>O-acetylhomoserine/O-acetylserine sulfhydrylase family protein</i>	No
Fet	3º	D8.10	BR0792	CHP	Si
Fet	1º	D2-9		Inserto muy corto	
Fet	2º	D5-9		intergen	
Fib	3º	F9.30	BSU_B1118	<i>rRNA-16S ribosomal RNA</i>	No
Fib	3º	F9.14	BSU_B0969	CHP	No
Fib	3º	F10.10	BRA1148	<i>outer membrane autotransporter</i>	Si
Fib	3º	F9.17	BRA1148	<i>outer membrane autotransporter</i>	Si
Fib	3º	F9.23	BRA1127	CHP	No

Fib	3º	F9.37	BRA1081	<i>peptide ABC transporter, permease protein</i>	Si
Fib	3º	F10.31	BRA0971	<i>NAD(P) transhydrogenase, beta subunit</i>	No
Fib	3º	F10.48	BRA0897	HP	Si
Fib	3º	F10.48	BRA0896	HP	No
Fib	3º	F10.46	BRA0874	CHP	No
Fib	3º	F10.5	BRA0691	<i>sugar ABC transporter, permease protein.</i>	Si
Fib	3º	F9.19	BRA0391	<i>Alcohol deshydrogenase Zinc-containing</i>	No
Fib	3º	F10.3	BRA0175	CHP	Si
Fib	3º	F10.4	BRA0175	CHP	Si
Fib	3º	F10.18	BRA0175	CHP	Si
Fib	3º	F9.04	BRA0095	HP	Si
Fib	3º	F9.12	BRA0095	HP	Si
Fib	3º	F9.25	BRA0095	HP	Si
Fib	3º	F9.31	BRA0095	HP	Si
Fib	3º	F10.9	BRA0095	HP	Si
Fib	3º	F10.49	BRA0095	HP	Si
Fib	3º	F10.2	BR2169	<i>polyribonucleotide nucleotidyltransferase</i>	No
Fib	3º	F9.34	BR2103	<i>helicase, UvrD/Rep family</i>	No
Fib	3º	F10.8	BR1955	<i>amino acid ABC transporter, permease protein</i>	Si
Fib	3º	F10.44	BR1911	CHP	No
Fib	3º	F10.44	BR1910	CHP	No
Fib	3º	F9.05	BR1608	<i>AsmA family protein</i>	Si
Fib	3º	F9.49	BR1136	CHP	Si
Fib	3º	F9.49	BR1135	HP	No
Fib	3º	F9.36	BR0834	HP	No
Fib	3º	F9.36	BR0833	<i>drug resistance transporter, Bcr/CflA family</i>	Si
Fib	3º	F9.20	BR0687	<i>Membrane protein permease YjgP/Q</i>	Si
Fib	3º	F9.40	BR0678	HP	No
Fib	3º	F9.40	BR0677	<i>cysteinyI-tRNA synthetase</i>	No
Fib	3º	F10.13	BR0119	<i>outer membrane protein, putative</i>	Si
Fib	3º	F10.23	BR0114	CHP	No
Fib	3º	F10.47	BR0114	CHP	No
Fib	3º	F10.23	BR0113	<i>phenazine biosynthesis protein, PhzF family</i>	No
Fib	3º	F10.47	BR0113	<i>phenazine biosynthesis protein, PhzF family</i>	No
Fib	3º	F9.27		<i>Transposase in B. melitensis.</i>	No

Se identificaron varios clones con insertos derivados de un mismo gen (marcados en gris en la tabla). Estos clones fueron el punto de partida en la búsqueda de candidatos. En análisis de estos clones se describe en las próximas secciones.

Controles del panning y obtención de candidatos

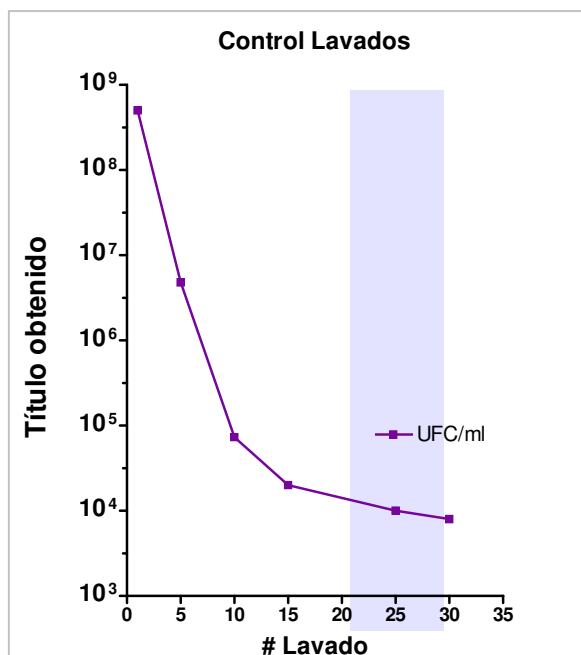


Fig.3: control de los lavados. Los fagos liberados en los lavados se utilizaron para infectar *E. coli* y titular. Se observa que la cantidad de fagos unidos al *well* baja drásticamente al lavar.

Se controló la eficiencia de los lavados en la remoción de partículas fágicas unidas inespecíficamente (Fig.3) y la eficacia de los distintos métodos de elución (Fig.4). Se partió de una población inicial de $\sim 1 \times 10^{11}$ UFC/ml. Se observó que, a medida que progresaban los lavados, se recuperaba una cantidad menor de fagos unidos inespecíficamente. Alrededor de los lavados 25 o 30 la cantidad de fagos recuperados tendía a estabilizarse en aproximadamente 5×10^3 UFC/ml. Luego, se emplearon los dos métodos de elución para liberar a los fagos unidos específicamente. En la elución por competencia se liberaron los fagos retenidos al *well* agregando ligando libre. En la elución por pH se liberaron todos los fagos unidos por un cambio drástico en el pH. El título obtenido por pH siempre fue mayor al que se obtuvo por competencia (Fig. 4 A y B). Al eluir empleando cualquiera de los dos métodos, se recuperaron títulos mayores a 1×10^5 UFC/ml.

Esto indicaría que los lavados fueron efectivos, es decir, que se eliminó a una gran proporción de los fagos unidos inespecíficamente; y que los métodos de elución fueron capaces de liberar fagos que estaban interaccionando específicamente con el ligando.

Se ensayó un control extra en las eluciones por competencia: se compararon los títulos obtenidos empleando como ligando libre a la misma proteína inmovilizada o a una proteína no relacionada (Fig.5),

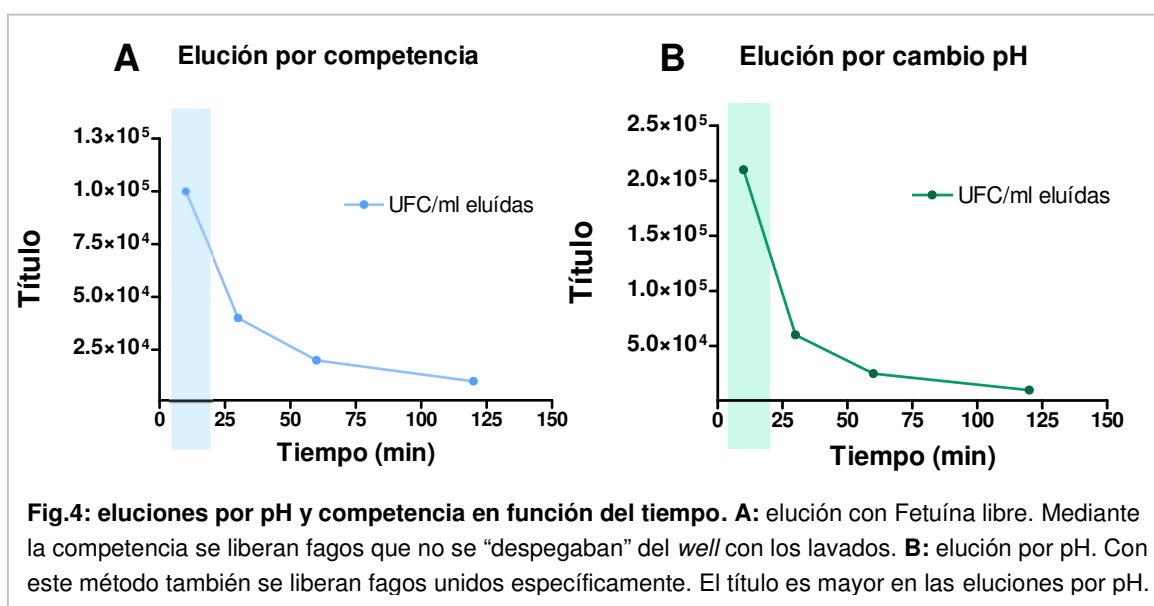
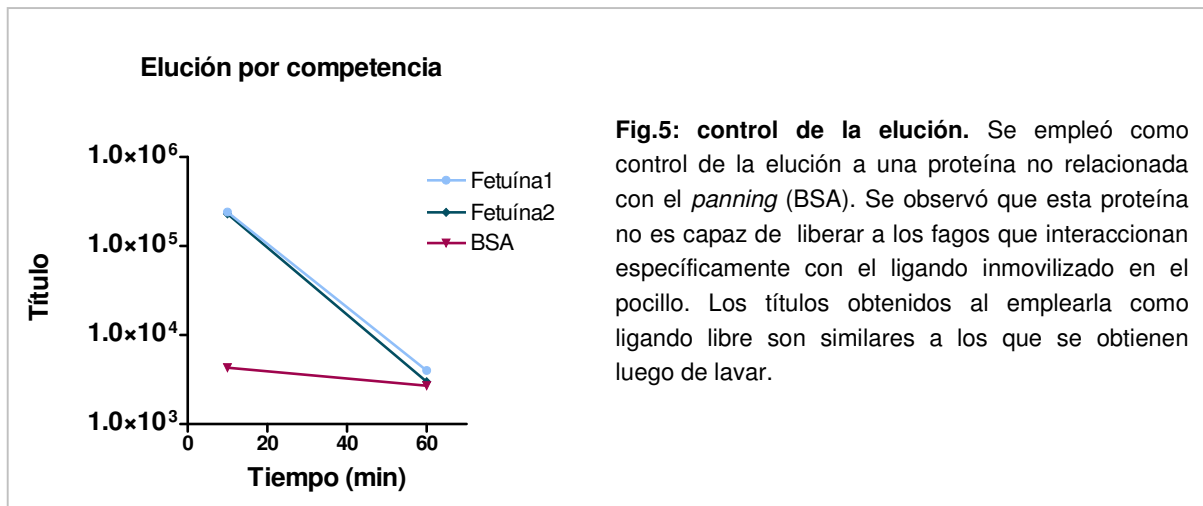


Fig.4: eluciones por pH y competencia en función del tiempo. **A:** elución con Fetuína libre. Mediante la competencia se liberan fagos que no se “despegaban” del *well* con los lavados. **B:** elución por pH. Con este método también se liberan fagos unidos específicamente. El título es mayor en las eluciones por pH.

se empleó fetuína como ligando libre e inmovilizado, y seroalbúmina bovina (BSA) como control. Se observó que los títulos obtenidos con fetuína son varios órdenes de magnitud mayores a los obtenidos con BSA, que sólo alcanzan valores semejantes a los que se obtenían luego de aproximadamente 20 lavados. Esto indica que la elución es específica, y que proteínas no relacionadas no son capaces de liberar a los fagos que interaccionan específicamente con el ligando inmovilizado.



Los controles empleados hasta este momento demostraron que las primeras tres etapas del *panning* (inmovilización, lavado y elución) estaban funcionando de acuerdo a lo deseable. Para constatar que se estaba logrando un buen enriquecimiento se controlaron otros parámetros: en general, el *binding* específico se manifiesta mediante un GRAN aumento en el número de fagos eluidos entre la primera y la segunda ronda de *panning*, por lo que el título de los fagos recuperados debe aumentar a medida que progresan los *pannings*. Además, el número de clones correctos (fusiones en marco) también debe aumentar; este número se puede determinar por *screening* de expresión del E-tag por *colony blot*. Ambos parámetros fueron medidos y los resultados se detallan en la tabla 2.

En los dos experimentos (fibronectina y fetuína) se obtuvieron grandes aumentos en los títulos luego del primer *panning*; para fibronectina el incremento fue de tres órdenes y para fetuína fue de dos órdenes de magnitud. En ambos experimentos se detectaron más de 90% de clones E-tag positivos en el tercer *panning*.

Todos los controles realizados fueron satisfactorios, por lo que se decidió continuar con el análisis de los candidatos secuenciados.

Resultados obtenidos luego de enfrentar una biblioteca de fagos de <i>B. suis</i> contra Fibronectina (1^{er} experimento)			
Panning	Fagos eluidos (ufc/ml)	E-tag positivos (%)	Número de clones secuenciados
1 ^o	2 x 10 ⁵	3	} 75
2 ^o	3 x 10 ⁸	40	
3 ^o	1 x 10 ⁹	90	
Resultados obtenidos luego de enfrentar una biblioteca de fagos de <i>B. suis</i> contra Fetuina			
Panning	Fagos eluidos (ufc/ml)	E-tag positivos (%)	Número de clones secuenciados
1 ^o	5.6 x 10 ³	10	} 55
2 ^o	1 x 10 ⁵	40	
3 ^o	4 x 10 ⁶	95	

Tabla 2: título y % de clones E-tag positivos luego de cada *panning*.

Selección de candidatos

Como resultado de los *pannings* se obtuvieron ocho posibles candidatos (marcados en gris en la tabla 1). Se estableció un criterio de selección para determinar el orden de prioridades con el que se iba a tratar a estos candidatos. Primero se seleccionaron los clones que codificaban posibles proteínas de membrana; se empleó el programa TmHMM (*A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences*) que predice la presencia y orientación de dominios transmembrana en una secuencia polipeptídica. También se buscaron posibles proteínas extracelulares y porciones transmembrana compuestas por láminas. Este criterio se basa en que las adhesinas se deberían localizar en la membrana externa de la bacteria, o ser secretadas al medio extracelular. Como segundo criterio se tuvo en cuenta la aparición de insertos superpuestos; como ya dijimos, se identificaron varios clones con insertos derivados de un mismo gen. Según este segundo criterio, además de provenir del mismo gen, éstos insertos deberían ser diferentes en tamaño e, idealmente sus secuencias contendrían la zona de unión al ligando. Como tercer criterio se prefirieron clones aislados luego del tercer *panning* a los clones de rondas anteriores, asumiendo que la última ronda de selección estará enriquecida en fagos que presentan capacidad de unión específica. Además, en todos los casos, se prefirieron clones cuyos insertos eran un solo gen o dominio, a los clones que portaban secuencias de más de un gen, asumiendo que el *display* en superficie es más eficiente en los primeros.

Luego de aplicar estos criterios se obtuvieron cuatro genes candidatos que codificarían posibles proteínas de adhesión. Uno de estos candidatos fue identificado en los *pannings* con fetuína y los otros tres en los *pannings* con fibronectina. En la tabla 3 se resumen estos candidatos.

El candidato más relevante sería el gen BRA1148. Este gen codifica una proteína de la membrana externa perteneciente a la familia de autotransportadores de tipo I (o SSTV). Curiosamente este gen iba a ser estudiado mediante otra estrategia experimental, junto a los otros autotransportadores de tipo I de *B. suis*. En el planteo original de este proyecto de tesis BRA1148 era uno de los blancos de un estudio mutacional y de caracterización funcional, muy similar al que se llevó a cabo con los genes BR2013 y BRA0173, que se describe en el capítulo III. Que haya surgido como uno de los candidatos del *panning* es relevante porque refuerza las hipótesis iniciales de cada parte del proyecto, tanto la de selección por afinidad, como la de mutación de genes blanco.

Los genes BRA0173 y BR2013 fueron denominados *bmaA* y *B* respectivamente (por las siglas en inglés *Brucella monomeric autotransporter*) (ver capítulo 3). Como BRA1148 pertenece a la misma familia de estos genes en *Brucella* es pertinente llamarlo *bmaC*. Esta denominación es la que recibirá de aquí en adelante.

Los siguientes candidatos fueron los genes BRA0095, BRA0175 y BRA0434. Un análisis más minucioso de los dominios presentes en los marcos de lectura abiertos indicó que los productos de estos genes podrían estar involucrados en procesos de adhesión (ver tabla 3). Estos candidatos fueron denominados *bpcA*, *B* y *C* respectivamente (por *Brucella phage display candidate*). Es llamativo que otro de los candidatos seleccionados, BRA0175, se ubique a sólo 2 genes de distancia de otro de los autotransportadores (BRA0173).

Ligando	Panning	Denominación	Localización	Anotación	Posible función
Fibronectina	3°	BmaC	Membrana	Autotransportador membrana externa	Autotransportador de tipo I
Fibronectina	3°	BpcA	Membrana	Proteína hipotética	Filamentos flagelares, proteína de la capa externa FlaA ¹
Fibronectina	3°	BpcB	Membrana	Proteína hipotética conservada	Similar a miosina y kinesina ²
Fetuína	3°	BpcC	Membrana	Proteína hipotética conservada	Proteína de unión a Fibronectina/fibrinógeno Celulasa

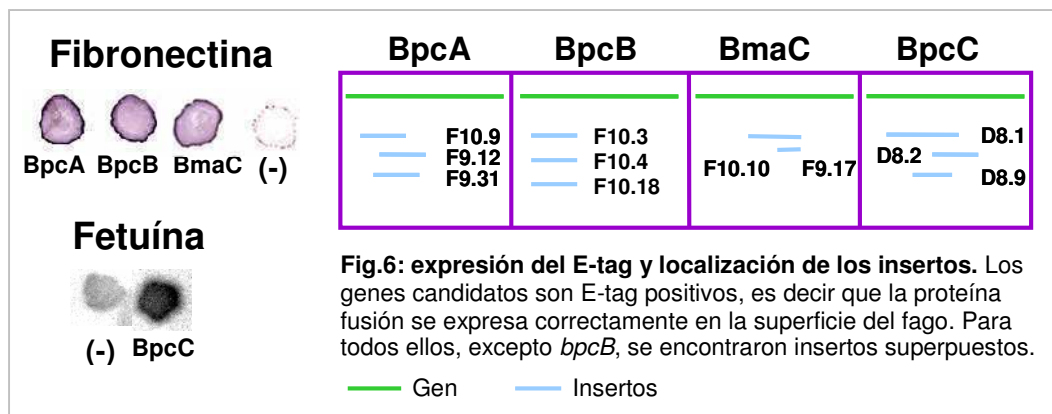
Tabla3: posibles adhesinas de *B. suis* aisladas por phage display

¹ Proteínas que componen el flagelo periplasmático de las espiroquetas. Proteínas de la membrana externa que poseen una porción periplasmática.

² Estos dominios proteicos se hallan presentes en pequeñas proteínas bacterianas, y también en las cadenas pesadas de la miosina y kinesina eucarióticas, en el C-terminal del dominio motor.

Para determinar la posible función de cada una de las proteínas se utilizó la base de datos PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

Vimos que como indicios de un buen experimento se pueden corroborar la expresión del E-tag codificado en el vector (indica expresión de la proteína fusión) mediante *colony blot*; y la aparición de insertos superpuestos, es decir, clones con insertos diferentes derivados de un mismo gen, que indican que se produjo una selección “verdadera”. Se emplearon ambos parámetros con los cuatro candidatos seleccionados: se corroboró la expresión de las fusiones en la superficie del fago, comparando con un control en el que se utilizó la misma cepa (TG1) que porta el vector del fagémido vacío (ver Fig.6). Y además, se demostró que los clones secuenciados poseen insertos superpuestos. Un esquema de los genes y de las zonas expuestas en cada fago se muestra en la figura 6.



Una vez corroborados estos parámetros se decidió continuar con el análisis de las cuatro posibles adhesinas. Para ello, a partir de cada uno de estos candidatos se generaron *stocks* de fagos puros por infección con un fago *helper* (R408), ver fig.7. Los fagos fueron titulados y luego se emplearon los *stocks* en la caracterización del *binding* de cada candidato (próxima sección).

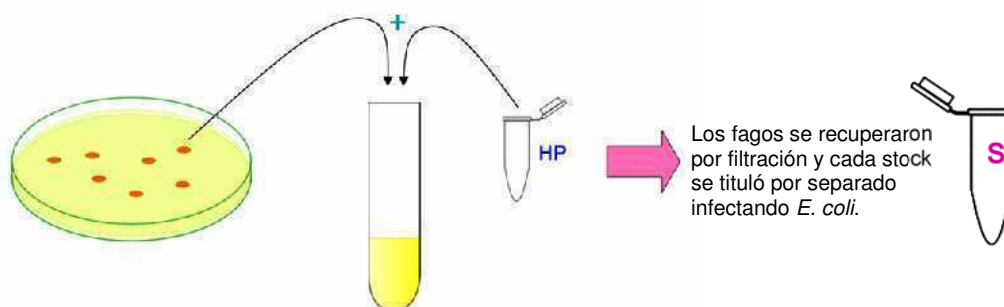


Fig.7: producción de *stocks* de fagos puros. Se generaron fagos a partir de cada candidato. Se obtuvo un valor de título para cada *stock*. HP: *helper phage*

Caracterización del binding: ELISA

Se demostró, por diversos métodos, que la interacción entre el ligando y cada candidato es específica. Primero se empleó la técnica de ELISA: se inmovilizó el ligando en los pocillos de una placa Maxisorp (Nunc), se bloqueó y luego se los enfrentó con los *stocks* de fagos puros (con un título estandarizado de 1×10^8 UFC/ml). Se lavó y se agregó un anticuerpo comercial anti-M13 conjugado a peroxidasa de rabanito (HRP). Se reveló empleando OPD y se leyeron los valores de absorbancia en un lector de placas. Se utilizó BSA como ligando control, esperando que los fagos no presentasen afinidad por esta proteína no relacionada. En cada caso se observó que la señal para Fibronectina o Fetuína siempre fue mucho mayor a la del control (BSA). Se muestran los resultados para los cuatro péptidos candidatos, los valores de absorbancia han sido normalizados respecto de los valores del ligando control (ver fig.8).

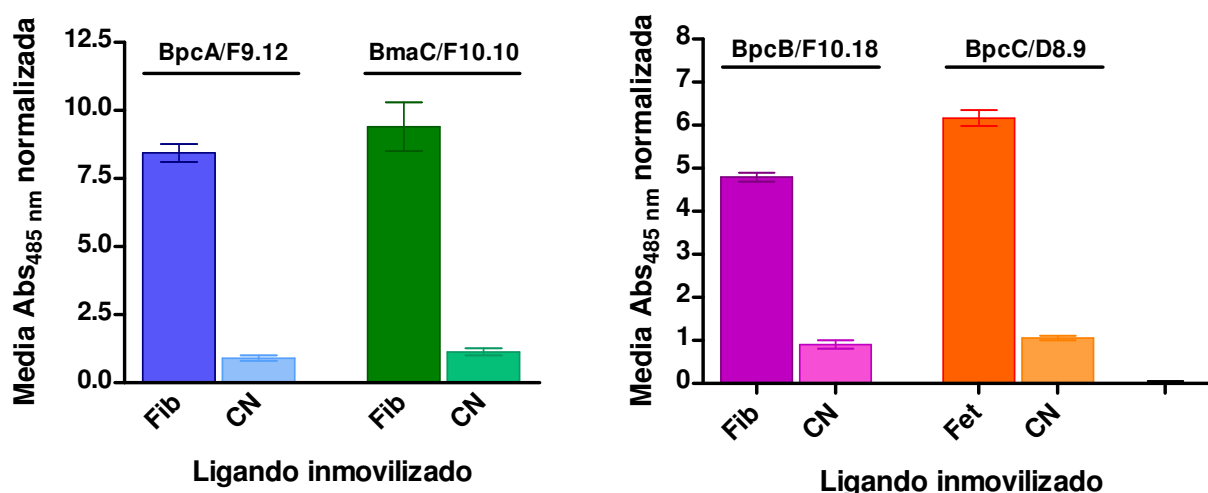


Fig.8: ELISA con *stocks* de fagos puros. Se indican los ligandos inmovilizados, Fib: fibronectina; Fet: fetuína; CN: control negativo BSA. El candidato estudiado y el *stock* empleado se detallan arriba de las barras en cada caso. Los valores de absorbancia fueron normalizados y se expresan en unidades arbitrarias.

Los títulos de los fagos fueron estandarizados en 1×10^8 UFC/ml porque se observó que, en general, esta dilución de cada *stock* era la mínima dilución que aportaba la máxima diferencia en la absorbancia; es decir, que diluciones menores del *stock* como 1×10^9 o 10^{10} UFC/ml no aportaban diferencias mayores en la absorbancia.

En los ensayos de ELISA convencionales, en los que se enfrenta un ligando inmovilizado a un anticuerpo mono o bivalente, se puede estimar un valor de afinidad que surge de esa interacción. Este no es el caso, lo primero que dificulta un análisis de ese tipo es que distintos fagos presentan en superficie un número distinto de proteínas de fusión, por lo que su avidéz por el ligando es diferente. Además, debido a la estrategia de *display* elegida, cada vez que se prepare un *stock* la avidéz media del mismo variará. Estos motivos hacen que sea imposible informar un valor de afinidad. En cambio, con este método sí se puede afirmar que los candidatos se unen significativamente más a su ligando que a otro no relacionado.

Caracterización del binding: panning

También por panning se determinó que la interacción es específica. Se comparó la capacidad de unión a diferentes ligandos mediante *pannings* en los que se emplearon *stocks* de fagos únicos purificados. En los *wells* del ensayo se inmovilizó el ligando de interés (fibronectina o fetuína según el caso), y en los *wells* control se inmovilizó BSA o la lumasina sintética de *B. abortus* (BLS). Luego se realizó una ronda de *panning* idéntica a las antes descritas, y finalmente se realizó un recuento de unidades formadoras de colonias como método para estimar la capacidad de *binding*. Se observó que en todos los casos el recuento es entre 1.5 y 2 órdenes mayor en los pocillos en donde se inmovilizó el ligando de interés comparando con los del control negativo, en donde se inmovilizó una proteína no relacionada (ver Fig.9). Estos ensayos como los anteriores fueron realizados por triplicado.

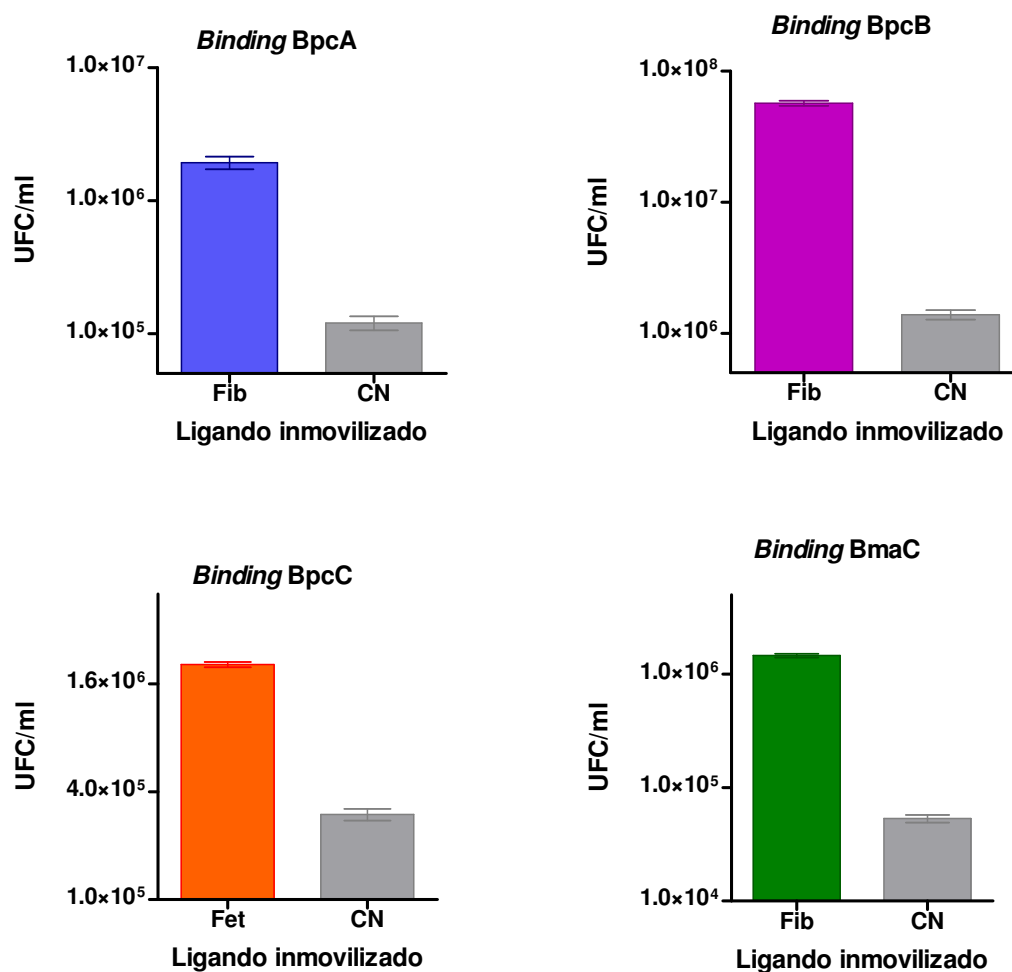


Fig.9: panning con stocks de fagos puros. Se indican los ligandos inmovilizados, Fib: fibronectina; Fet: fetuína; CN: control negativo BSA o BLS. El candidato estudiado se detalla arriba de las barras en cada caso. Los recuentos se expresan en unidades formadoras de colonias por mililitro.

Los dos últimos ensayos probaron que la interacción entre el ligando y cada candidato es específica. Entonces, se quiso investigar si esta interacción podría tener relevancia fisiológica durante la infección.

Bloqueo de la infección de *B. suis* con fagos

Se evaluó *ex vivo*, en células HeLa, la capacidad de los fagos que expresan en superficie posibles adhesinas de *B. suis* de afectar la interacción de *Brucella* con la célula hospedadora. Se esperaba que, si las proteínas expresadas en los fagos eran realmente moléculas de adhesión, la infección de *B. suis* se viese parcialmente bloqueada, dado que los fagos estarían ocupando sitios indispensables para la interacción de la bacteria con la célula. Se infectaron células HeLa del modo antes descrito, agregando en los pocillos del ensayo 1×10^8 fagos para bloquear la interacción. Se empleó además un fago control negativo (CN), que expresa en superficie una proteína no relacionada a la adhesión (este fago expresa en superficie una porción de RibD de *B. suis*, una proteína intermediaria en la síntesis de riboflavina). Alternativamente también se empleó el fago *helper* como control negativo. También se agregó un control de infección con la bacteria sin fagos (wt). Luego de la infección se realizaron recuentos de las bacterias recuperadas de cada pocillo para determinar si la presencia de alguno de los fagos altera la adhesión/invasión de *B. suis* (Fig.10).

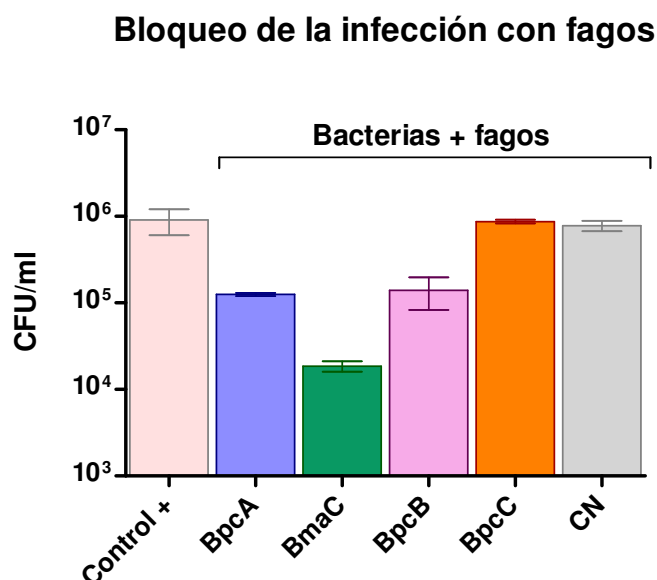


Fig.10: bloqueo de la infección de *Brucella* a células HeLa. Se muestran los recuentos obtenidos en distintas infecciones. En el control + se emplearon bacterias de la cepa silvestre de *B. suis* sin agregados. En el resto de los ensayos se emplearon las bacterias silvestres y distintos fagos para co-infectar las células. Los fagos empleados en cada infección se indican en cada barra. CN corresponde a un fago control, no relacionado con la adhesión. Los recuentos se expresan en UFC/ml.

Se observó que algunos de los fagos fueron capaces de interferir en la infección y otros no. Como era de esperar, los fagos control (CN) mostraron el mismo recuento que el control positivo de bacterias sin fagos. BpcC también dio recuentos muy similares, indicando que este fago no interfirió en la interacción bacterias-células. En cambio, BpcA, B y BmaC mostraron ser capaces de alterar esta interacción en distintas medidas, siendo BmaC el que produjo un bloqueo más eficiente (2 órdenes de magnitud). Por esto, se decidió profundizar en la caracterización de este candidato en cuanto a su posible función biológica.

Antes de proseguir con estos estudios, se puso a prueba una hipótesis sobre BpcC. Los estudios con este candidato indicaron que los fagos que presentaban en superficie a una porción de BpcC eran capaces de interaccionar específicamente con fetuína; esto se determinó tanto por ELISA como por *panning*. Sin embargo, estos fagos no fueron capaces de bloquear la adhesión/invasión de *B. suis* a las

células en ninguna medida. En principio, de acuerdo a nuestra hipótesis, este fago podría unirse a la fetuína por interacción de la fusión con los residuos de ácido siálico que cubren a la proteína. Pero también es posible que los fagos interaccionen con la porción proteica de la fetuína, lo cual no es relevante en este estudio. Por lo tanto era importante determinar qué tipo de interacción estaba ocurriendo, para ello se preparó asialofetuína a partir de fetuína por tratamiento con hidróxido de Sodio 0.1N. La proteína, desprovista de azúcares, se empleó en nuevos experimentos de *panning*; se utilizaron como controles fetuína y BSA (fig.11).

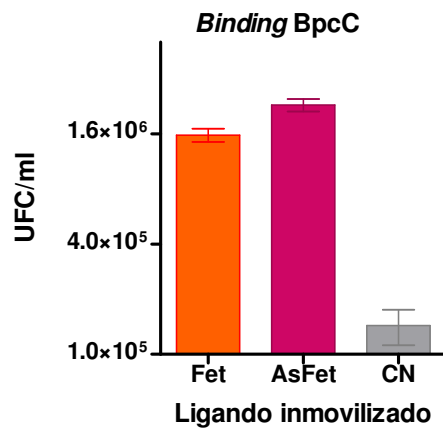


Fig.11: *panning* BpcC. Se determinó que los fagos que presentan en superficie a BpcC poseen capacidad de unión a la parte proteica de la fetuína y no a su parte glucosídica. Fet: fetuína; AsFet: asialofetuína; CN: control negativo con BSA.

Los recuentos probaron que los fagos son capaces de unirse tanto a la fetuína como a la asialofetuína (de hecho se obtuvieron valores levemente mayores en el *panning* con asialofetuína). Del mismo modo que antes, se vio que la unión al control negativo fue aproximadamente 1 orden y medio menor. Esto implicaría que los fagos interaccionan con la parte proteica de la fetuína y no con sus residuos de ácido siálico. Por este motivo, este candidato dejaría de ser una posible adhesina que media en la interacción de *B. suis* con las células del hospedador y, por ende, ya no sería relevante en este proyecto.

Bloqueo de la infección concentración-dependiente

Se decidió investigar si en el bloqueo de la infección con fagos se podía obtener una respuesta de tipo dosis-dependiente. En teoría, si los fagos estuviesen ocupando sitios indispensables para la interacción de la bacteria con la célula, a mayor concentración de fagos mayor sería el bloqueo. Para ello se realizaron infecciones similares a las descritas antes, empleando diluciones crecientes del *stock* de fagos en la co-infección de células con *B. suis*. Se utilizó en el estudio al fago que presenta en superficie una porción de BmaC, y como control negativo al fago *helper* R408. Se partió de una concentración inicial de 1×10^8 fagos/*well* considerada como "tal cual" (TC) y se realizaron diluciones seriadas al décimo hasta obtener una concentración de 1×10^4 fagos/*well*; cada dilución se utilizó para co-infectar 3 pocillos de células HeLa con *Brucella*. Como control de la infección se inocularon 6 pocillos sólo con bacterias (indicado en la fig.12 como "*B. suis*"), este control indica el número máximo de bacterias recuperadas luego de la infección en ausencia de fagos.

Inhibición de la infección concentración dependiente

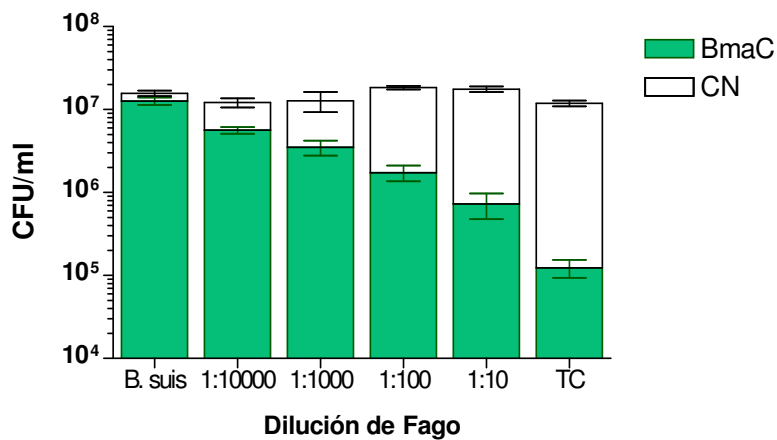


Fig.12: bloqueo dosis-dependiente de la infección de *Brucella* a células HeLa. Se emplearon concentraciones crecientes de fagos para bloquear la infección de *B. suis* a células HeLa. Se realizaron infecciones en paralelo, con un fago control (CN) y con un fago que expresa a BmaC en superficie (BmaC). La cantidad de bacterias recuperadas luego de la infección se expresa en UFC/ml.

Se observó que en las infecciones en las que se co-inocula *B. suis* junto al fago control no existe disminución del número de bacterias recuperadas en el recuento (nótese que todas las barras blancas de la fig.12 tienen aproximadamente la misma altura). En cambio, en las infecciones en las que se co-inocula la bacteria con el fago BmaC sí hay una disminución progresiva de los recuentos, a medida que aumenta la cantidad de fago agregada. Para la concentración de 1×10^8 fagos/*well* (TC) se observó nuevamente una disminución en el recuento de 2 órdenes de magnitud respecto de los pocillos sin fagos. Estos resultados fueron consistentes con lo obtenido previamente, e indican que el bloqueo de la infección es dosis-dependiente.

Los resultados de los últimos experimentos indican que los fagos que presentan en superficie una porción del autotransportador son capaces de interferir de algún modo en la adhesión/invasión de *B. suis* a las células. Se podría pensar que esta interferencia implica la unión de los fagos a proteínas sobre las células, haciendo inaccesibles estos sitios para las bacterias. Pero también podría ocurrir que los fagos interaccionen de algún modo con las bacterias, evitando que éstas se unan a las células. Para descartar alguna de estas opciones se realizaron algunos experimentos de microscopía, en los que se determinó por inmunofluorescencia cuales eran los pares de interacción en el bloqueo de la infección.

Inmunofluorescencia

Se realizaron infecciones de células HeLa con bacterias marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP) en presencia o ausencia del fago que expone BmaC para luego observarlos al microscopio de fluorescencia. Brevemente: se colocaron cubreobjetos circulares en el fondo de los pocillos de una placa *multiwell* sobre los que se sembraron las células HeLa. A las 24 hs. se infectaron las células HeLa con *B. suis* GFP⁺ (MOI 100:1), se co-inoculó el fago BmaC. Para la detección de los fagos se empleó un

anticuerpo comercial anti-M13 en ratón y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado al fluoróforo Cy3. Se emplearon como controles infecciones con la bacteria sola, pocillos de células sin infectar (que sirvieron como controles de pegado inespecífico de los anticuerpos en la inmunofluorescencia) y pocillos con células y fagos, ver esquema en fig.13. Se dejaron transcurrir de 1 a 4 horas. Luego se realizaron tres lavados y se fijó con paraformaldehído (PF). Se incubó con el anticuerpo primario y luego con el secundario, se lavó y se montó el preparado con Mowiol 4-88 20% (Polysciences, Inc.) como protector de la fluorescencia. Las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (BX-60 Olympus).

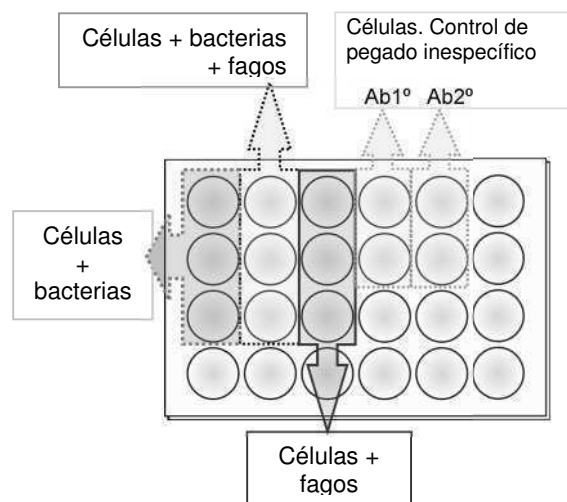


Fig.13: esquema de las infecciones para inmunofluorescencia. Todos los *wells* se recubrieron con células. En cada caso se indica como se realizó la infección. En los pocillos de control de pegado inespecífico se agregaron el anticuerpo primario y el secundario (para control del 1º) o sólo el secundario (para control del 2º) sobre las células.

La figura 14 muestra un resumen representativo de las imágenes obtenidas. En primer lugar se observó el control de infección a tiempos cortos (1 hr.), que llevaba células HeLa infectadas sólo con bacterias (marcadas verdes). Se pudo ver que a estos tiempos *B. suis* ya se encuentra adherida a las células (ver fig.14A), la posición de las bacterias se indica con flechas amarillas. A tiempos posteriores (4 hs.) se vio que una mayor cantidad de bacterias se encontraban adheridas a las células, o habían logrado invadir el interior celular (ver fig.14B). Se debe tener en cuenta que, empleando este tipo de microscopía, no es posible discernir si las bacterias estaban unidas a la superficie de las células o si se encontraban adentro de las mismas. El resto de los pocillos fueron incubados por 4 hs. antes de fijar con paraformaldehído. En la fig.14C se muestra el control de células y fagos; en estos pocillos se incubaron células a las que se les agregó la misma cantidad de fagos que se empleó en los otros *wells* para bloquear la infección. Se observó que los fagos (marcados en rojo) son capaces de unirse a la superficie celular; si bien toda la superficie de las células se vio tapizada, también se observaron pequeños grumos que se marcaron intensamente. Se muestran dos series de fotos tomadas con dos aumentos diferentes.

En la fig.14D se muestra el ensayo de bloqueo de la infección de *B. suis* con los fagos luego de 4 hs. Una vez más las células se vieron cubiertas por los fagos (en rojo). En estos preparados casi no se observaron bacterias (comparar con la figura 14B).

Fig.14: inmunofluorescencia. A: control de infección con *B. suis*. Se muestran células con bacterias adheridas luego de 1 hr. de infección.

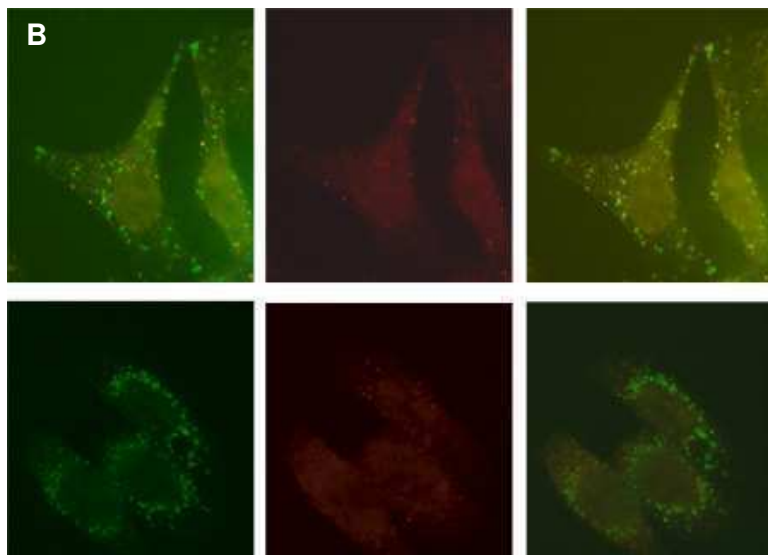
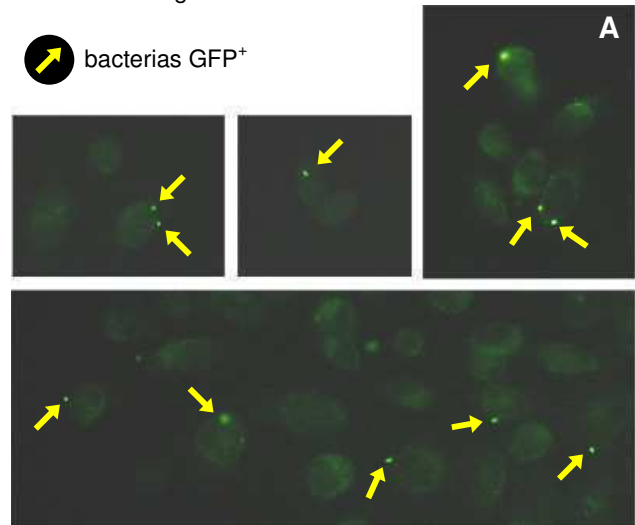


Fig.14B: se muestran células con bacterias adheridas luego de 4 hs. de infección. Se observa que las bacterias que logran ingresar tienden a ubicarse rodeando al núcleo. En todas las fotos el contorno celular se observa tenuemente por autofluorescencia de la célula.

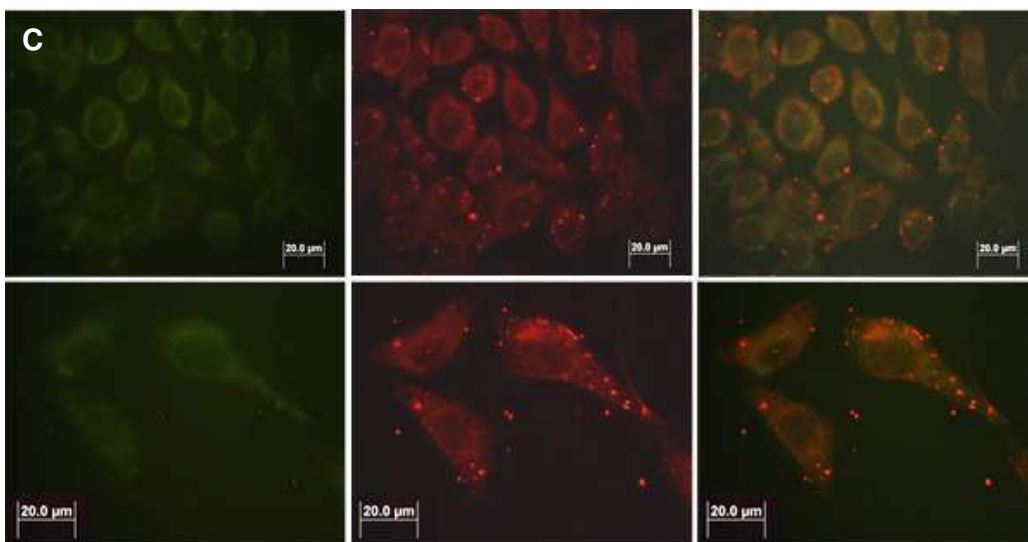


Fig.14C: control de células y fagos; éstos últimos (en rojo) son capaces de unirse a la superficie celular.

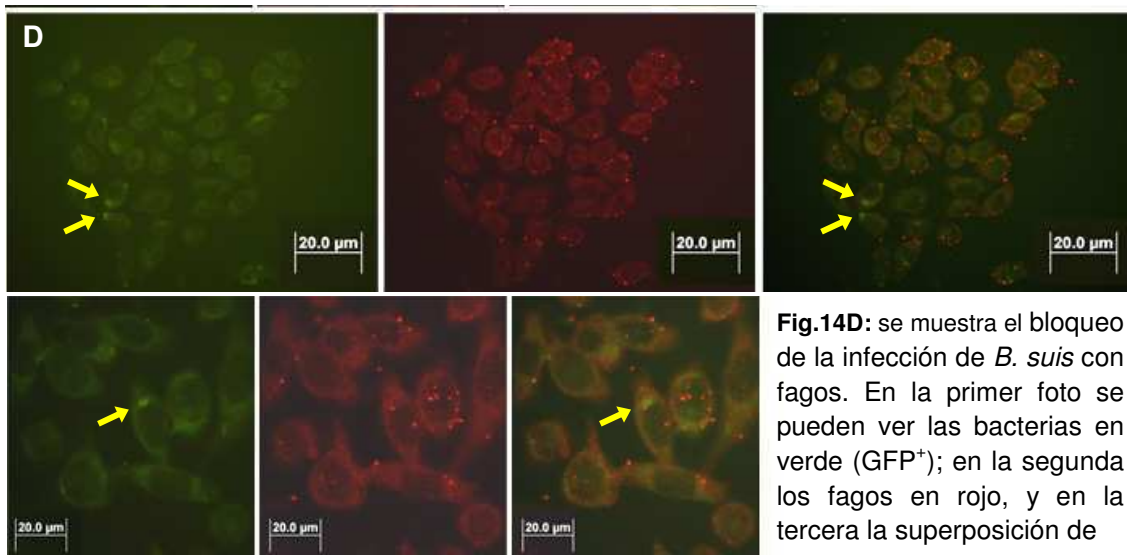


Fig.14D: se muestra el bloqueo de la infección de *B. suis* con fagos. En la primer foto se pueden ver las bacterias en verde (GFP⁺); en la segunda los fagos en rojo, y en la tercera la superposición de ambas. Las células se vieron cubiertas por los fagos y prácticamente no quedan bacterias. La posición de las pocas bacterias remanentes se indica con flechas amarillas.

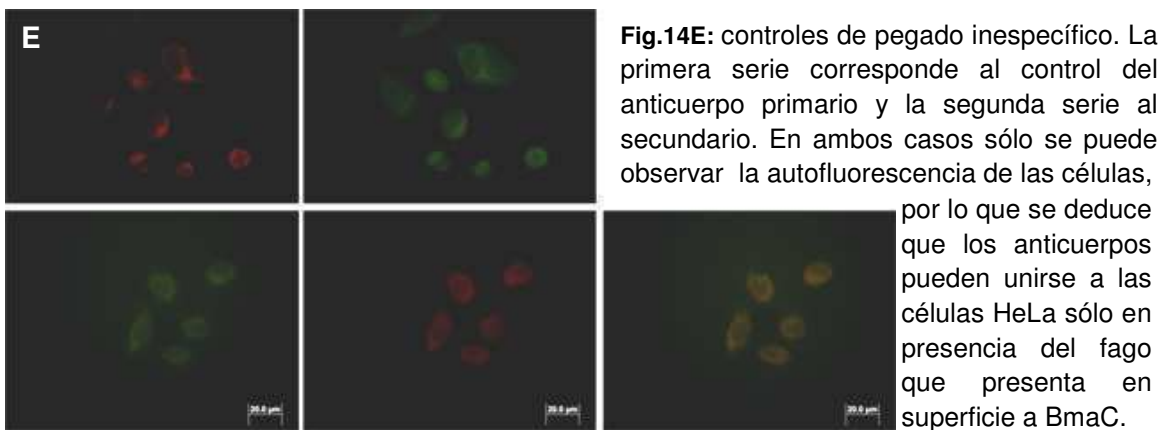


Fig.14E: controles de pegado inespecífico. La primera serie corresponde al anticuerpo primario y la segunda serie al secundario. En ambos casos sólo se puede observar la autofluorescencia de las células, por lo que se deduce que los anticuerpos pueden unirse a las células HeLa sólo en presencia del fago que presenta en superficie a BmaC.

Este resultado indica que es posible que los fagos hayan desplazado a las bacterias, impidiendo su adhesión a las células, y que luego éstas hayan sido eliminadas por los lavados. Se muestran dos series de fotos tomadas con aumentos diferentes, la posición de las pocas bacterias remanentes se indica con flechas amarillas.

En la figura 14E se muestran los controles de pegado inespecífico realizados. La primera serie de fotos corresponde al anticuerpo primario y la segunda al secundario. Se pudo constatar que ninguno de los dos anticuerpos se une por sí mismo a las células; en efecto, en la microscopía sólo se observaron contornos celulares tenues debido a la autofluorescencia de las células. Como último control se corroboró que los fagos sin fusiones (fago *helper*) no son capaces de unirse a las células (no mostrado); lo cual explicaría su falta total de inhibición de la infección mostrada en las figs 10 y 12.

Como se mencionó antes, los fagos BmaC presentaron un patrón de adhesión a las células en el que la superficie de las células se vio cubierta por ellos, pero también se observaron pequeños grumos. En teoría estos fagos poseen una capacidad de unión específica a fibronectina, por lo que su patrón de

adhesión debería ser similar al de unión de un anticuerpo comercial anti-fibronectina. La fibronectina es una glicoproteína presente en forma dimérica o multimérica en la superficie de las células y en la matriz extracelular, por lo que su detección debería ser sencilla. Entre los anticuerpos contra fibronectina disponibles, se encontró que el anticuerpo policlonal producido por Abcam utilizando fibronectina humana como antígeno, presenta poca reactividad cruzada con colágenos, lamininas y otras proteínas de la matriz extracelular; además, el fabricante lo recomienda para inmunocitoquímica e inmunofluorescencia (www.abcam.co.jp/Fibronectin-antibody-ab299.html). En la figura 15 se puede ver el resultado de una inmunofluorescencia realizada con este anticuerpo. Se puede observar que hay un “puntillado” similar al que se obtiene cuando los fagos cubren la célula. También se observan algunos grumos, aunque más pequeños que los visibles en el experimento con los fagos-BmaC. En síntesis, parece factible que los fagos-BmaC se unan a la célula a través de las moléculas de fibronectina y, de esta forma, bloqueen el acceso de *Brucella* a sus sitios de adhesión.

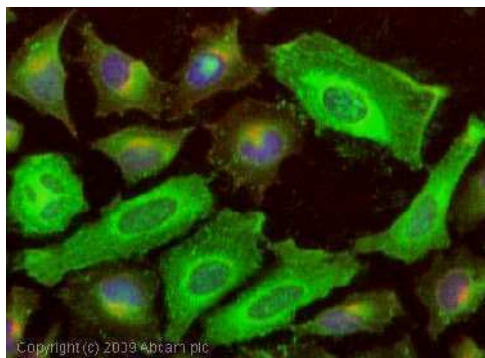


Fig.15: ICC/inmunofluorescencia anti-fibronectina. Células HeLa fijadas con PF. Se empleó un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (verde). Para marcar las membranas plasmáticas se empleó Alexa Fluor 594 WGA (rojo). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI.

Tomado de Abcam plc. Fibronectin antibody (ab299).

En conjunto estos resultados indican que la estrategia de *phage display* fue útil para identificar moléculas de adhesión de *Brucella suis*. Se sabe que, de todas las proteínas que componen la matriz extracelular, *Brucella* “prefiere” unirse a la fibronectina⁶⁹. Tres de los candidatos identificados (BpcA, BpcB y BmaC) mostraron ser proteínas de *binding* específico a fibronectina; estos tres candidatos, además, probaron estar involucrados en la interacción de *B. suis* con la célula eucarionte a ser infectada. Debido a estos motivos es que su rol fisiológico como moléculas de adhesión es altamente probable. Entre ellos, el candidato más relevante fue BmaC. En la próxima sección se describe el trabajo realizado en la caracterización de la mutante por delección del gen *bmaC* de *Brucella suis*.

Obtención de la mutante *bmaC* en *B. suis*

El gen *bmaC* de *B. suis* codifica una proteína de 338 KDa, perteneciente a la familia de autotransportadores de tipo I, también comúnmente conocidos como sistemas de secreción de tipo V (SSTV). En estos sistemas, en general, la proteína es transportada a través de la membrana interna por el sistema *Sec* que reconoce un péptido señal distintivo de alrededor de 27 aminoácidos en el N-terminal. Luego ella misma media su propio transporte a través de la membrana externa: el extremo

carboxi-terminal de la proteína se inserta en la membrana externa formando un barril β , compuesto por 14 láminas β ubicadas en sentido antiparalelo (dominio autotransportador), y el dominio pasajero atraviesa la membrana. El dominio pasajero (que en general porta la actividad biológica) puede permanecer asociado a la membrana externa o ser liberado al medio extracelular por autoproteólisis¹⁵⁵. Algunos miembros de esta familia han sido propuestos como importantes factores de virulencia en bacterias Gram negativas¹³⁸, y algunos de ellos resultaron funcionar como adhesinas.^{152, 153} BmaC de *B. suis* posee los extremos N y C-terminal característicos de este tipo de proteínas. Además, en su dominio pasajero se encuentran dominios comúnmente asociados a la adhesión, como por ejemplo un dominio pertactina y otro de hemaglutinina filamentosa. En la figura 16 se muestran esquemáticamente estos dominios y su organización; se tuvieron en cuenta las predicciones realizadas por las aplicaciones *online* de TIGR, Pfam y NCBI para la búsqueda de dominios.

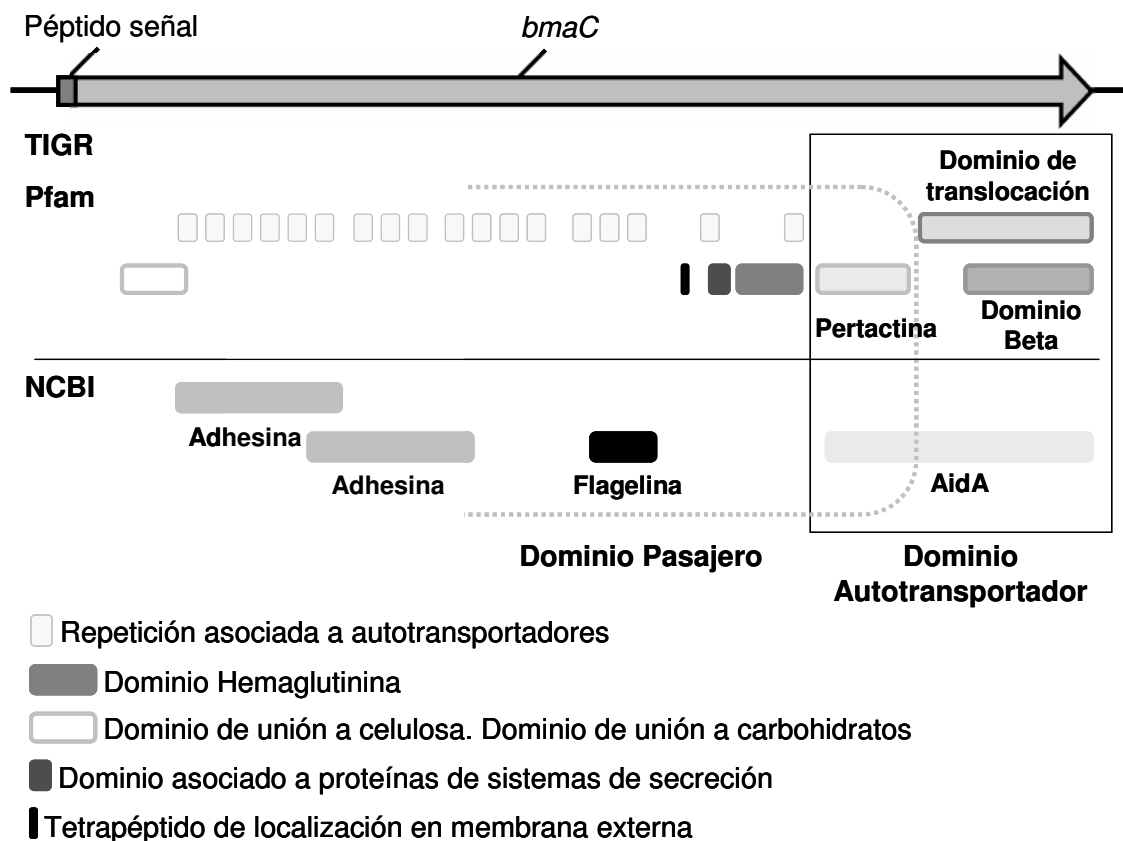


Fig.16: búsqueda bioinformática de dominios en BmaC. Se muestran los dominios predichos por distintas aplicaciones. En general todos los dominios encontrados son característicos de las adhesinas.

Se decidió obtener una mutante en el gen *bmaC* para confirmar el rol de la proteína BmaC como adhesina. Se generó una construcción en el vector pK18mobsacB que permite obtener mutantes por delección por doble recombinación homóloga al cromosoma. Brevemente: se amplificaron las zonas adyacentes al gen con oligonucleótidos específicos; estas zonas se clonaron en el vector pGEMTeasy y luego se subclonaron en el vector suicida pK18mobsacB (Kan^R) (ver fig.17A). El plásmido suicida fue electroporado en células competentes y se seleccionaron clones kanamicina resistentes, sacarosa

sensibles (estos clones corresponden a una cepa simple recombinante). Uno de estos clones fue cultivado en medio líquido por 16 horas; luego se plaqueó una dilución del cultivo para obtener colonias aisladas. Se seleccionaron clones sacarosa resistentes, kanamicina sensibles (dobles recombinantes). Las posibles mutantes fueron controladas por PCR con oligonucleótidos específicos para discernir si el *cassette* de recombinación se hallaba en el sitio correcto (Fig.17B). Además, se empleó una RT-PCR para detectar la presencia/ausencia del ARN mensajero correspondiente. Se realizaron extracciones de ARN de las cepas silvestre y mutante, cultivadas en medio TSB o en un medio condicionado de células HeLa; este medio es idéntico al que enfrenta la bacteria en el momento de la infección a células epiteliales en cultivo, por lo que permite corroborar la expresión del gen en esta situación. Se obtuvo el ADNc, que se utilizó como molde en la reacción de PCR posterior. Se empleó como control un gen *housekeeping*, de expresión constitutiva (IF) (ver fig.17C).

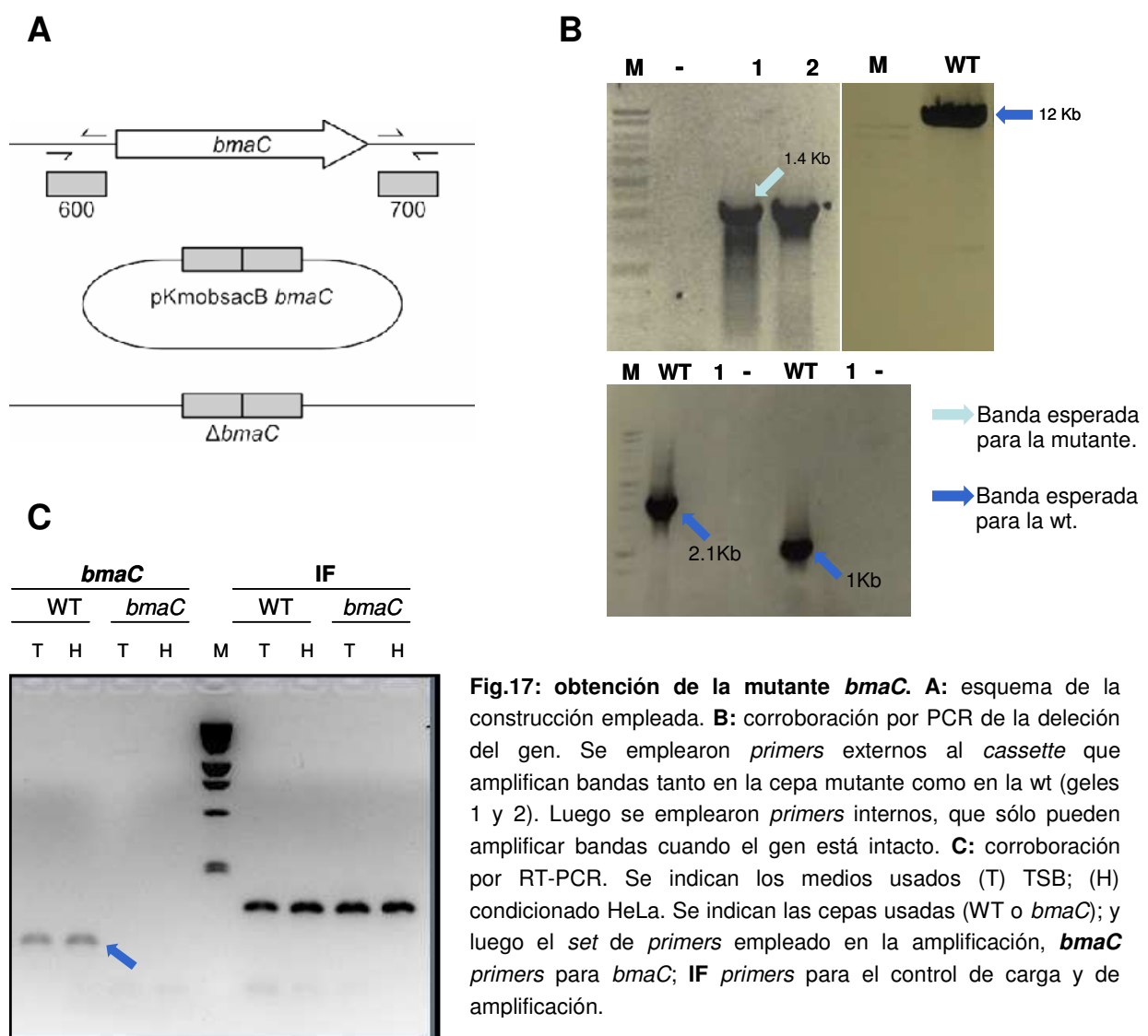


Fig.17: obtención de la mutante *bmaC*. **A:** esquema de la construcción empleada. **B:** corroboración por PCR de la delección del gen. Se emplearon *primers* externos al *cassette* que amplifican bandas tanto en la cepa mutante como en la wt (geles 1 y 2). Luego se emplearon *primers* internos, que sólo pueden amplificar bandas cuando el gen está intacto. **C:** corroboración por RT-PCR. Se indican los medios usados (T) TSB; (H) condicionado HeLa. Se indican las cepas usadas (WT o *bmaC*); y luego el *set* de *primers* empleado en la amplificación, *bmaC primers* para *bmaC*; **IF primers** para el control de carga y de amplificación.

Se pudo determinar por PCR la presencia del *cassette* de recombinación en el sitio correcto. En todos los casos, en la cepa mutante están ausentes las bandas correspondientes al gen silvestre, o a la construcción simple-recombinante. Luego, por RT-PCR, se obtuvieron los perfiles de expresión del gen *bmaC*. En la cepa silvestre (WT) se pudo ver que este gen se expresa tanto *in vitro* (en medio TSB) como en medio condicionado. También se constató que en la cepa mutante no hay expresión del transcripto. En las calles del control se pudo observar que tanto la extracción como las reacciones de amplificación dan productos similares para todas las condiciones. Contando con estos resultados se decidió empezar con la caracterización de la mutante.

Control de la mutante: test de disociación

Los cultivos *in vitro* de *B. suis* pueden sufrir variaciones en su morfología (de lisas a rugosas) que se acompañan por alteraciones de superficie que pueden modificar su estructura antigénica, su susceptibilidad a fagos y su virulencia; este proceso se llama disociación. Las cepas categorizadas como lisas tienen antígeno O en su LPS; en cambio, las cepas rugosas no lo poseen. Las distintas especies de *Brucella* pueden clasificarse en base a esta característica en rugosas o lisas. En general, las especies lisas son más virulentas que sus contrapartes rugosas. *B. canis* y *B. ovis* son las únicas especies de *Brucella* que son naturalmente rugosas y sin embargo siguen siendo patogénicas para su especie hospedadora. La cepa silvestre de *B. suis* es lisa; al pasar por un proceso de disociación se torna más mucosa y puede transformarse en rugosa o alcanzar un fenotipo intermedio²¹². Si la mutante *bmaC* hubiese sufrido un proceso de disociación, sus propiedades de adherencia/invasión podrían haberse visto afectadas, por lo que se realizó como primer medida un control para ver que esto no hubiera sucedido. En caso de haber ocurrido disociación, cualquier fenotipo diferencial entre la mutante y la cepa silvestre podría deberse no a la mutación sino a este proceso⁴³.

Existen varios métodos para detectar disociación, entre ellos se encuentra el de aglutinación en acriflavina, que fue en este caso el test elegido. Al evaluar una cepa lisa se espera que ésta se emulsione fácilmente, cosa que no ocurre al evaluar una rugosa. A modo de control, además de evaluar el fenotipo de la mutante, se incluyeron las cepas silvestres de *B. suis* y *B. ovis*. Como se puede ver en la fig.18 tanto la cepa silvestre de *B. suis* como la mutante emulsionaron fácilmente produciendo una suspensión homogénea. En cambio al tratar de emulsionar *B. ovis* se observó la formación de una estructura filamentosa que luego se disgregó en grumos; esta cepa nunca llegó a emulsionar. Con el correr de los minutos se vio que los grumos del test de *B. ovis* precipitaron dejando la solución de acriflavina translúcida.

Cambio de Fase

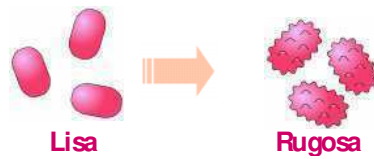


Fig.18: test de disociación. Se determinó que la mutante *bmaC* es lisa. Se emplearon como controles las cepas silvestres de *B. suis* (lisa) y de *B. ovis* (rugosa).

El resultado del test indicó que la mutante *bmaC* no sufrió disociación, por lo que fue posible comenzar a estudiar diversos fenotipos asociados a fenómenos de superficie.

Dot blot anti-BmaC

Se decidió confirmar la ausencia de la proteína BmaC en la superficie de la cepa mutante. Para ello se generó un suero policlonal capaz de reaccionar frente a esta proteína. Entonces, las proteínas del fago que presenta en superficie a BmaC se emplearon como antígeno para inocular ratones C57, esperando de esta forma obtener antisueros policlonales anti-BmaC. Luego de 5 semanas los sueros fueron extraídos y titulados por ELISA (ver fig.19). El suero número 4, que presentó un mayor título, fue utilizado para corroborar la ausencia del autotransportador en la superficie de la mutante *bmaC* por *dot blot* (ver fig.20).

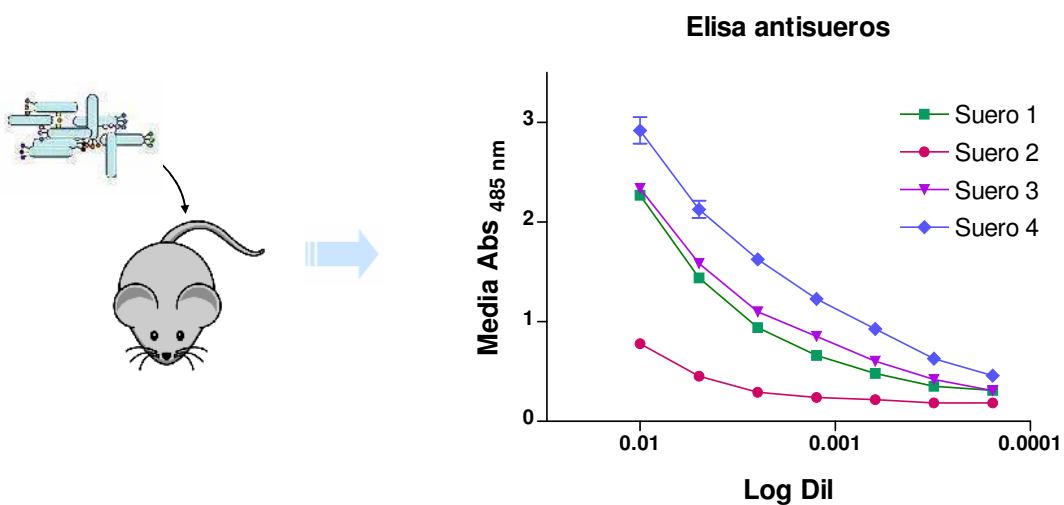
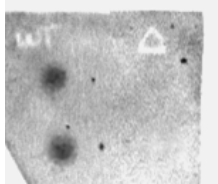


Fig.19: obtención de antisueros contra BmaC. Se inocularon ratones C57 con el antígeno. Luego de cinco semanas se sangró a blanco para obtener los sueros, que fueron titulados a punto final por ELISA. El suero 4 es el que presenta mayor título, 1 y 3 tienen títulos intermedios, mientras que para 2 casi no hay señal.

Fig.20: Dot blot anti-BmaC.

Se sembraron sobre una membrana de nitrocelulosa membranas de las cepas mutante y silvestre para detectar la presencia BmaC en la superficie de las células. Sólo se obtuvo señal positiva en la cepa silvestre.

B. suis* *bmaC

Preparaciones de membranas obtenidas a partir de las cepas silvestre y mutante se sembraron sobre una membrana de nitrocelulosa. Se incubaron por 30 min. para permitir que las proteínas se inmovilicen en la membrana. La membrana fue sometida a un *dot blot*; se emplearon el antisuero 4 y un anticuerpo comercial anti-ratón conjugado a HRP en la detección. Para revelar se utilizó el sistema ECL-Plus. Mientras que la

proteína BmaC se detectó claramente en las membranas de la cepa silvestre, en la cepa mutante no se obtuvo señal.

Con estos experimentos se corroboró que la proteína BmaC está presente en la superficie de *B. suis*. Además, se constató que tanto el gen, como el mensajero y como la proteína se hallan ausentes en la mutante *bmaC*.

Formación de Biofilms en *B. suis*

La formación de biofilms es un proceso complejo, en donde se ven implicados el establecimiento de interacciones con el soporte, así como también bacteria-bacteria. Dado que este gen codifica una proteína de superficie que aparentemente está involucrada en fenómenos de adhesión, resulta interesante estudiar la capacidad formadora de biofilms en la mutante, y compararla con la de la cepa silvestre (Fig.21). Como no existían antecedentes bibliográficos que informasen (ni descartasen) que *Brucella* fuese capaz de formar estos biofilms, primero se estudió si la cepa silvestre de *B. suis* era capaz de adherirse y formar biomasa sobre un soporte abiótico como el poliestireno. Se realizaron ensayos de adhesión en placas de pocillos múltiples que fueron teñidas con cristal violeta. Se midieron distintos tiempos, empleando distintos medios de cultivo.

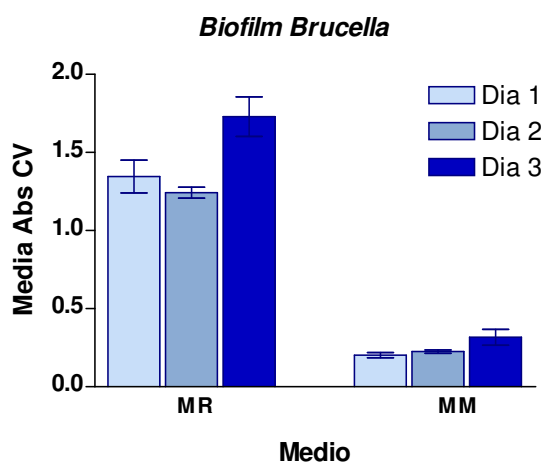


Fig. 21: se determinó la capacidad de formar biofilms en la cepa silvestre de *B. suis* M1330. Se midió la adhesión por tinción con cristal violeta durante tres días consecutivos. Se emplearon dos medios de cultivo distintos: medio rico TSB (MR), y medio mínimo GH modificado (MM).

Como se ve en la figura 21, *Brucella suis* es capaz de adherirse a las placas cuando se la cultiva en medio rico, llegándose ya a una adhesión máxima a las 24 hs. de cultivo. En cambio, en medio mínimo no se observa biomasa considerable pegada a la placa a ningún tiempo (consideramos que hay pegado a la placa si la absorbancia media medida supera el valor de 0.3). Habiéndose establecido esto, se comparó a esta cepa con la mutante *bmaC*, en cultivo en medio TSB. Se midieron dos tiempos distintos: 30 hs, momento en el que ya se alcanzó el máximo de biomasa pegada a la placa; y 16 hs, momento en el que se espera una adhesión intermedia (Fig.22).

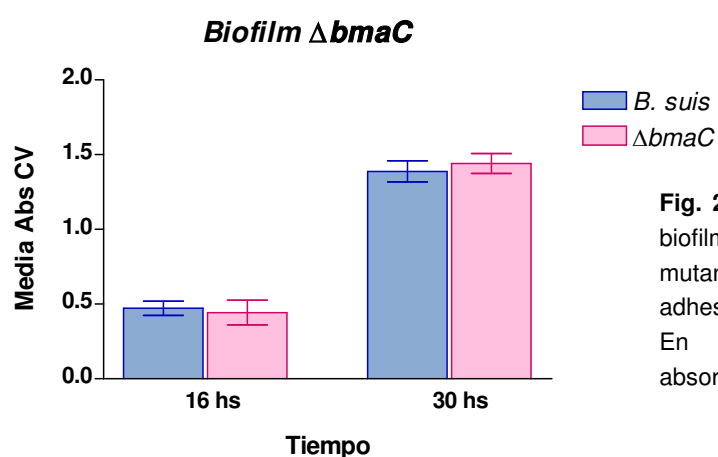


Fig. 22: se comparó la capacidad de formar biofilms en la cepa silvestre de *B. suis* y la mutante por delección *bmaC*. Se midió la adhesión por cristal violeta en dos tiempos. En ambos se obtuvieron valores de absorbancia similares.

En ambos tiempos se obtuvieron valores de absorbancia similares, indicando que la formación de un biofilm adherido al poliestireno es comparable en las dos cepas. Esto indicaría que la proteína BmaC no participa en la unión al soporte abiótico; e incluso sugiere que la adhesión bacteria-bacteria tampoco estaría mediada por BmaC *in vitro*.

Resistencia a suero

Muchos patógenos están equipados con factores que les proveen resistencia contra la acción bactericida del complemento. *Brucella*, como otros patógenos, puede evadir al sistema inmune y resistir al ataque del complemento; de hecho, se sabe que los aislamientos lisos de *Brucella* son resistentes al suero²¹³. Diferentes microorganismos patogénicos han demostrado ser capaces de unirse a reguladores del complemento de sus hospedadores, como el factor H (FH) o C4bp (C4 *binding protein*), para explotar sus propiedades protectoras y prevenir la activación del complemento sobre las superficies microbianas²¹⁴⁻²¹⁷. En algunos casos, las proteínas que reclutan a los reguladores del complemento y los mantienen unidos sobre la bacteria son autotransportadores que actúan como adhesinas. Un ejemplo reciente de este tipo de accionar es el autotransportador YadA de *Yersinia enterocolitica*²¹⁸. Dado que BmaC posee muchos posibles dominios de *binding* aún no completamente caracterizados, se decidió estudiar si este autotransportador de *B. suis* podría estar involucrado en un proceso de este tipo. Para

ello se realizó un ensayo de resistencia a suero, en el que se analizaron la cepa silvestre de *B. suis* y la mutante. Las dos cepas se incubaron en presencia de suero a diferentes concentraciones por 10 y 60 minutos, luego se hizo un recuento de la cantidad de bacterias viables recuperadas. Como puede verse en la fig.23, no se observaron diferencias en la resistencia a suero entre las cepas.

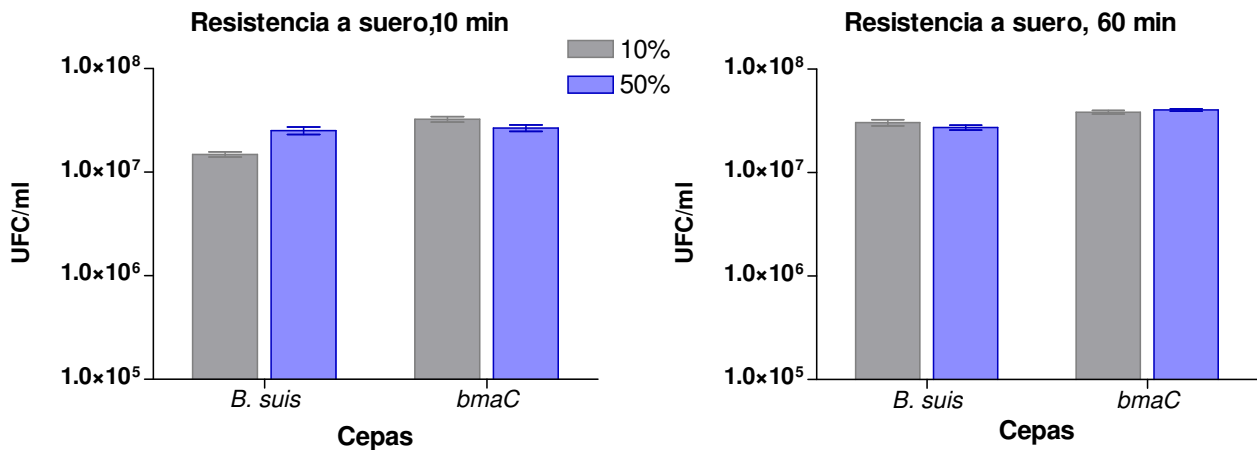


Fig. 23: ensayo de resistencia a suero. Se evaluó la resistencia a suero en las cepas silvestre y mutante; se emplearon dos concentraciones distintas de suero y se hicieron recuentos a dos tiempos distintos. Se observó que ambas cepas son resistentes a la acción bactericida del suero en igual medida.

Como las dos cepas son resistentes a la acción bactericida del suero en igual medida, se puede garantizar que BmaC no está reclutando a reguladores del complemento para modificar su acción.

Hasta este momento todos los fenotipos estudiados en la mutante resultaron ser iguales a los de la cepa silvestre. En la próxima sección se describen las propiedades de adherencia de la mutante en comparación con las de la cepa silvestre y su virulencia en hospedadores modelo.

Propiedades de adhesión/invasión a células epiteliales

La adhesión a células es probablemente el fenotipo más relevante que se puede estudiar en esta mutante, como una primera aproximación al rol *in vivo* de BmaC. En el primer experimento se evaluó la capacidad de las bacterias para adherirse y luego invadir la célula, utilizando la línea modelo HeLa. La mutante *bmaC* presentó una marcada reducción (aproximadamente 1,5 órdenes de magnitud respecto de la cepa silvestre) en su capacidad de adherirse/invadir células epiteliales HeLa (ver fig.24). Todos los experimentos de esta sección fueron repetidos por triplicado.

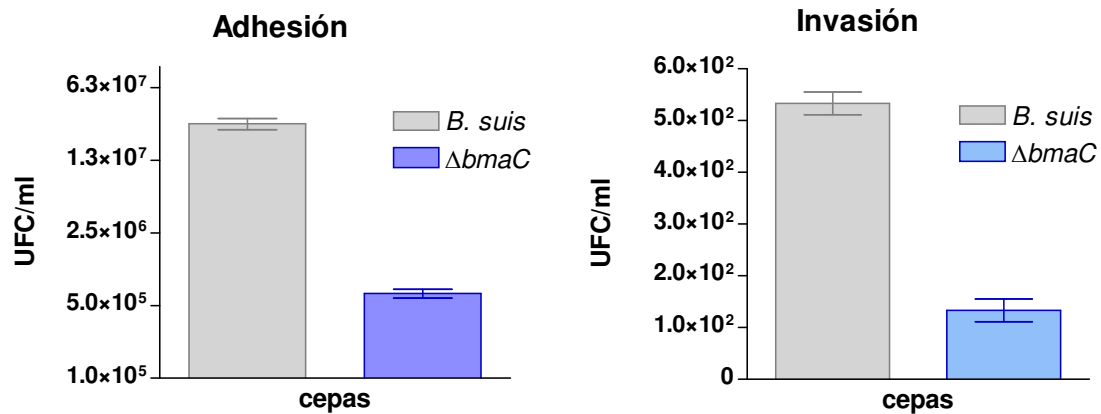


Fig. 24: propiedades de adhesión/invasión a células HeLa. Se compararon las cepas mutante y silvestre en su capacidad de adherirse e invadir células eucariotas. En ambos procesos la cepa mutante mostró una marcada reducción respecto de la cepa silvestre.

En el segundo experimento se vuelve a evaluar la capacidad de adhesión/invasión de las bacterias, esta vez realizando una co-infección de la cepa silvestre y la mutante (ver fig.25). Al inocular las dos cepas juntas, se espera que éstas compitan por los sitios de unión a la célula, y que por lo tanto, las diferencias observadas se incrementen. Se hicieron infecciones con cada cepa por separado para emplear como controles, en ellas se obtuvieron resultados prácticamente idénticos a los anteriores (comparar fig.25 con fig.24). En la co-infección se observó que la diferencia entre las cepas se incrementa aún más, especialmente en la invasión, en la que no se recuperaron colonias de la cepa mutante.

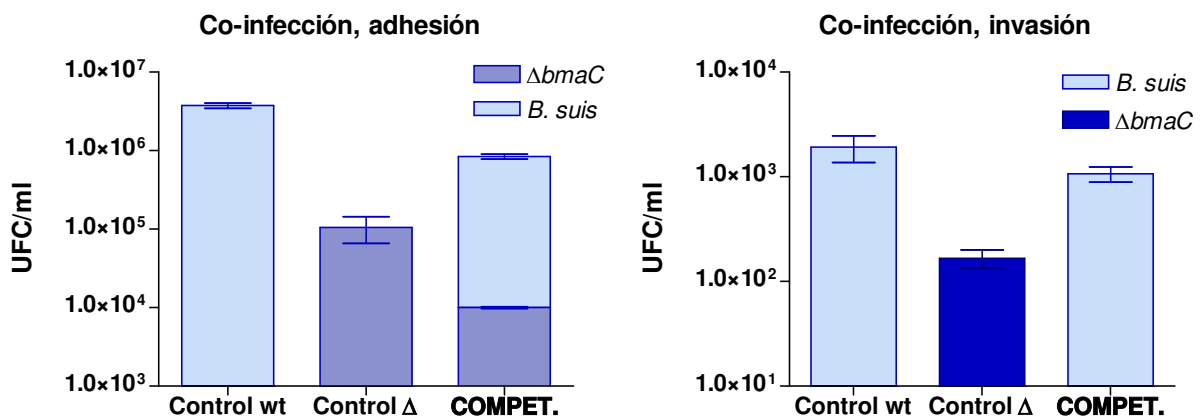


Fig. 25: competencia en la adhesión/invasión a células HeLa. En la competencia 2.5×10^7 UFC/ml de cada cepa fueron inoculadas juntas al mismo tiempo sobre las células. Luego se realizaron recuentos con las bacterias recuperadas de la infección. Se emplearon como controles infecciones con cada cepa por separado.

Replicación intracelular

Se estudiaron los efectos de la mutación sobre la persistencia en el medio intracelular en un modelo celular de fagocitos profesionales. Se utilizó la línea de macrófagos J774 como modelo. En este experimento no se observaron diferencias en la replicación intracelular entre las cepas silvestre y mutante (fig.26). La mutación en *bmaC* no afecta la supervivencia intracelular de la bacteria en esta línea; es decir, que las bacterias que logran ingresar a la célula luego pueden replicar de forma normal. Se debe tener en cuenta que la adhesión muy probablemente no juegue un rol preponderante en el ingreso de la bacteria a este tipo de células.

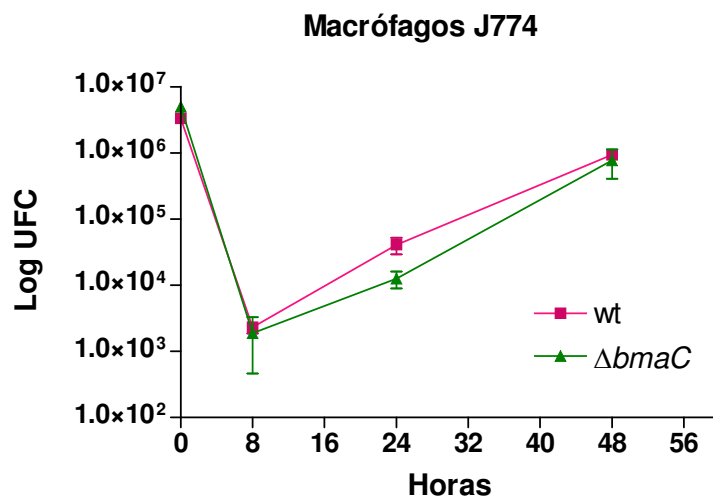


Fig. 26: replicación intracelular. Se inocularon fagocitos profesionales con la cepa silvestre y la mutante. Se hicieron recuentos a varios tiempos p.i. No se observaron diferencias en la replicación intracelular entre las cepas estudiadas. Es decir, que BmaC no es crucial para la supervivencia intracelular de la bacteria en esta línea celular.

En la primer parte de este capítulo se describieron los experimentos que llevaron a la identificación por *phage display* de tres posibles adhesinas de *B. suis*. Uno de estos candidatos fue la proteína que hemos denominado BmaC. En conjunto, los resultados descritos en este capítulo demuestran que esta proteína de *B. suis* participa en la interacción de la bacteria con la célula hospedadora, y sugieren que BmaC sería necesaria para la infección de los tejidos epiteliales.

Capítulo III: adhesión, mutación de genes blanco

Una forma de estudiar los mecanismos de adhesión de un patógeno es hacer un análisis mutacional de genes blanco que puedan ser identificados en su genoma. En el capítulo anterior demostramos que una proteína de la familia de los autotransportadores tipo I participaría en la adhesión a las células hospedadoras (epiteliales), probablemente a través de la unión a moléculas de fibronectina. Resulta promisorio entonces tratar de dilucidar cual es el rol que otros miembros de la familia de los autotransportadores pueden tener en la colonización del hospedador. En el genoma de *B. suis* identificamos seis posibles autotransportadores (sistemas de secreción tipo V, tres pertenecientes a los denominados de tipo I, y los tres restantes a los de tipo II). En este capítulo de la tesis incluimos el análisis de los dos autotransportadores de tipo I restantes identificados: BRA0173 y BR2013, a los que hemos denominado BmaA y B respectivamente. Las construcciones para obtener mutantes en estos genes fueron generadas, y las mutantes fueron obtenidas por doble recombinación al cromosoma. En las cepas obtenidas se estudiaron ciertas propiedades de superficie que se sabe pueden modificar la adherencia; su capacidad de formar biofilms; sus propiedades de autoagregación/floculación; etc. Se analizaron las mutantes en cuanto a su interacción con diferentes líneas celulares modelo, estudiando su capacidad de adhesión, invasión y persistencia en distintos cultivos celulares, se emplearon macrófagos J774 y células epiteliales HeLa como modelos validados para *Brucella* spp. También se utilizaron modelos celulares no clásicos como A549 (línea alveolar) y una línea de osteoblastos. Se eligieron estas líneas celulares porque corresponden a tejidos normalmente infectados por *Brucella*. El objetivo de estos experimentos fue dilucidar si existe una adhesión diferencial tejido dependiente.

Como estrategia complementaria para estudiar la interacción entre *Brucella* y la célula hospedadora se realizaron experimentos de expresión heteróloga, en los que una de las posibles adhesinas (BmaA) de *B. suis* fue expresada en una cepa de *E. coli* derivada de K12, no invasiva ni adherente (CC118). Luego, se analizó la capacidad adquirida por esta cepa para adherirse/invasión células HeLa en cultivo. Los resultados por recuento indican que BmaA incrementa 4 veces la adhesión y 8 veces la invasión de *E. coli* no adherente a células HeLa. Estas observaciones apoyan la hipótesis que esta proteína podría cumplir alguna función de adhesina/invasina a células epiteliales.

Búsqueda de posibles adhesinas: Autotransportadores de tipo I

En bacterias patógenas, la adhesión específica a los tejidos del hospedador es un factor esencial en el establecimiento exitoso de la infección. En general, proteínas microbianas denominadas adhesinas median en la interacción entre las células del hospedador y las bacterias. Éstas últimas emplean desde adhesinas/invasinas monoméricas hasta complejos macromoleculares sofisticados, como los sistemas de secreción de tipo III, para establecer intrincadas conversaciones moleculares con el hospedador, que tienen como fin asegurar su invasión y colonización. Debido a esto, es esperable que en el genoma de todo microorganismo patogénico se hallen presentes genes que codifiquen factores de virulencia como adhesinas, invasinas, intiminas, hemaglutininas, etc.

En bases de datos especializadas se pueden encontrar más de 60 dominios proteicos distintos asociados a la adhesión²¹⁹, que han sido descritos como importantes factores de virulencia para patógenos como *Yersinia* spp., *Bordetella* spp., *Pseudomonas* spp. y *E. coli*, etc. Con el objetivo de identificar todos los posibles factores de adhesión de *Brucella suis* realizamos una búsqueda de proteínas pertenecientes a todas estas familias en la secuencia publicada del genoma de *B. suis*⁴³. La presencia de tantos y tan diversos dominios dificultó un poco la identificación inequívoca de adhesinas en el genoma de *B. suis*. Sin embargo, en este primer análisis se identificaron 17 posibles candidatos. Luego de curar manualmente la búsqueda, se obtuvieron 11 proteínas de *B. suis* que contenían uno o varios dominios asociados a la adhesión. Con estas proteínas, en principio no relacionadas, se construyó un árbol filogenético con el fin de estimar su función a partir de sus posibles relaciones evolutivas. Se emplearon como herramientas bioinformáticas ClustalX²⁰⁷, para los alineamientos múltiples de las secuencias, y Paup 4.0b10²⁰⁸ para la construcción de los árboles y su posterior análisis estadístico. El árbol obtenido se muestra en la figura 1. En este caso vemos que en el árbol las proteínas se agruparon de acuerdo a su posible función específica, quedando definidos cuatro grupos: en el primero de ellos se ubican las proteínas pertenecientes a la familia de autotransportadores de tipo I; estas tres proteínas poseen los extremos N y C-terminal característicos de la familia. Si bien es cierto que no siempre los autotransportadores son moléculas de adhesión, en este caso cada uno de estos candidatos poseen dominios relacionados a la adhesión en sus dominios pasajeros, definiéndolas como probables adhesinas (ver figuras 2 y 3). En el segundo grupo se ubican otras tres proteínas, dos de ellas (BR1846 y BR0072) pertenecen claramente a la familia de autotransportadores de tipo II, también conocidos como autotransportadores triméricos. La tercera (BR0049) no posee todos los dominios típicos de estos transportadores. Todas las proteínas caracterizadas de esta familia resultaron funcionar como adhesinas en la relación patógeno-hospedador²²⁰. En el tercer grupo se ubican otras tres proteínas cuya relación es menos clara; todas ellas poseen un único dominio asociado a la adhesión (hemaglutinina, intimina o adhesina). Por último, en el cuarto grupo se ubican dos proteínas con dominios de invasina, homólogos a los dominios descritos por primera vez en *Yersinia* spp²²¹. Estos dominios posibilitan la unión de los patógenos a integrinas celulares²²¹.

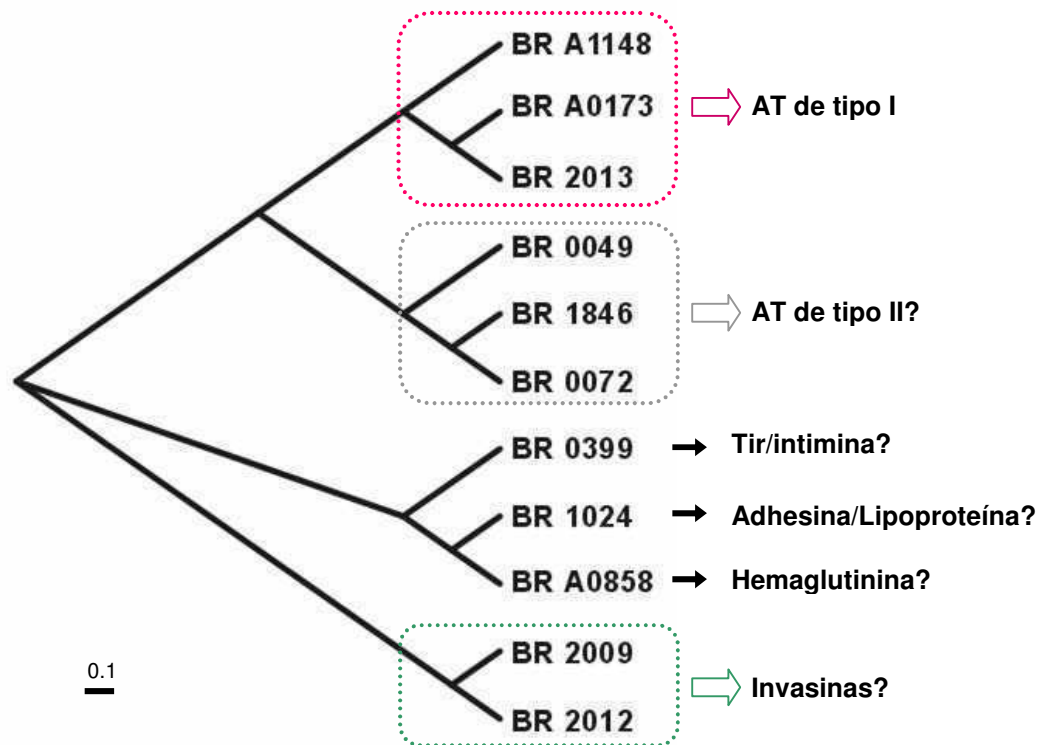


Fig.1: árbol filogenético de posibles adhesinas de *B. suis*. Análisis evolutivo de las posibles adhesinas de *B. suis*. Se utilizó la base de datos de CMR-TIGR para obtener las secuencias y los programas ClustalW y PAUP para el análisis filogenético. En la figura se indican las posibles funciones de cada grupo.

Estas observaciones indican que cualquiera de estas proteínas podría ser objeto de análisis en estudios de adhesión, no pudiendo descartarse de plano ninguna de ellas. El hecho de que *B. suis* posea múltiples posibles adhesinas podría sugerir que existen mecanismos de unión al hospedador redundantes o que cierta versatilidad es necesaria a la hora de interactuar con diferentes tejidos del hospedador. También se podría suponer que los procesos de adhesión/invasión están finamente regulados, con varios factores actuando simultánea o secuencialmente. Se decidió comenzar el análisis de los miembros del primer grupo, los autotransportadores de tipo I (AT tipo I), a los que hemos denominado BmaA, B y C (por *Brucella monomeric autotransporter*). Como se describió en el capítulo anterior, BmaC fue identificado como una posible molécula de adhesión en ensayos de *panning* contra fibronectina. En las siguientes secciones se describen los experimentos realizados para caracterizar a las mutantes de *B. suis* obtenidas por inserción de *cassettes* de resistencia en los genes *bmaA* y *B*.

Obtención de las mutantes *bmaA* y *bmaB* en *B. suis*

El gen *bmaA* de *B. suis* codifica una proteína de 1113 aminoácidos. En la figura 2 se muestran esquemáticamente los dominios presentes en esta proteína, y su organización; para su identificación se tuvieron en cuenta las predicciones realizadas por las aplicaciones *online* de TIGR, Pfam y NCBI para la búsqueda de dominios.

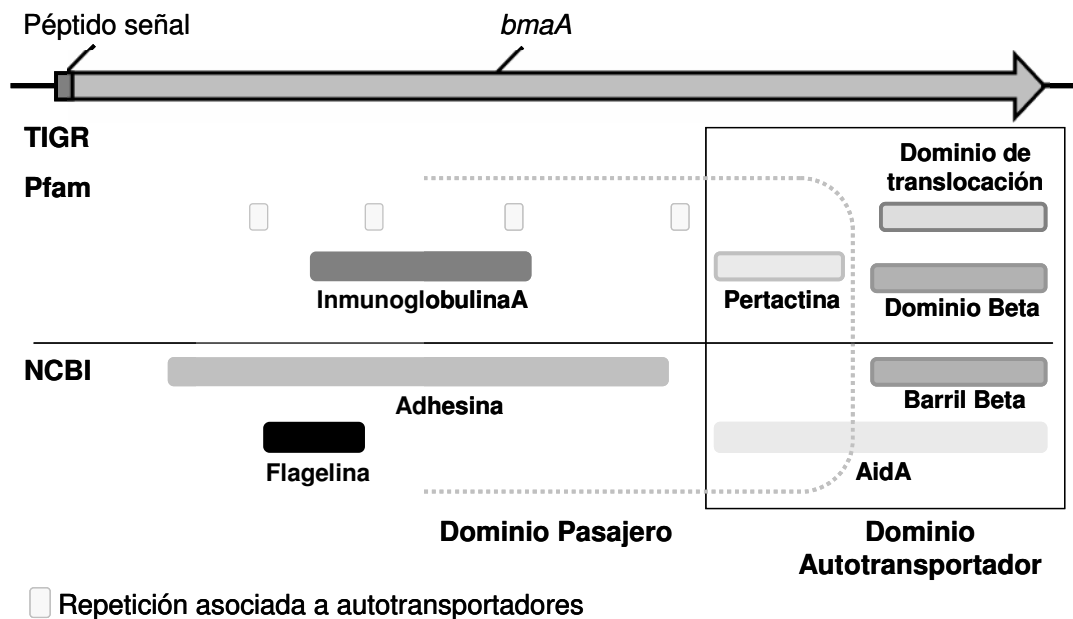


Fig.2: búsqueda bioinformática de dominios en BmaA. Se muestran los dominios predichos por distintas aplicaciones. Los dominios característicos de los AT se hallan presentes en los extremos N y C-terminal. Los dominios encontrados en el dominio pasajero de la proteína son característicos de las moléculas de adhesión.

El gen *bmaB* de *B. suis* codifica una proteína de 1593 aminoácidos, que posee una organización muy similar a la de BmaA. En la figura 3 se muestran esquemáticamente los dominios presentes y su organización; para la búsqueda de dominios se emplearon una vez más las predicciones realizadas por las aplicaciones *online* de TIGR, Pfam y NCBI.

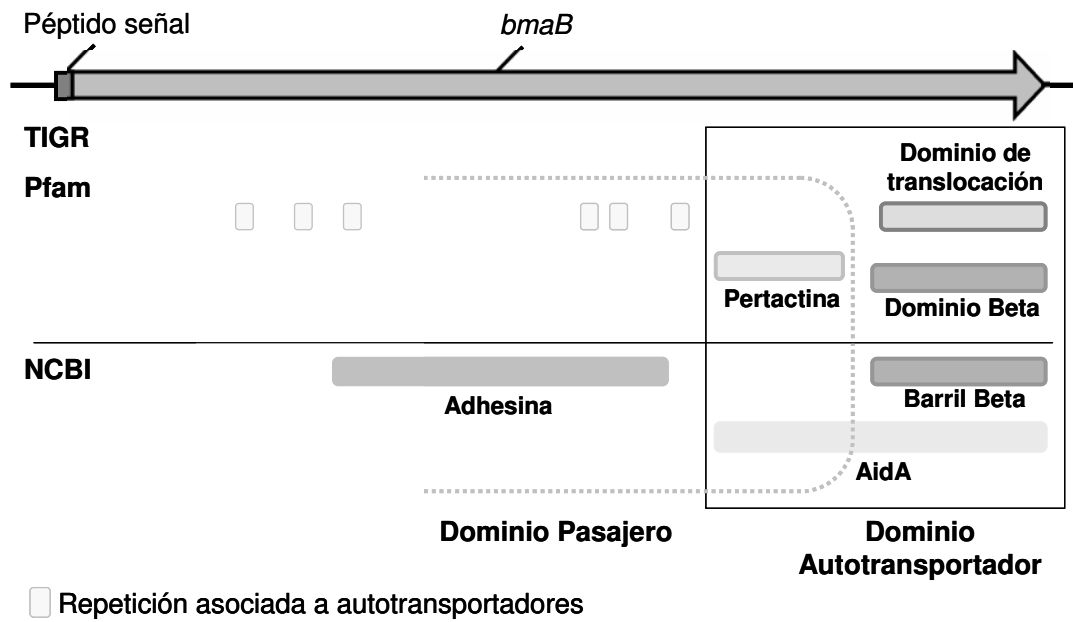


Fig.3: búsqueda bioinformática de dominios en BmaB. Se muestran los dominios predichos por distintas aplicaciones. Los dominios encontrados, y su organización, son muy similares a los identificados en BmaA.

Se diseñaron herramientas moleculares que permiten obtener mutantes por inserción en los genes *bmaA* y *B* de *B. suis* por recombinación homóloga al cromosoma. En el caso de *bmaA* se amplificó un fragmento de aproximadamente 1 Kb de la zona central del gen con oligonucleótidos específicos (MBmaA for y rev); este fragmento fue interrumpido por un *cassette* que confiere resistencia al antibiótico espectinomicina (Ω). Este *cassette* de recombinación fue clonado en el vector comercial pGEMT-easy, obteniéndose el plásmido pGEM-Teasy-*bmaA*:: Ω , que fue empleado como plásmido suicida (fig.4A). Esta construcción fue empleada para electroporar células electrocompetentes de *B. suis*. Las transformantes fueron plaqueadas en medios selectivos y luego se seleccionaron dobles recombinantes, espectinomicina resistentes (spec^R), ampicilina sensibles (amp^S). La inserción de Ω en el gen fue confirmada por PCR utilizando *primers* que sólo pueden amplificar fragmentos cuando el gen está intacto o *primers* internos que corroboran la presencia del *cassette* de resistencia (*primers* omega en combinación con los oligonucleótidos MBmaA for y rev) (fig.4B). En todos los casos se obtuvieron las bandas esperadas, por lo que se decidió comenzar la caracterización de uno de estos clones.

En el caso de *bmaB* se utilizó una estrategia muy similar: se amplificó un fragmento de aproximadamente 1,5 Kb de la zona central del gen con oligonucleótidos específicos (MBmaB for y rev); este fragmento fue interrumpido por un *cassette* que confiere resistencia al antibiótico Gentamicina (G). Se obtuvo el plásmido pGEM-Teasy-*bmaB*::G, que se empleó para electroporar *B. suis* (fig.5A). Se seleccionaron dobles recombinantes, gentamicina resistentes (gent^R), ampicilina sensibles (amp^S) y los clones mutantes fueron confirmados por PCR (fig.5B).

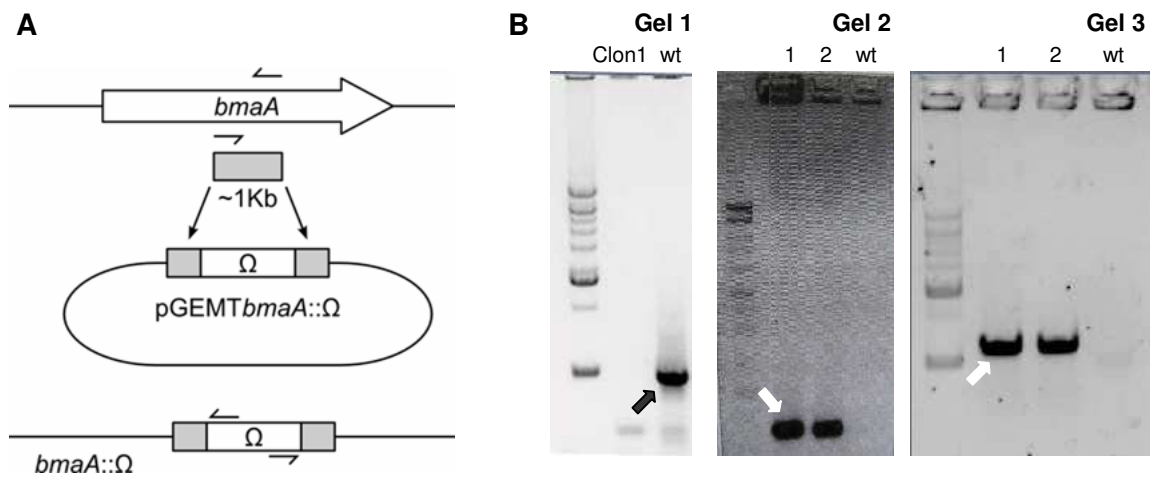


Fig.4: obtención de la mutante *bmaA*. **A:** esquema de la construcción empleada. **B:** corroboración por PCR de la inserción del *cassette* de resistencia Ω en el gen. Se emplearon *primers* externos al *cassette* que amplifican bandas sólo en la cepa wt (gel 1). Luego se emplearon *primers* internos complementarios a zonas del *cassette* Ω , junto a los *primers* MBmaA for y rev; esta combinación sólo amplifica bandas en la cepa mutante *bmaA* (geles 2 y 3). ➡ Banda esperada en la wt. ⇨ Banda esperada en la mutante.

En esta oportunidad se emplearon los oligonucleótidos MBmaB for y rev en la detección de la mutante; con ellos se espera amplificar una banda de aproximadamente 1,5 Kb en la cepa silvestre y una banda de aproximadamente 2,5 Kb en la cepa mutante (la banda silvestre más 1 Kb correspondiente al *cassette* interrumpiendo al gen). En este caso también se obtuvieron las bandas esperadas, por lo que se iniciaron los experimentos de caracterización de las dos mutantes en paralelo.

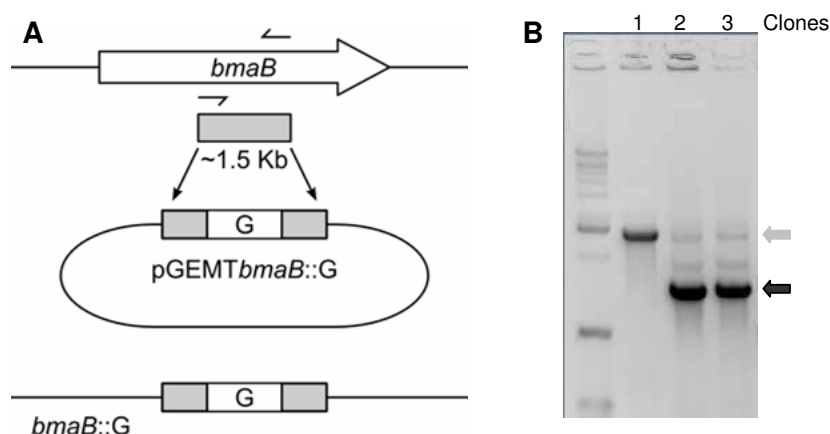


Fig.5: obtención de la mutante *bmaB*. **A:** esquema de la construcción empleada. **B:** corroboración por PCR de la inserción del *cassette* de resistencia G en el gen. Se emplearon *primers* capaces de amplificar la construcción entera, por lo que se esperan bandas de amplificación tanto en la cepa wt como en la mutante. ➡ Banda esperada en la wt. ⇨ Banda esperada en la mutante.

Detección de la expresión de *bmaA* y *bmaB* por RT-PCR

Como se explicó al comienzo de este capítulo, nos propusimos analizar el efecto de las mutaciones en *bmaA* o *bmaB* sobre diferentes propiedades de adhesión tanto “*in vitro*” (en cultivo) como en contacto con la célula eucariota (“*in vivo*”). Se decidió entonces determinar primero si *bmaA* y *B* eran capaces de expresarse tanto *in vitro* como en medio condicionado. Para ello se realizaron extracciones de ARN de la cepa silvestre cultivada en medio TSB o en un medio condicionado de células HeLa. Luego, por RT-PCR y electroforesis en geles de agarosa, se analizaron los perfiles de expresión de los genes *bmaA* y *bmaB* en ambos medios. Se pudo confirmar que ambos genes se expresan tanto *in vitro* (en medio TSB) como en medio condicionado (ver fig.6). Se empleó como control el gen del factor de iniciación de la traducción 1 (IF), de expresión constitutiva.

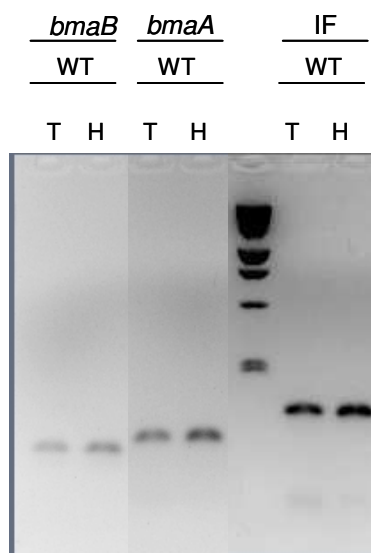


Fig.6: análisis de la expresión de *bmaA* y *bmaB*. corroboración por RT-PCR de la expresión de ambos genes. Se empleó ADN extraído de la cepa silvestre de *B. suis* M1330. Se indican los medios usados (T) TSB; (H) medio condicionado HeLa. Se indica el set de *primers* empleado en la amplificación, *bmaA primers* para *bmaA*; *bmaB primers* para *bmaB*; **IF primers** para el control de carga y de amplificación. Ambos genes se expresan en cultivo y en medio condicionado.

Como se comentó antes, la expresión de los genes en ambos medios posibilita la búsqueda de fenotipos alterados, ya sea en la relación de las mutantes con sus células hospedadoras, como entre las mismas bacterias.

Control de la mutante: test de disociación

En el capítulo anterior se comentó que los cultivos *in vitro* de *B. suis* pueden sufrir variaciones en la composición de su lipopolisacárido (LPS), que hacen que una cepa lisa se transforme en rugosa; y que esta transformación puede comprometer sus propiedades de adhesión a células, a superficies abióticas y entre las mismas bacterias. Entonces, antes de comenzar con la caracterización de las mutantes, se confirmó que tanto *bmaA* como *bmaB* siguiesen siendo cepas lisas, utilizando el test de aglutinación en acriflavina. Se pudo observar que tanto la cepa silvestre de *B. suis* como las mutantes emulsionaron fácilmente produciendo una suspensión homogénea. En cambio, la cepa rugosa de *B. ovis* empleada como control formó los grumos característicos de una aglutinación positiva. Luego de unos minutos se vio que los grumos formados en la aglutinación precipitaron, dejando la solución de acriflavina translúcida, mientras que en las otras cepas se seguía observando con una suspensión turbia (ver fig.7).



Fig.7: test de disociación. Se determinó que las mutantes *bmaA* y *bmaB* son lisas. Se emplearon como controles las cepas silvestres de *B. suis* (lisa) y de *B. ovis* (rugosa).

Estos resultados indican que las mutantes no sufrieron disociación.

Autoagregación/sedimentación

Ciertas adhesinas son responsables de la adherencia de las bacterias a distintos tipos celulares y, al mismo tiempo, poseen propiedades de auto-asociación, mediando en la agregación entre las mismas bacterias. Los autotransportadores Ag43¹⁶³ y Aida¹⁶² de *E. coli* son ejemplos muy estudiados de este fenómeno. Dado que distintas moléculas de adhesión pueden intervenir en la interacción entre bacterias-células o en la interacción bacteria-bacteria, se estudiaron las propiedades de autoagregación en las mutantes, comparándolas con las de las cepas silvestres de *B. suis* y *B. ovis*, como una medida de la interacción bacteria-bacteria. Primero se estudió la autoagregación y sedimentación de las cepas en forma macroscópica, en medio rico. Cultivos en fase exponencial de crecimiento (de igual densidad óptica) de todas las cepas fueron agitados vigorosamente en vórtex por 15 segundos. Luego se los dejó

reposar en la mesada por 60 min. Transcurrido este tiempo fueron sometidos a observación, para determinar si las bacterias habían sedimentado o no. En teoría, la ausencia de uno u otro autotransportador en la membrana de *B. suis* podría afectar la capacidad de una bacteria de interactuar con sus pares, impidiendo la formación de agregados (ver esquema en fig.8). Si estos agregados no se formasen la probabilidad de sedimentar de la cepa, o el tiempo en que esta sedimenta, podrían verse afectados. En este experimento se vió que, mientras que la cepa silvestre de *B. suis* fue capaz de sedimentar formando un “botón” de bacterias en el fondo del tubo, las mutantes no fueron capaces de sedimentar, permaneciendo en suspensión. El control silvestre de *B. ovis* no autoagrega (ver fig.8).

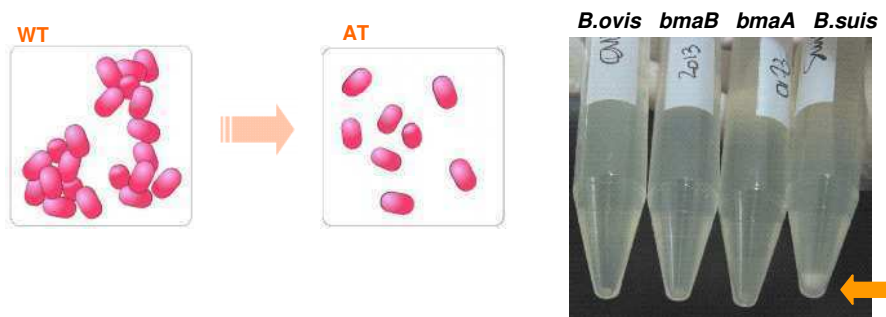


Fig. 8: observación macroscópica de las propiedades de autoagregación y sedimentación de *B. suis* y las mutantes en los autotransportadores. Se empleó como control la cepa silvestre de *B. ovis*. Se observó un “botón” de bacterias sedimentadas en el tubo de la cepa silvestre de *B. suis*, indicado por la flecha. Mientras que tanto en *B. ovis* como en las mutantes no se observaron bacterias sedimentadas.

Se ha descrito que células de *E. coli* que expresan un autotransportador (AidA) son capaces de interactuar con células expresando otro (Ag43) y, como resultado de esta interacción, las células pueden autoagregar¹⁶². Por ello se decidió investigar esta posibilidad en las mutantes de *B. suis*. Se emplearon cultivos de las cepas *bmaA* y *bmaB* en medio rico; ambos cultivos fueron agitados vigorosamente por 15 segundos. En un tercer tubo se colocaron alícuotas iguales de los dos cultivos juntas. Luego, los tres tubos se dejaron reposar en la mesada por 60 min. Transcurrido este tiempo se observó que, mientras que cada mutante por separado no es capaz de sedimentar, al co-inocular las dos mutantes juntas éste fenómeno puede revertirse parcialmente (ver fig.9). En efecto, en el cultivo mixto en el que se hallan juntas las dos mutantes, se pudo observar cierta “compactación” de las bacterias, que se ubicaron en la porción inferior del tubo. En principio, se podría especular que las cepas están interactuando mediante las proteínas BmaA y BmaB presentes en sus superficies, pero como ya vimos, existen otros autotransportadores y otras adhesinas en *B. suis* que podrían dificultar un análisis tan directo de este experimento.

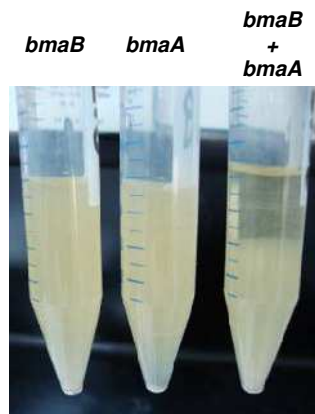


Fig.9: propiedades de autoagregación. Se estudió la capacidad de autoagregación de las mutantes en los autotransportadores, en cultivos individuales y en un cultivo mixto. Se observó que cada mutante por separado es incapaz de sedimentar, mientras que en el cultivo mixto este déficit es parcialmente superado.

Con el mismo objetivo se estudió la sedimentación en función del tiempo, tomando alícuotas de cada cultivo a intervalos regulares. Luego, la densidad óptica de todas las alícuotas fue medida en un lector de placas. En las cepas en las que hay sedimentación es esperable que la densidad óptica medida disminuya en función del tiempo, ya que las bacterias van abandonando paulatinamente la suspensión para acumularse en el fondo del tubo. Se utilizaron las cuatro cepas empleadas en el experimento anterior. Se observó que la densidad óptica de la cepa silvestre de *B. suis* disminuye en función del tiempo, mientras que las mutantes y *B. ovis* mantuvieron densidades ópticas similares a su DO inicial durante todo el experimento (ver fig.10). Esto indica que la cepa silvestre de *B. suis* es capaz de sedimentar, y confirma que las mutantes han perdido esta capacidad. El control rugoso de *B. ovis* tampoco es capaz de sedimentar. Estos resultados son coherentes con lo observado antes, y confirman que la autoagregación podría estar comprometida en estas cepas.

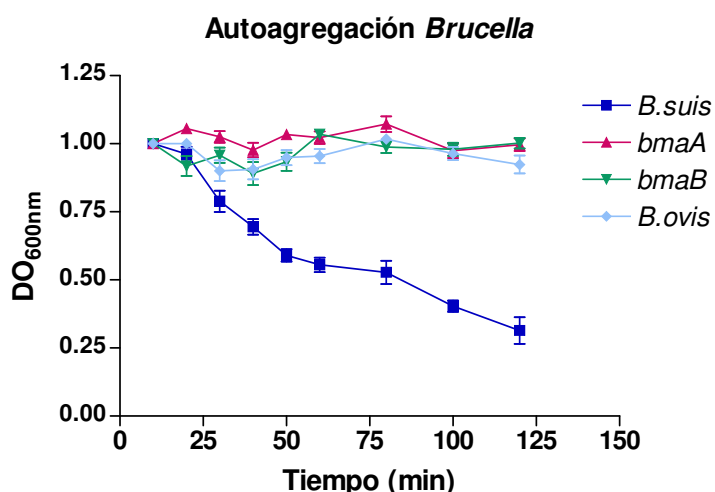


Fig.10: sedimentación en función del tiempo. Se observó que las mutantes no sedimentan en los tiempos medidos, mientras que la cepa silvestre de *B. suis* sí es capaz de hacerlo. Se realizaron mediciones por triplicado para cada cultivo, para cada tiempo.

Microscopía: formación de agregados

En las primeras caracterizaciones del género *Brucella* se decía que sus células se presentan agrupadas en tétradas, racimos o formando pequeños grupos²²². Teniendo esto en cuenta se decidió investigar si la autoagregación -y la falta de agregación en las mutantes- observada macroscópicamente tenían un correlato microscópico. Para ello se emplearon la cepa parental *B. suis* M 1330, transformada con un plásmido que permite expresar la proteína GFP constitutivamente en el citoplasma (*B. suis* GFP), y las mutantes *bmaA* y *bmaB* transformadas con el mismo plásmido (*bmaA* GFP y *bmaB* GFP). Cultivos en fase exponencial tardía de crecimiento (de igual densidad óptica) de todas las cepas fueron fijados con paraformaldehído y luego observados al microscopio confocal (Pascal). Se observó que la cepa silvestre de *B. suis* forma grandes agrupamientos de bacterias en los que las células pueden interactuar tanto en forma polar como lateralmente. En la figura 11 se muestran dos imágenes representativas de estos conglomeraos (ver fig.11A y B), y un detalle más cercano de los tipos de interacciones que se pueden observar en los preparados (ver fig.11C y D).

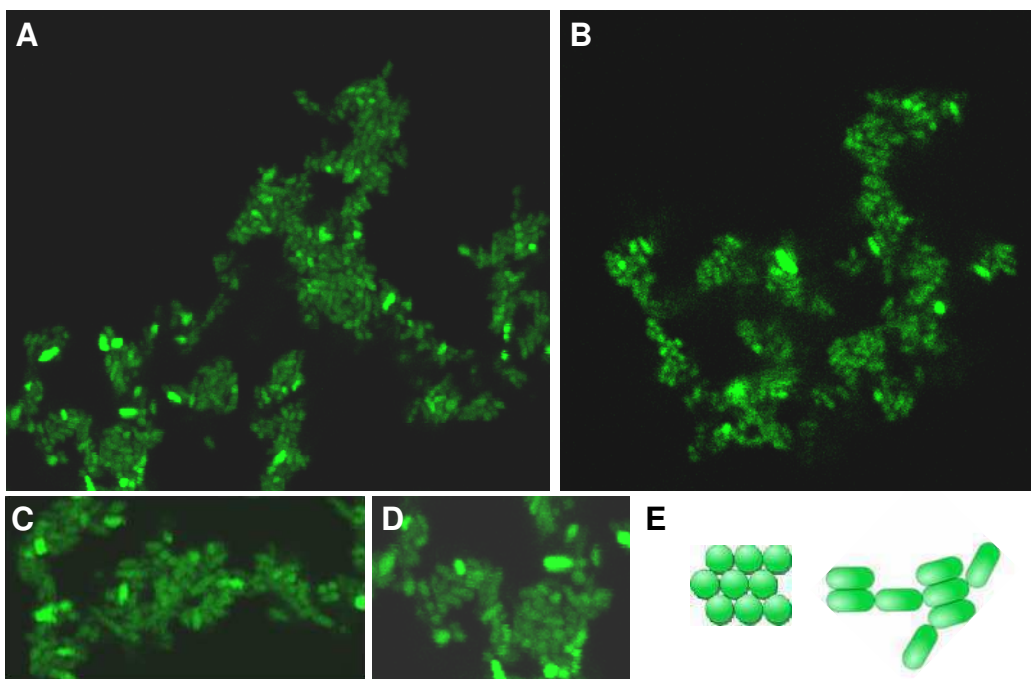


Fig.11: observación de la formación de agregados celulares por microscopía confocal. En **A** y **B**: se observan los agregados formados por bacterias de la cepa silvestre de *B. suis* (*B. suis* GFP) cultivadas en medio rico TSB. **C** y **D**: acercamiento para observar en detalle los tipos de interacciones que se dan entre las bacterias. **E**: esquemas de las interacciones encontradas.

En cambio, en ambas mutantes se observó que a nivel microscópico la formación de agregados celulares está alterada. Tanto en los preparados de *bmaA* (fig.12A, B y C), como en los de *bmaB* (fig.12D, E y F) se vio que las bacterias no forman los agregados observados en la cepa silvestre, sino que se hallan separadas y dispersas. Este comportamiento es más marcado en la mutante *bmaA*, en la que prácticamente no se observan células juntas; incluso en los casos en los que dos o más células se encuentran cerca en el espacio, éstas parecen no poder unirse estrechamente (ver acercamiento en fig.12C). En el caso de *bmaB* se observan bacterias solas y pequeños grupos de células, pero nunca se obtienen macroagregados como los de la cepa silvestre.

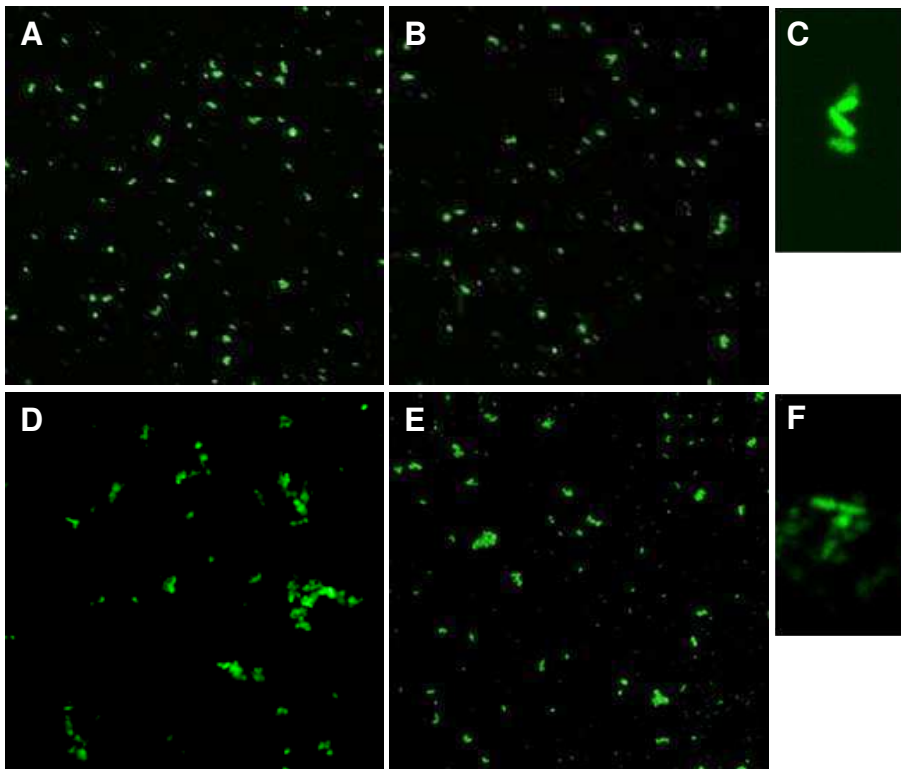


Fig.12: observación de la formación de agregados celulares por microscopía confocal. En **A** y **B**: se observan preparados de la mutante *bmaA*, que es incapaz de formar agregados. En **C**: se muestra un acercamiento en el que se ven cuatro células que no llegan a unirse estrechamente. En **D** y **E**: se observan preparados de la cepa *bmaB*, que presenta pequeños grupos de bacterias, pero que no alcanza a formar los agregados presentes en la cepa silvestre. En **F**: se observa un acercamiento a uno de estos pequeños grupos.

En conjunto, estos experimentos indican que estas dos proteínas podrían mediar en las uniones entre bacterias o, alternativamente, que su ausencia en la membrana de la bacteria altera la capacidad de la misma para autoagregar. En cualquiera de estos casos, es probable que otros procesos de adhesión estén comprometidos, por lo que su análisis se describe en las próximas secciones.

Formación de Biofilms

Como ya vimos, la formación de biofilms es un proceso complejo, en el que diversos factores permiten que los microorganismos se unan primero a un soporte, y luego, mediante interacciones bacteria-bacteria, recluten a sus pares hasta formar una comunidad (ver esquema en fig.13). Dado que estos genes codifican proteínas de superficie que aparentemente están involucradas en fenómenos de adhesión entre bacterias, se estudió la capacidad formadora de biofilms en las mutantes, comparándolas con la de la cepa silvestre. Se midió la adherencia a poliestireno en placas *multiwell*, por tinción con cristal violeta. Se emplearon cultivos de *B.suis* M1330 y de las cepas mutantes. Como control no adherente se empleó la cepa silvestre de *B.ovis*. Se observó que las mutantes presentaron una adherencia al poliestereno considerablemente menor (es decir, menor biomasa) a las 24 y 30 horas, a diferencia del control silvestre (ver fig.13). Se podría pensar que esta característica está relacionada al fenotipo antes descrito, y que la falta de interacción entre las bacterias impide que se reclute a una biomasa considerable sobre la superficie del pocillo. O, quizás, que los autotransportadores son necesarios para la interacción con este soporte abiótico.

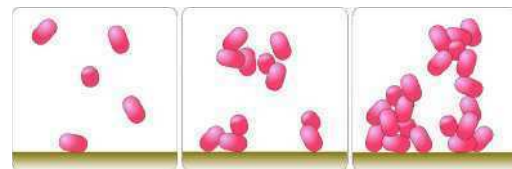
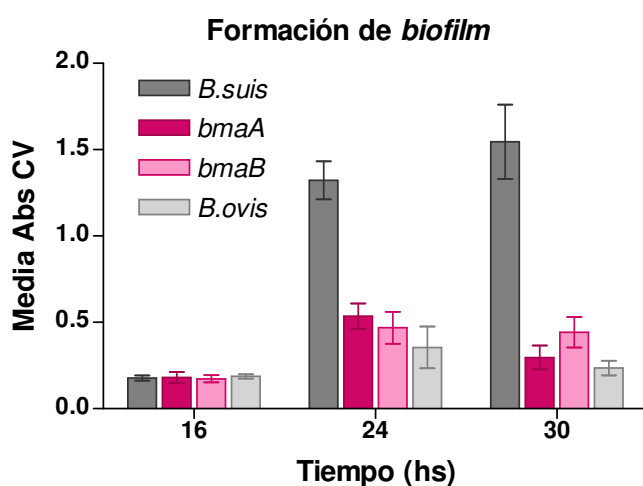


Fig.13: formación de biofilm. Se estudió la capacidad unión a un soporte abiótico en las cepas mutantes *bmaA* y *B* en función del tiempo; se la comparó con la de la cepa silvestre de *B.suis*. Como control no adherente se empleó *B.ovis*. Se vio que las dos mutantes no son capaces de adherirse al poliestireno.

Los enfoques *in vitro* sugieren fuertemente que las proteínas BmaA y BmaB cumplirían un rol en la adhesión entre bacterias y en la unión a soportes abióticos. Una posibilidad es que la autoagregación de las células esté promovida por interacción directa entre los autotransportadores, por lo que las mutantes son incapaces de interactuar. Alternativamente, puede ocurrir que la ausencia de estas proteínas provoque la modificación de algunas de las propiedades de la membrana externa de *B. suis*. Este tipo de fenómeno ha sido descrito en las mutantes del autotransportador Ag43 de *E. coli*, en las que se altera la composición de proteínas en la membrana externa, la autoagregación e incluso la morfología de la colonias¹⁶³. Es llamativo el hecho de que las mutaciones en cada uno de estos genes produzcan cepas con fenotipos tan similares. Sin embargo, ambas proteínas poseen características estructurales y de secuencia parecidas, lo cual puede resultar en funciones redundantes.

Adhesión/invasión a células epiteliales

En los experimentos anteriores se estudiaron las propiedades de adhesión *in vitro* de las mutantes *bmaA* y *bmaB*. Algunos autotransportadores, como los antes mencionados AidA y Ag43, cumplen un rol dual, funcionando como adhesinas tanto en las interacciones bacteria-bacteria como en la unión de la bacteria a las células eucariotas. En esta sección se estudia la capacidad de dichas mutantes de adherirse e invadir distintos tipos celulares. Se espera que, si las proteínas BmaA y BmaB son realmente moléculas de adhesión que intervienen en la colonización de las células hospedadoras, la capacidad infectiva de las mutantes se vea parcialmente reducida. En esta evaluación se emplearon distintas líneas celulares: células epiteliales HeLa como modelos validados para *Brucella* spp. y modelos celulares no clásicos como A549 (línea alveolar) y osteoblastos (SaOS-2). Se eligieron estas líneas celulares porque corresponden a tejidos normalmente infectados por *Brucella*. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el grupo de Dr. Pablo Baldi de la facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), que estudia la habilidad de las distintas especies de *Brucella* para invadir y replicar en distintos tejidos humanos^{20, 21}.

Se realizaron infecciones de las células empleando cultivos estandarizados (de igual densidad óptica) de las mutantes *bmaA* y *bmaB*, junto a controles con la cepa silvestre de *B. suis* M1330. Luego se realizó un recuento de la cantidad de bacterias adheridas e internalizadas en cada caso. Inesperadamente, en los ensayos con células HeLa ambas mutantes exhibieron un recuento total de bacterias asociadas a las células aproximadamente cinco veces mayor que la cepa silvestre (ver fig.14A). Al medir la invasión en este tipo celular se observó que la mutante *bmaA* exhibió un recuento comparable al de la cepa silvestre, mientras que *bmaB* volvió a mostrar un recuento aproximadamente cinco veces mayor (fig.14B). Si bien diferencias menores a un orden de magnitud no son consideradas relevantes en este modelo, es llamativo que ambas mutantes presenten recuentos mayores que la cepa silvestre en cuanto a la adhesión, y que *bmaB* sea aparentemente más eficaz que la cepa silvestre en la invasión a este tipo celular.

Al enfrentar cada una de las mutantes a osteoblastos, no se vieron diferencias significativas en la adhesión ni en la invasión con respecto a la cepa silvestre (no mostrado). En cambio, al enfrentar las mutantes a epitelio alveolar (línea A549) se vieron diferencias semejantes a las obtenidas con las células HeLa. En estos ensayos también se obtuvieron recuentos mayores para las cepas mutantes que para la cepa silvestre en cuanto a la adhesión a las células. Tanto *bmaA* como *bmaB* exhibieron recuentos casi nueve veces mayores que la cepa silvestre (ver fig.15A). En los ensayos de invasión se obtuvieron resultados similares a los de las células HeLa, *bmaA* mostró recuentos comparables a los de la cepa silvestre y *bmaB* fue siete veces más infectiva (ver fig.15B). Una vez más las diferencias no llegan a superar un orden de magnitud, pero los resultados son coherentes con lo obtenido en otro modelo celular. En la discusión se especula sobre las posibles explicaciones que hemos encontrado para estos resultados y sus implicancias.

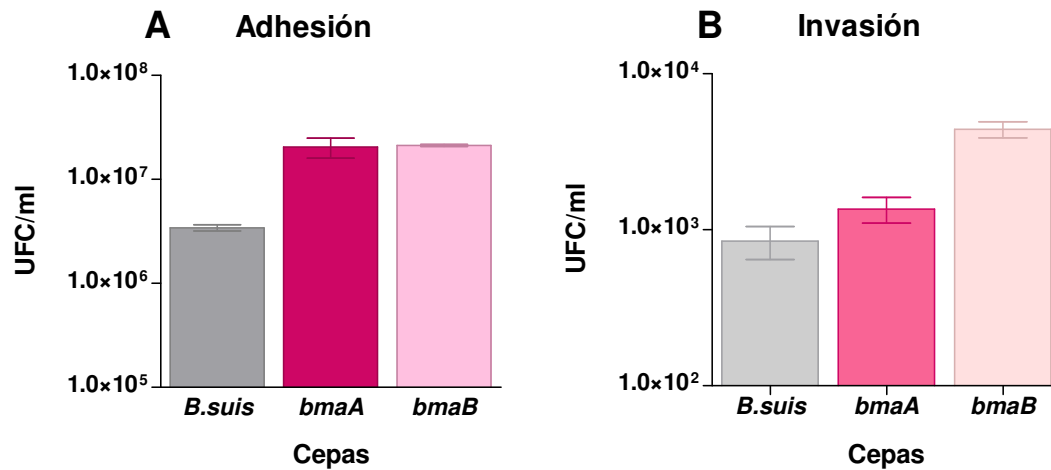


Fig. 14: propiedades de adhesión/invasión a células HeLa. Se compararon las cepas mutantes y silvestre en su capacidad de adherirse (A) e invadir (B) células eucariotas. En la adhesión ambas mutantes mostraron un mayor recuento respecto de la cepa silvestre. En la invasión *bmaA* exhibió números comparables a los de la cepa silvestre, mientras que *bmaB* fue alrededor de 5 veces más invasiva.

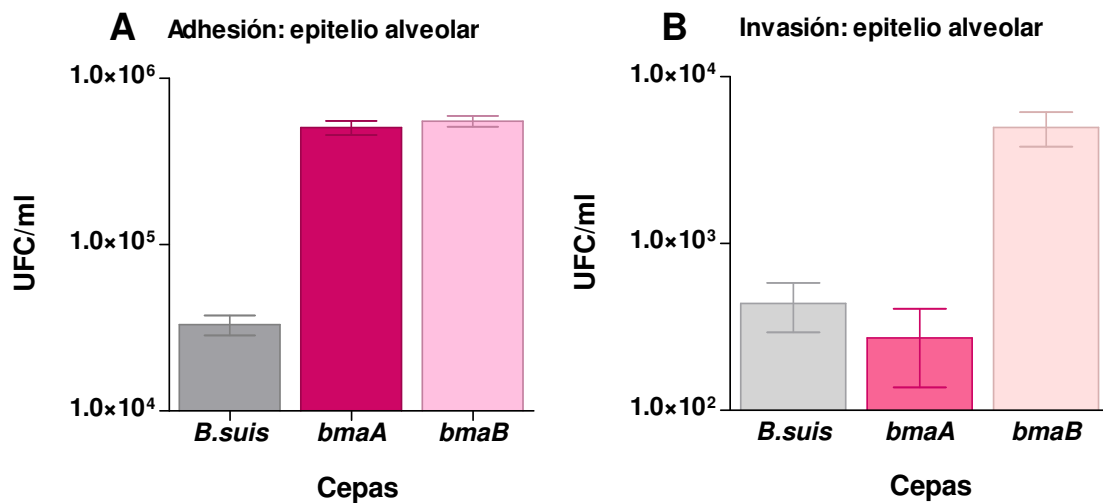


Fig. 15: propiedades de adhesión/invasión a células alveolares A549. Se compararon las cepas mutantes y silvestre en su capacidad de adherirse (A) e invadir (B) células alveolares. En la adhesión ambas mutantes mostraron un mayor recuento respecto de la cepa silvestre. En la invasión *bmaA* exhibió números comparables a los de la cepa silvestre, mientras que *bmaB* fue alrededor de 7 veces más invasiva.

Replicación intracelular

Se estudiaron los efectos de las mutaciones en los genes *bmaA* y *bmaB* sobre la persistencia en el medio intracelular en un modelo celular de fagocitos profesionales (macrófagos J774) y en células epiteliales (células HeLa). No se observaron diferencias en la replicación intracelular entre las cepas silvestre y mutantes en ninguno de los dos modelos (fig.16A y B).

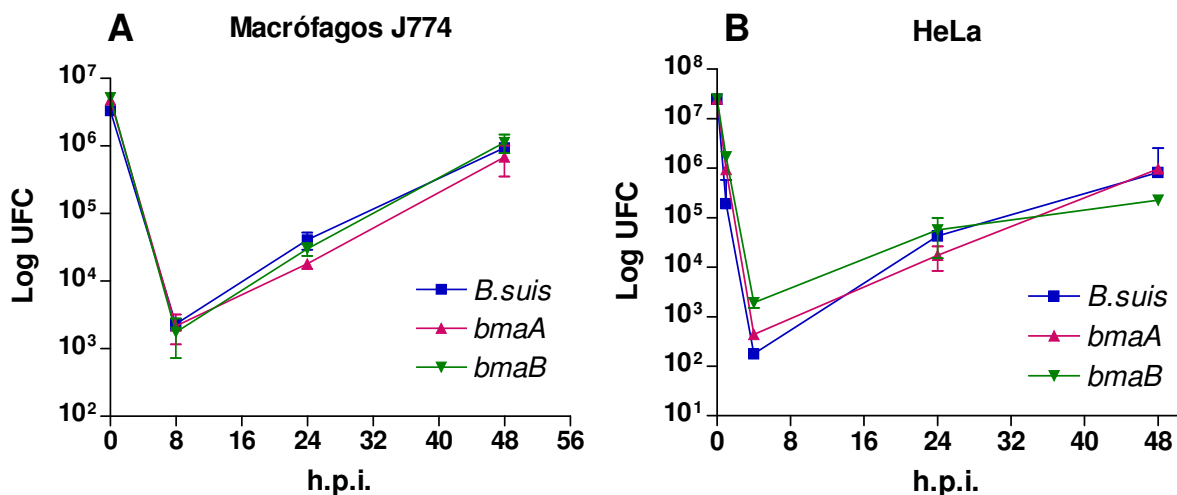


Fig. 16: replicación intracelular. Se inocularon fagocitos profesionales (A) y células HeLa (B) con la cepa silvestre y las mutantes. Se hicieron recuentos a varios tiempos p.i. No se observaron diferencias en la replicación intracelular entre las cepas estudiadas. Es decir, que BmaA y BmaB no son imprescindibles para la supervivencia intracelular de la bacteria en estas líneas celulares.

En macrófagos J774 no existen diferencias en los recuentos en ninguno de los tiempos medidos. En los puntos correspondientes a 1 y 4 h.p.i. en células HeLa se observan recuentos de bacterias levemente mayores en las cepas mutantes, tal como se observó en los experimentos anteriores, pero en tiempos posteriores no se observan diferencias marcadas. La mutación en estos dos autotransportadores no parece afectar la supervivencia intracelular de la bacteria en estas líneas.

Resistencia a suero

Para completar el análisis de estos autotransportadores se decidió estudiar si son capaces de conferirle a la bacteria resistencia a la acción bactericida del suero. Como vimos, algunos autotransportadores-adhesinas reclutan a los reguladores del complemento presentes en el suero y los mantienen unidos sobre la bacteria para explotar sus propiedades protectoras y prevenir la activación del complemento sobre las superficies microbianas²¹⁴⁻²¹⁷. Para ello se realizó un ensayo de resistencia a suero, en el que se analizaron la cepa silvestre de *B. suis* y las mutantes *bmaA* y *bmaB*. Las cepas se incubaron en presencia de suero a diferentes concentraciones por 10 y 60 minutos, luego se hizo un recuento de la cantidad de bacterias viables recuperadas. Como puede verse en la fig.17, no se

observaron diferencias en la resistencia a suero entre las cepas ensayadas, en ninguno de los tiempos medidos.

Como las dos cepas mutantes son resistentes a la acción bactericida del suero en igual medida que la cepa silvestre, se puede garantizar que BmaA y BmaB no están reclutando a reguladores del complemento para modificar su acción.

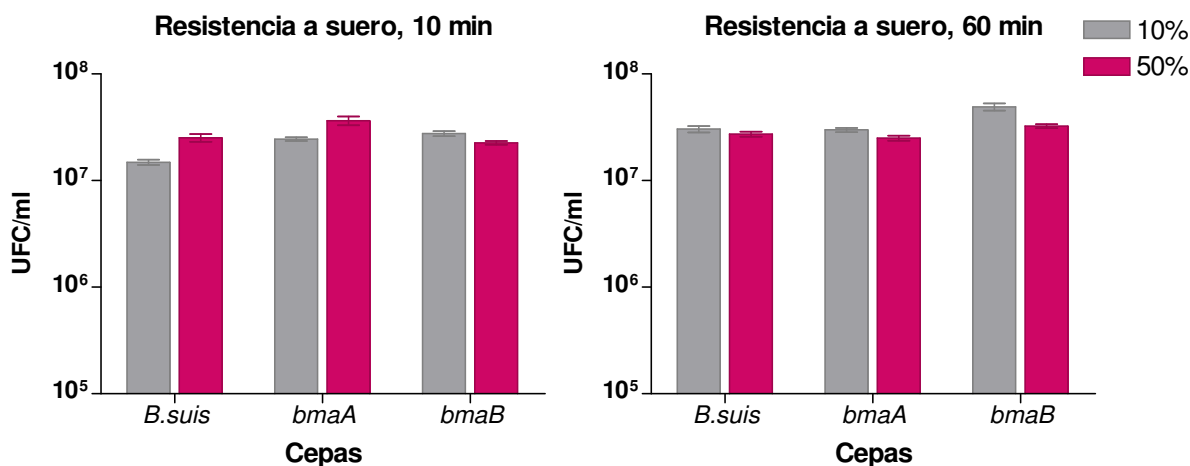


Fig. 17: ensayo de resistencia a suero. Se evaluó la resistencia a suero en la cepa silvestre y en las mutantes *bmaA* y *bmaB*; se emplearon dos concentraciones distintas de suero y se hicieron recuentos a dos tiempos distintos. Se observó que las cepas son resistentes a la acción bactericida del suero en igual medida.

En la primer parte de este capítulo se describieron los experimentos “*in silico*” y en la mesada que llevaron a la identificación y caracterización de otras dos posibles adhesinas de *B. suis*, denominadas BmaA y BmaB. En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que estas proteínas de *B. suis* participan en las interacción entre las bacterias y sugieren que podrían tener algún rol en la infección de algunos tejidos epiteliales.

Expresión heteróloga

Como una estrategia alternativa para estudiar la interacción entre *Brucella* y la célula hospedadora se realizaron experimentos de expresión heteróloga, en los que una de las posibles adhesinas de *B. suis* fue expresada en la superficie de una cepa derivada de *E. coli* K12 no invasiva ni adherente (CC118), ver el esquema en la figura 18. Luego, la capacidad adquirida por esta cepa para adherirse/invadir células HeLa en cultivo y sus propiedades de autoagregación fueron analizadas. La adhesina seleccionada para estos experimentos fue BmaA.

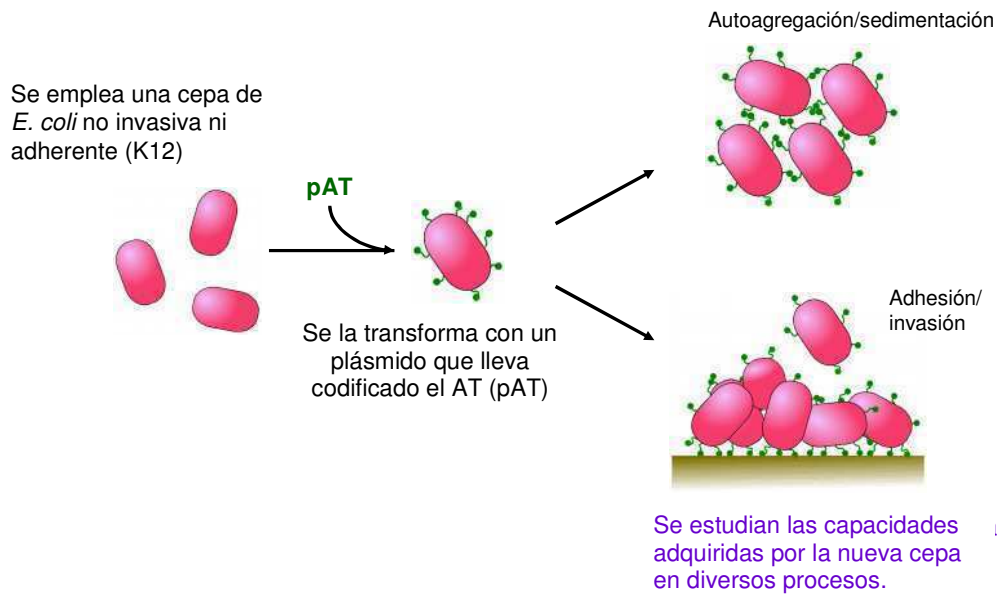


Fig.18: esquema de la estrategia de expresión heteróloga empleada. Se transformaron células competentes de una cepa derivada de *E. coli*, no invasiva ni adherente, con un plásmido que porta la información para la expresión de *bmaA* sobre la superficie de la bacteria. Luego, las capacidades adquiridas por la nueva cepa fueron estudiadas.

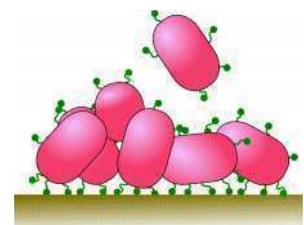
Con esta estrategia se espera poder analizar las propiedades de adhesión que confiere este gen en particular, en un ambiente desprovisto de otras adhesinas, invasinas, etc.

Lo primero analizado fue la capacidad de adhesión/invasión a células HeLa de esta nueva cepa derivada de K12, *bmaA+*. Se espera que, si el autotransportador posee algún rol en la infección de los tejidos epiteliales, la cepa que lo expresa (*bmaA+*) pueda adherirse a las células en cultivo en mayor medida que el control (se empleó *E. coli* que porta el vector vacío).

Adhesión/invasión a células epiteliales

Se llevaron a cabo infecciones de células HeLa idénticas a las antes descritas con *E. coli bmaA+* y un control transformado con el vector vacío, en las que se determinaron mediante recuentos las cantidades de bacterias unidas e internalizadas.

Los resultados obtenidos por recuento indican que la presencia de BmaA incrementa cuatro veces la adhesión de *E. coli* no adherente ni invasiva a células HeLa (ver fig.19A). Además, la invasión a células en cultivo se ve incrementada casi ocho veces (ver fig.19B).



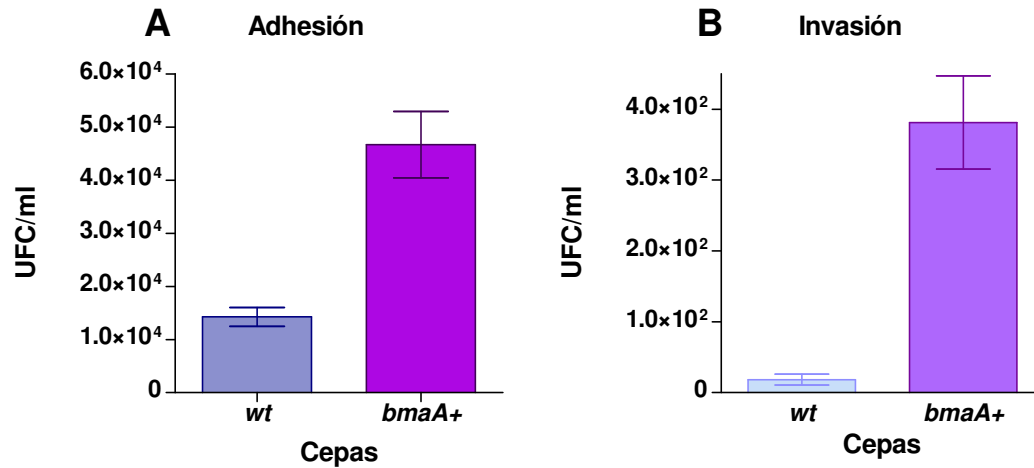


Fig.19: expresión heteróloga, adhesión/invasión a células epiteliales. Se observó que la presencia de BmaA incrementa significativamente la capacidad de la cepa de adherirse (A) y de invadir (B) células HeLa en cultivo. Se empleó como control la misma cepa de *E. coli*, transformada con el vector vacío (*wt*). Estos experimentos fueron realizados por triplicado y repetidos tres veces.

Estas observaciones apoyan la hipótesis de que esta proteína podría cumplir alguna función de adhesina/invasina a células epiteliales.

Autoagregación y sedimentación

Se analizó la capacidad de autoagregar y sedimentar de *E. coli* transformada con la adhesina, en comparación con el control que porta el vector vacío (*wt*). Se realizó un experimento equivalente al empleado con las cepas de *Brucella*, y se determinó la sedimentación (medida como disminución en la DO) en función del tiempo (ver fig.20).

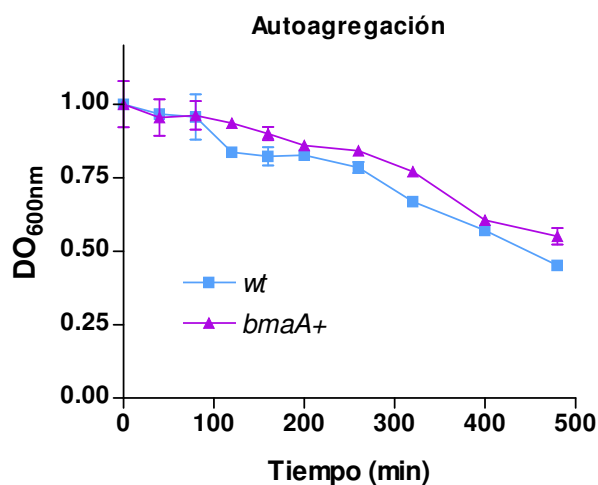
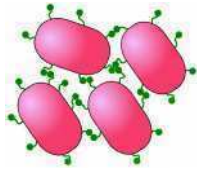


Fig.20: autoagregación y sedimentación. Se estudió la capacidad de autoagregar y sedimentar en función del tiempo, en la cepa *bmaA+* y se la comparó con la de la cepa control. Se observó que ambas cepas poseen la misma velocidad de sedimentación.



En este caso se observó que la cepa *bmaA+* sedimenta a la misma velocidad que el control; por lo que se podría especular que las interacciones BmaA-BmaA no son relevantes en la autoagregación en esta cepa, o que la disposición de las proteínas en la membrana de *E. coli* no es la apropiada para permitir la interacción de unas con otras.

Los resultados obtenidos con esta aproximación experimental confirman y complementan la información suministrada por las mutantes.

En conjunto, estos resultados conforman una de las primeras descripciones de adhesinas de *B. suis*. Las proteínas BmaA y BmaB resultaron ser miembros de sistemas de secreción de tipo V, involucrados en procesos de adhesión a soportes abióticos y en las interacciones entre bacterias. Además, se vio que estas proteínas posiblemente modulen la adhesión de *B. suis* a algunos tipos celulares durante el proceso de infección. Ambas proteínas parecen poseer roles similares que, sin embargo, no son redundantes.

Discusión

Brucella es una pequeña bacteria Gram-negativa, responsable de la Brucelosis, una infección zoonótica que afecta rumiantes, cerdos, perros, roedores, cetáceos¹ e incluso humanos. La brucelosis como zoonosis provoca en Argentina grandes pérdidas en la producción pecuaria y restricciones sanitarias en el comercio interno y en las exportaciones de animales y sus subproductos. La brucelosis humana, o fiebre de Malta, es una infección crónica, difícil de diagnosticar y de curar, que posee un amplio espectro de manifestaciones clínicas.

Brucella es un patógeno intracelular facultativo que penetra a través de las mucosas³⁷. Un aspecto clave en la virulencia de este género es la habilidad de entrar y sobrevivir dentro de células fagocíticas y no fagocíticas³⁸. Para lograrlo hace uso de una estrategia única en la que modifica el proceso de maduración de los fagosomas, creando un nuevo nicho intracelular en el que se multiplica^{39, 40}. En contraste con otros patógenos, no se han descrito factores de virulencia clásicos en *Brucella* (exotoxinas, fimbrias, flagelos, fagos lisogénicos, plásmidos, lipopolisacárido endotóxico, inductores apoptóticos, etc.⁴¹) y, comparando con otros patógenos intracelulares muy estudiados como *Salmonella*, es muy poco lo que se conoce sobre su genética.

En esta tesis de doctorado se estudiaron diversos factores relevantes dentro de la fisiología de *Brucella* spp., que le permiten interactuar con su hospedador. El trabajo se enfocó, en particular, en dos procesos esenciales para la mayoría de los patógenos: el transporte de moléculas desde el citoplasma (ya sea para la secreción de efectores o para el eflujo de compuestos tóxicos) y la adhesión a los tejidos del hospedador en el proceso de colonización.

Transporte

En el capítulo I de esta tesis hemos analizado los posibles roles del único miembro de la familia TolC (BepC) codificado en el genoma de *B. suis*. Como ya se describió previamente, los miembros de la familia TolC son reclutados por diferentes tipos de translocasas de membrana interna, para permitir el pasaje directo de diversos sustratos desde el citoplasma al medio extracelular. El análisis filogenético realizado con BepC y sus homólogos no señaló claramente cuáles podrían ser sus sustratos. En cambio, los estudios de complementación funcional realizados con la mutante *tolC* de *E. coli* (hipersensible a drogas e incapaz de secretar proteínas via SSTI) sugirieron para BepC un rol en el eflujo de pequeños compuestos hidrofóbicos.

La mutación en el gen *bepC* de *B. suis* incrementó notablemente la sensibilidad de *B. suis* a sales biliares, colorantes como la rodamina 6G y el bromuro de etidio, y afectó de manera significativa la resistencia a antimicrobianos como eritromicina, tetraciclina y norfloxacin. Estos resultados indican que BepC es capaz de participar en el eflujo de diversas drogas. Uno de los interrogantes obvios que surgen

a partir de este análisis es: Cuáles son las translocasas que acompañan a BepC? o, más precisamente, cuáles son los transportadores de membrana interna codificados en el genoma de *B. suis* que trabajan en asociación con BepC para eliminar compuestos tóxicos?. Nuestro análisis genómico indica que existen posibles sistemas ABC-MFP y RND-MFP que, en teoría, podrían trabajar junto a BepC (ver fig.1). De hecho, contamos con resultados experimentales que confirman que al menos un sistema RND-MFP (BepDE) es dependiente de la presencia de BepC en la membrana externa de *Brucella* para ejercer su función de transporte de compuestos tóxicos⁷⁷; otras evidencias sugieren que también uno de los sistemas ABC-MFP (BepAB) formaría un complejo con BepC para expulsar antimicrobianos (F.A. Martín, no publicado). En efecto, aunque la interacción de BepC con BepAB en *B. suis* no fue confirmada en *B. suis*, BepAB fue capaz de revertir el fenotipo de una cepa hipersensible de *E. coli* de una manera dependiente del homólogo de *E. coli* (TolC). Estos resultados sugieren que la asociación con el componente de membrana externa (BepC) sería imprescindible para que BepAB cumplan su función de detoxificación en *B. suis*. Para otros transportadores tripartitos (BepFG y BepXYZ), también estudiados por el Dr. Martín, la interacción con BepC en *B. suis* no fue confirmada experimentalmente; sin embargo, los perfiles de susceptibilidad de las mutantes sugieren que la asociación con el componente de membrana externa es imprescindible para cumplir su función de detoxificación.

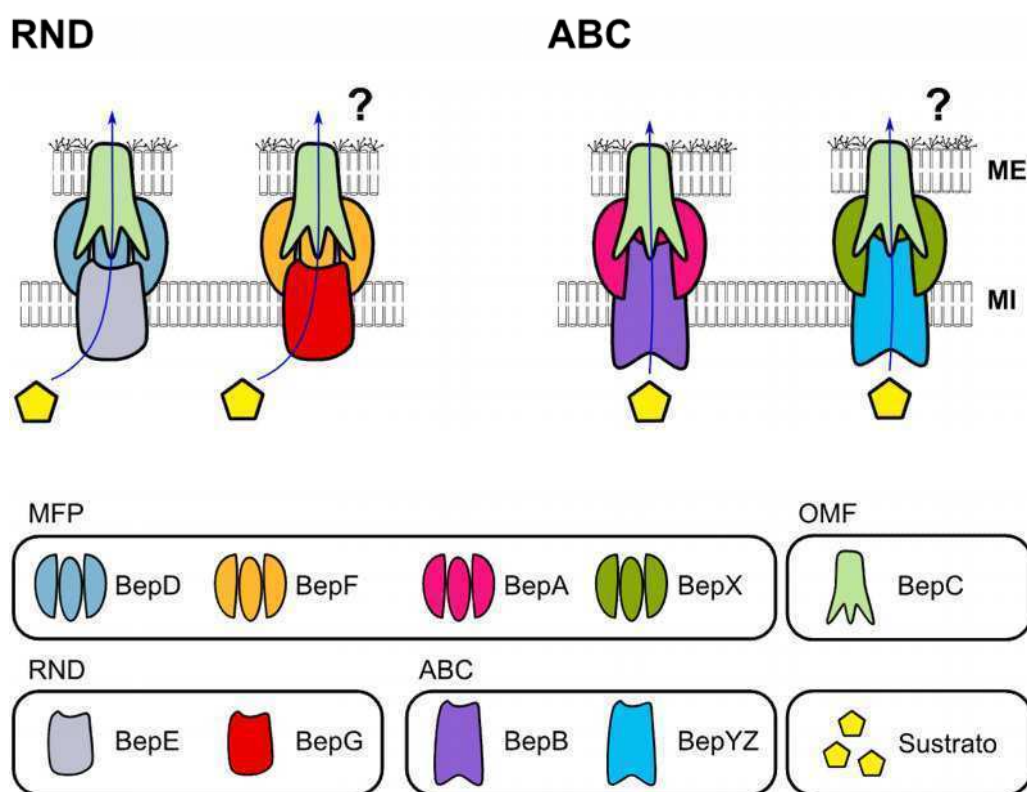


Fig.1: sistemas tripartitos en *B. suis*. Esquemas de cuatro de los posibles sistemas tripartitos de transporte. En todos los casos BepC funcionaría como el componente de membrana externa. En dos de estos transportadores (BepAB y BepDE) esta interacción ha sido confirmada.

Los mecanismos de detoxificación en bacterias han ganado interés creciente en las últimas décadas debido a que muchos patógenos humanos han ido adquiriendo resistencias a los diversos antibióticos usados en la clínica; y a que es común que estos nuevos niveles de resistencia se logren por sobreexpresión de sistemas de eflujo, como los transportadores tripartitos²²³⁻²²⁵. Hoy en día, es claro que esta estrategia bacteriana de sobreexpresión ha surgido como respuesta al extensivo uso de antibióticos y antimicrobianos. Por lo tanto, otro interrogante válido sobre los sistemas de eflujo concierne a sus sustratos fisiológicos y a su rol *in vivo*. Las bombas de eflujo han demostrado tener funciones fisiológicas transportando sales biliares²²⁶⁻²²⁸, hormonas esteroideas²²⁴, lípidos fecales^{229, 230}, homoserina lactonas^{97, 231} y posiblemente otros sustratos aún no identificados. Los procesos de eflujo dependientes de BepC podrían en principio contribuir a la resistencia a compuestos naturales presentes en el hospedador. En los ensayos de sensibilidad a drogas en *B. suis* hemos demostrado que, mientras que la cepa silvestre de *B. suis* es considerablemente resistente a una mezcla de sales biliares, el crecimiento de la mutante *bepC* es casi completamente inhibido a la misma concentración de este sustrato (ver Cap.I fig.20). Esta observación sugiere que BepC, junto a algunas translocasas de membrana interna, es capaz de eliminar eficientemente las sales biliares producidas por el hospedador. En el intestino de los mamíferos las sales biliares son muy abundantes, y las bacterias que ingresan al organismo por la vía oral deben necesariamente enfrentarse a ellas en el tránsito intestinal. Otra posibilidad es que BepC participe en el eflujo de otras moléculas de tipo esteroide encontradas en el hospedador durante el proceso de infección²³⁰. Esta habilidad podría ser particularmente relevante, ya que se ha demostrado que la membrana externa de *Brucella* spp. es muy permeable a moléculas hidrofóbicas⁶⁰. Propiedades similares fueron descritas para la membrana externa de *Vibrio cholerae*, un enteropatógeno que resiste a la actividad bactericida de las sales biliares del intestino mediante bombas de eflujo²³².

Como vimos, otro rol alternativo propuesto para los sistemas tripartitos es el de transporte de moléculas señal hidrofóbicas, como las N-acil-homoserina lactonas (acil-HSL) de cadena larga o las quinolonas que intervienen en el *quorum sensing* bacteriano^{233, 234}. Si bien en *Brucella* aún no se han descrito sistemas de censado del *quorum* completos, sí se han caracterizado dos homólogos al regulador LuxR^{235, 236} capaces de regular la expresión de ciertos factores de virulencia. Y, aunque hasta el momento no se ha identificado una sintetasa de acil-HSL, sí se ha identificado por HPLC y espectrometría de masa una N-dodecanoilhomoserina lactona²³⁷; purificada a partir de extractos concentrados de sobrenadantes de cultivo de *B. melitensis*. El transporte de esta molécula al medio extracelular podría ser dependiente de BepC.

La secreción de proteínas no fue complementada por BepC en la mutante *tolC* de *E. coli*; esto sugiere que BepC no estaría involucrada en este tipo de transporte. Es importante aclarar, sin embargo, que en *Brucella* este fenotipo no fue analizado, ya que esta bacteria no secreta al medio cantidades detectables de proteínas¹³, y no posee SSTI funcionales, de acuerdo a nuestro propio análisis (F.A. Martín, no publicado) y a los genomas publicados de *Brucella*^{4, 13, 28, 30, 43}.

Nuestras observaciones indican que la proteína de membrana externa BepC contribuye significativamente a la resistencia/sensibilidad intrínseca de *B. suis* a diversos antibióticos. Como vimos, la brucelosis humana se trata normalmente con doxiciclina (una tetraciclina), estreptomina, rifampicina, fluoroquinolonas o combinaciones de estos antibióticos. También comentamos que la aparición de

resistencias a estos u otros antimicrobianos en *Brucella* spp. no es por el momento considerado como un problema mayor. Sin embargo, la presencia de bombas de eflujo dependientes BepC, capaces de eliminar antibióticos debe ser un llamado de atención sobre la posible evolución de los patrones de sensibilidad a drogas de *B. suis*. De hecho, al momento se han aislado algunas cepas de *Brucella* no susceptibles a rifampicina en Turquía y Arabia^{23, 238}. También se ha informado sobre la falta de actividad bactericida de algunas fluoroquinolonas en *Brucella* spp.^{22, 239, 240, 241, 242}. Teniendo en cuenta que los procesos de eflujo dependientes de proteínas de la familia TolC son responsables de fenotipos de multiresistencia en otras bacterias, como por ejemplo en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (cepa DT104)^{243, 244}, no puede descartarse la ocurrencia de un mecanismo similar dependiente de BepC en *B. suis*.

La observación de que BepC es capaz de reemplazar a TolC de *E. coli* en el *uptake* de colicina E1 es curioso. Este fenómeno de complementación podría no tener significancia biológica, ya que *B. suis* no es susceptible a las colicinas. En su entrada a las células, la colicina E1 parasita un sistema multiproteico que cumple otras funciones en la membrana de *E. coli*¹²⁴. La complementación de este fenotipo indica que la proteína de la familia TolC de *B. suis* posee algunas características estructurales que le permiten suplir a TolC de *E. coli* en esta función. Esta complementación podría ser fortuita, o sugerir que BepC podría ser funcional en procesos de transporte aún no descritos, como son la recepción o incorporación de moléculas de alto peso molecular.

En los ensayos *in vivo* de infecciones en ratón se recuperaron significativamente menos bacterias a las 2, 3, 5 y 7 semanas p.i. en los ratones infectados con la mutante *bepC* en comparación con los controles, infectados con la cepa silvestre de *B. suis* M1330. Este fenotipo fue complementado totalmente al reponer una copia intacta del gen *bepC* en la mutante; esto indica que existe una asociación directa entre la mutación en el gen *bepC* y la atenuación. También se realizaron infecciones en modelos celulares. En ellas no se observaron diferencias entre *bepC* y la cepa parental en las habilidades de invasión y replicación intracelular en macrófagos J774 y células HeLa. Esta discrepancia entre los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* podría ser explicada por diferentes hipótesis. Las mutantes en la lipoproteína de membrana externa Omp10 de *B. abortus* mostraron fenotipos similares a los de *bepC*, es decir, fueron atenuadas *in vivo* pero no *in vitro*. También, mutantes en otra lipoproteína (Omp19) de *B. abortus* mostraron fenotipos indistinguibles a los de la cepa parental *in vitro*, usando macrófagos bovinos, aunque fueron atenuadas *in vivo*. En estos casos fue sugerido que la atenuación estaba determinada por un aumento en la sensibilidad al complemento, ocasionada por la falta de estas proteínas en la membrana externa²³⁶. Las mutantes que poseen alteraciones en su LPS también son frecuentemente atenuadas *in vivo* pero no *in vitro*^{65, 245}. El LPS de estas mutantes podría ser más sensible a los mecanismos de la respuesta inmune del hospedador en las etapas tempranas de la infección. En todos estos casos existen factores del hospedador que condicionan la supervivencia extracelular de la bacteria²⁴⁶. Estos procesos podrían tener impacto en la diseminación de *Brucella*²³⁵ y en el número de bacterias que alcanzan las células, especialmente en la fase inicial de la infección. Es posible que BepC posea un efecto inmuno-modulador similar. Otra hipótesis plausible está más

relacionada al rol de BepC en el eflujo de drogas. La remoción de compuestos tóxicos encontrados en el hospedador durante la infección o de otros compuestos endógenos, producidos por la misma bacteria, podría ser dependiente de BepC. Esto podría tener una influencia directa sobre la supervivencia o la diseminación de *B. suis* en el hospedador²³⁵. Además, BepC podría participar en el eflujo de antimicrobianos producidos sólo *in vivo*, luego de estimulación por citoquinas generadas localmente por otras células en respuesta a la infección.

Los progresos realizados en la secuenciación de genomas completos de diversos microorganismos han permitido estudiar el origen de los sistemas de transporte bacterianos. Los transportadores de eflujo, por ejemplo, se hallan presentes en los genomas de bacterias patógenas así como también en los de no patógenas, en número comparable; por lo que es poco probable que estos sistemas hayan evolucionado recientemente en respuesta a una exposición extensiva a drogas²⁴⁷. Una posibilidad es que estos sistemas de transporte cumplan un rol fisiológico importante en la expulsión de sustancias tóxicas generadas por el propio metabolismo. Los resultados descritos en el presente trabajo sugieren que, dentro de la familia *Rhizobiaceae*, las proteínas de la familia TolC tendrían algún rol fisiológico no descrito, que sería coherente con la idea anterior. Por otro lado, se confirmó que estas proteínas (específicamente BepC de *B. suis*) pueden cumplir funciones clásicas de transporte como lo es el eflujo de drogas.

El estudio de los sistemas de transporte (ya sea secreción de proteínas o eflujo de compuestos tóxicos) es de gran relevancia, ya que su discernimiento no sólo va a permitir usarlos como posibles blancos para combatir bacterias patógenas, sino también para avanzar en el conocimiento de la fisiología bacteriana. En cuanto a los sistemas de eflujo aún existen muchas preguntas pendientes: ¿cuál es el rol fisiológico natural de las bombas de eflujo? ¿Sirven para proteger a la célula de compuestos tóxicos exógenos y endógenos o tiene otros sustratos fisiológicos relevantes y sólo transportan compuestos tóxicos fortuita u oportunísticamente? Si son tan promiscuos a la hora de expulsar toxinas, drogas y antimicrobianos, estructuralmente tan diferentes, ¿por qué coexisten en un mismo genoma tantos sistemas de multiresistencia?

Adhesión

En los capítulos II y III de esta tesis nos hemos abocado a discernir cuales son los factores de *Brucella* que promueven la adhesión celular y la invasión a las células del hospedador. Basándonos en los genomas^{4, 13, 43} y utilizando distintas estrategias genéticas, hemos estudiado factores extracelulares que pueden potencialmente influenciar la adherencia de *Brucella* spp. a las células del hospedador, a otras superficies como la matriz extracelular o entre las mismas bacterias.

Phage Display

La primera estrategia para llevar a cabo este objetivo fue construir una biblioteca de *display* en fagos; a partir de ella se seleccionaron las partículas de fagos que expresaban en superficie potenciales moléculas de adhesión a dos ligandos seleccionados. Se empleó el método de selección por afinidad denominado panning, en el que los fagos son enfrentados al ligando inmovilizado en sucesivas rondas. Como fruto del proceso de selección se obtuvieron cuatro candidatos capaces de unirse a los ligandos elegidos, que fueron denominados BpcA, BpcB, BpcC (por *Brucella* *phage* *display* *candidate*) y BmaC (por *Brucella* *monomeric* *autotransporter*). BpcA, BpcB y BmaC se obtuvieron empleando como ligando seleccionado a la proteína de matriz extracelular fibronectina; mientras que BpcC se obtuvo con fetuína. La interacción específica de cada fago con su ligando fue confirmada por ELISA y por panning, empleando stocks purificados a partir de un único fago. Se compararon afinidades a fibronectina/fetuína contra afinidad a BSA u otros ligandos no relacionados. En todos los casos los fagos exhibieron una marcada “preferencia” por el ligando que se empleó para seleccionarlos.

Los cuatro péptidos candidatos podrían estar involucrados en procesos de adhesión (ver tabla 3, en cap II). BpcA es una proteína hipotética codificada en el genoma de *B. suis*. En otras especies de *Brucella* como *B. abortus* y *B. canis* existen homólogos al gen *bpcA* de alta identidad (entre 99 y 100 %), en otras especies como *B. melitensis* la identidad es menor (menos de 95 %), mientras que en *B. ovis* el gen está ausente. Situaciones similares se cumplen para los otros candidatos: BpcB posee un homólogo de alta identidad en *B. canis*, mientras que en *B. melitensis* y *B. abortus* la identidad es menor. En *B. ovis* el gen tiene un tamaño mucho mayor, pero una zona comparte una identidad de 98 % con *bpcB*. BpcC posee homólogos de identidad media en *B. canis* y *B. melitensis*. En *B. abortus* y *B. ovis* el gen está ausente. Como vimos BmaC es un autotransportador de tipo I. Esta proteína es exclusiva de *B. suis*; en otras especies como *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis* existen homólogos de identidad media que cuentan con una organización de dominios diferente (incluso algunos dominios están ausentes). En *B. canis* el gen está ausente. Es llamativo que en estas zonas del genoma la variabilidad observada entre especies sea mucho más alta que la variabilidad promedio; recordemos que la comparación de los genomas de las distintas especies del género *Brucella* secuenciados hasta el momento muestra una conservación de más del 98%⁴⁴ entre ellos. También es muy llamativo que algunos de estos genes estén completamente ausentes en algunas de las especies del género.

Se observó que, si bien tres de los candidatos son capaces de interactuar con el ligando fibronectina, los péptidos presentados en la superficie de los fagos no poseen entre ellos un porcentaje de identidad significativo, por lo que no podemos hablar de que exista en *B. suis* un dominio de binding común a fibronectina, como sucede en otros patógenos como *Staphylococcus* spp.^{248, 249} o *Streptococcus* spp.^{250, 251}. Cabe destacar que se empleó a la molécula entera de fibronectina como ligando inmovilizado, por lo que es posible que cada candidato interactúe con zonas distintas de la proteína²⁵². Entre las proteínas que componen a la matriz extracelular, observamos que *Brucella* “prefiere” unirse a la fibronectina (ver fig.2). Entre las interacciones bacteria-fibronectina conocidas, algunas son de tipo proteína-proteína y otras proteína-carbohidrato, e involucran diferentes dominios de la molécula²⁵³, por lo que es probable que exista más de un mecanismo de interacción con esta proteína.

Fig.2: unión de *Brucella* a distintas proteínas de la matriz extracelular (ME). Se cuantificó la unión de *Brucella* a distintas proteínas de la ME inmovilizadas por ELISA. Se registró una mayor adhesión a la glicoproteína Fibronectina. Tomado de J.A. Girón *et al.* 2004

En el año 2006 fue identificada la adhesina SP41 en *Brucella abortus*⁷¹; esta proteína fue capaz de unirse a moléculas de la matriz extracelular y promover la entrada de *B. abortus* a la célula. SP41 no fue seleccionada en los ensayos de *panning* (los clones secuenciados no portaban en sus insertos al gen *upgB* ni a ninguna de sus porciones), a pesar de que muy posiblemente sea capaz de interactuar con residuos de ácido siálico y con fibronectina. Una explicación posible a porque SP41 no fue seleccionada en los *pannings* podría ser que los fagos que la expresan en superficie fueron desplazados por las interacciones más fuertes de otros fagos (como BpcA o BmaC) con los ligandos elegidos. Sustenta esta idea el hecho de que las mutantes en el gen *upgB* aún son capaces de adherirse a los tejidos del hospedador⁷¹, quedando claro que existen otros genes de *Brucella* que codifican moléculas de adhesión capaces de suplir su ausencia o, alternativamente, que también contribuyen a la adhesión/invasión en forma simultánea.

Empleando a los cuatro candidatos se evaluó *ex vivo*, en células HeLa, la capacidad de estos fagos de afectar la interacción de *Brucella* con la célula hospedadora. Se observó que algunos de los fagos fueron capaces de bloquear parcialmente la infección y otros no. BpcC dio recuentos muy similares a los del control, indicando que este fago no interfirió en la interacción bacterias-células. En cambio, BpcA, B y BmaC mostraron ser capaces de alterar esta interacción en distintas medidas, siendo BmaC el que produjo un bloqueo más eficiente (2 órdenes de magnitud). Esto podría indicar que los fagos estarían ocupando sitios indispensables para la interacción de la bacteria con la célula. Es muy común en este tipo de experimentos emplear anticuerpos o proteínas recombinantes para bloquear la interacción de los microorganismos patogénicos con su hospedador; el uso de fagos recombinantes es novedoso, esta tesis es la primera descripción en la que se usan fagos para inhibir la interacción entre una bacteria y su hospedador. Al momento existen sólo algunos ejemplos en los que se emplearon fagos recombinantes para bloquear la infección de ciertos virus²⁵⁴; por lo que esta podría considerarse una nueva aplicación de la técnica.

La falta de bloqueo por parte de BpcC impulsó la puesta a prueba de una hipótesis: en principio, este fago podría unirse a la fetuína por interacción de la fusión con los residuos de ácido siálico que cubren a la proteína. Pero también era posible que los fagos interaccionasen con la porción proteica de la fetuína. Se determinó que BpcC se une a la parte proteica de la fetuína, y no con sus residuos de ácido siálico. Por este motivo, este candidato dejó de ser relevante en este proyecto.

Empleando ensayos de infección como los anteriores se demostró que el fago recombinante que porta la fusión a BmaC puede bloquear la unión de *B. suis* a células epiteliales HeLa de una manera dosis-dependiente. También se observó, mediante ensayos de inmunofluorescencia, que los fagos recombinantes son capaces de unirse a la superficie celular. Si bien toda la superficie de las células se vio tapizada, también se observaron pequeños grumos que se marcaron intensamente. En las co-inoculaciones de bacterias y fagos se observaron nuevamente fagos unidos a las células y muy pocas bacterias; es posible que los fagos hayan desplazado a las bacterias, impidiendo su adhesión a las células. Los patrones de adhesión de los fagos fueron similares a los obtenidos por unión de un anticuerpo comercial anti-fibronectina a las células. Parece factible entonces que los fagos-BmaC se unan a la célula a través de las moléculas de fibronectina y, de esta forma, bloqueen el acceso de *Brucella* a sus sitios de adhesión.

Cabe destacar que tanto en estos experimentos de microscopía, como en los ensayos de bloqueo de la infección, los resultados presentan diferencias más marcadas que las obtenidas por otros autores empleando anticuerpos. Por ejemplo, Castañeda-Roldán y col. emplearon anticuerpos policlonales anti-SP41 para bloquear la adhesión/invasión de *B. suis* a células HeLa, obteniendo diferencias máximas menores a un orden de magnitud⁷¹.

En resumen, empleando la técnica de *phage display* identificamos tres proteínas que probablemente estén involucradas a la adherencia o invasión de células epiteliales. De estas tres proteínas, BmaC fue el candidato más relevante, por lo que se continuó con el estudio de este candidato. Como fue comentado en la sección Resultados, los enfoques empleados para la caracterización del rol de BmaC fueron los mismos que se utilizaron en el estudio de los otros dos autotransportadores de tipo I de *B. suis*. Los

resultados obtenidos con esta proteína se discuten más adelante. En retrospectiva, consideramos que la estrategia de *phage display* fue útil, primero para demostrar que existen diversas posibles moléculas de adhesión de *B. suis*, y luego para identificarlas.

Autotransportadores

Como segunda estrategia para estudiar los mecanismos de adhesión de *B. suis* se decidió hacer un análisis mutacional de genes blanco. Uno de estos genes es un autotransportador de tipo I (AT1), denominado *bmaC* (por *Brucella monomeric autotransporter*) con afinidad a fibronectina, que estaría involucrado en la interacción de *B. suis* a la célula hospedadora. Este gen fue aislado a partir de la biblioteca de *display* en fagos. Estas evidencias y nuestro propio análisis *in silico* de esta familia de proteínas, refuerzan la hipótesis que los autotransportadores podrían ser factores que medien la adhesión e invasión a la célula hospedadora. Por lo tanto, los otros genes seleccionados para el análisis mutacional de genes blanco son los otros dos genes de la familia AT1 albergados en el genoma de *B. suis*. Estos dos genes fueron denominados *bmaA* y *bmaB*.

Es relevante señalar que en el genoma de *Brucella suis* se han anotado como posibles factores de virulencia tres hemolisinas (pertenecientes a distintas familias), y diversas invasinas y adhesinas⁴³, que se espera tengan un destino extracelular. Como ya ha sido discutido previamente, *Brucella* parece no secretar cantidades detectables de proteínas vía sistemas de secreción de tipo I; y los sustratos del sistema de secreción de tipo IV descrito no han sido identificados aún. Estas observaciones son otras razones que apoyan la idea de que los autotransportadores (sistemas de secreción de tipo V) son los blancos ideales para análisis mutacionales, ya que sus propiedades de transporte aseguran su localización en la membrana externa de la bacteria, o en el medio extracelular.

En el capítulo III de la sección Resultados se determinó que en el genoma de *B. suis* están codificadas al menos once proteínas cuya función, por predicciones bioinformáticas, podría ser la de adhesinas. Además, a partir de los resultados obtenidos en el capítulo II, podemos asegurar que existen otras moléculas de adhesión que han sido categorizadas como “proteínas hipotéticas” o “proteínas hipotéticas conservadas” en la anotación de los genomas, porque no poseen identidad significativa con otras moléculas de adhesión caracterizadas. Al analizar la conservación de los candidatos surgidos de la biblioteca entre las distintas especies de *Brucella* observamos que en esas zonas del genoma la variabilidad observada entre especies era mucho más alta que la variabilidad promedio (al analizar el genoma completo). Esta situación vuelve a repetirse, y las diferencias se incrementan cuando se comparan las regiones de los genomas que codifican a los autotransportadores: el gen *bmaA* (BRA0173 según TIGR) no posee homólogos de alta identidad en las otras especies de *Brucella*. Los genes correspondientes de *B. abortus* y *B. ovis* cuentan con porcentajes de identidad de 40 y 55 % respectivamente. En *B. canis* este gen está ausente y en *B. melitensis* hay un homólogo de peso molecular mucho mayor, que también presenta zonas de homología al gen *bmaC* (en esta especie el gen parece haber sufrido varias recombinaciones). El gen *bmaB* (BR2013 según TIGR) tampoco posee

homólogos de alta identidad en las otras especies de *Brucella*. En *B. abortus* y *B. ovis* los homólogos presentan identidades de 42 y 41 % respectivamente, mientras que en *B. canis* el gen también está ausente. En *B. melitensis* hay un homólogo de tamaño significativamente menor. Analizando todas estas evidencias juntas, cabe preguntarse si la presencia o ausencia de estas moléculas de adhesión (o su composición en dominios) podría modular el tipo de tejidos colonizado, condicionando así la preferencia de hospedador. Si esto fuese así, estas proteínas podrían adquirir carácter taxonómico, ayudando a la caracterización de cada especie.

Para la obtención de las mutantes en cada uno de estos genes se utilizaron construcciones que permiten reemplazar la copia sana del gen por una interrumpida por un *cassette* de resistencia (mutantes por inserción, *bmaA* y *bmaB*), o por una copia de esa zona del genoma en la que el gen de interés ha sido eliminado (mutantes por delección, *bmaC*). En todos los casos se obtuvieron cepas dobles recombinantes que incorporaron la construcción en su genoma. Es importante recalcar que diversas instituciones internacionales sugieren que los *cassettes* de resistencia sean reemplazados por otros marcadores de selección, o que se empleen mutantes por delección, cuando se trabaja con microorganismos patogénicos que podrían representar algún riesgo para la salud de los investigadores o personal expuesto^{255, 256}. Por este motivo planeamos modificar las cepas generadas en esta tesis para eliminar las resistencias introducidas antes de continuar con nuevos experimentos que las involucren.

El fenotipo de *bmaC* indica que BmaC interviene en la adherencia a los tejidos del hospedador a ser colonizado. En este caso, las interacciones entre bacterias y con soportes abióticos no estuvieron alteradas. En los ensayos de adhesión e invasión a células HeLa observamos que la mutante *bmaC* presentó una marcada reducción en su capacidad de colonización de este modelo celular, respecto del control silvestre. En los ensayos de competencia se observó que las diferencias en los recuentos entre las cepas se incrementaron aún más, especialmente en la invasión (en la que no se recuperaron colonias de la cepa mutante). Se podría especular que en estos ensayos las bacterias deben competir por los sitios de unión a la célula y que, de existir una cepa que interacciona deficientemente con la célula, ésta se vea muy perjudicada en la competencia y, por lo tanto, las diferencias observadas se incrementen. Algunos autores sugieren que las proteínas de la superficie bacteriana involucradas en la adherencia a los sitios de unión celulares son distintas a las que gatillan la invasión⁷¹. En este caso BmaC parece intervenir en ambos procesos, aunque es posible argumentar que si una cepa se adhiere menos invadirá menos, consecuentemente. Los experimentos realizados hasta el momento con esta cepa no permiten discernir estrictamente si BmaC posee un rol en la invasión propiamente dicha. A pesar de que BmaC es un factor necesario para lograr una adhesión/invasión eficiente a las células del hospedador, la ausencia de esta proteína no afecta la supervivencia intracelular de la bacteria en los modelos utilizados, tal como fue demostrado en los experimentos de replicación intracelular.

En el año 2009, Viadas y col. emplearon microarreglos de ADN de *Brucella* para determinar perfiles globales de transcripción en bacterias del género²⁵⁷. El primer transcriptoma analizado fue el de *B. abortus*. En este estudio determinaron que el autotransportador homólogo a BmaC en *B. abortus*

(BAB2_1107) era “el gen menos expresado *in vitro* de todo el transcriptoma”²⁵⁷. Estos autores proponen que los genes de baja expresión *in vitro* podrían ser parte de vías metabólicas necesarias en el tipo de vida intracelular, o también factores de virulencia cuya expresión se activa en contacto con factores del hospedador. Al analizar la expresión de *bmaC* en *B. suis*, determinamos que el gen se expresa tanto *in vitro* como en medio condicionado; luego confirmamos que la proteína BmaC se halla presente en la membrana de *B. suis*. Las discrepancias encontradas en los perfiles de expresión de este gen pueden deberse a que la regulación de los genes es diferente en las dos especies. También se puede argumentar que, al haber adquirido diferencias de secuencia (que podrían modificar su función) estos dos genes ya no son comparables.

En general, los aislamientos lisos de *Brucella* son resistentes al suero²¹³. En muchas bacterias patógenas esta resistencia al suero está mediada por adhesinas capaces de unirse a reguladores del complemento y evitar la activación del mismo²¹⁴⁻²¹⁷. Se evaluó la posibilidad de que BmaC fuese capaz de cumplir este rol, y se determinó que la resistencia al suero de *B. suis* no es dependiente de BmaC, quedando claro que existen otras adhesinas o factores encargados de esta función.

El análisis de los fenotipos de las mutantes *bmaA* y *bmaB* demostró que las proteínas BmaA y BmaB también son adhesinas, que intervienen en las interacciones entre bacterias y en la adhesión de *B. suis* a ciertos soportes abióticos. Dado que ciertas adhesinas son responsables de la adherencia de las bacterias a distintos tipos celulares y, al mismo tiempo, poseen propiedades de auto-asociación, uno de los primeros fenotipos estudiados en las mutantes *bmaA* y *bmaB* fue el de autoagregación. En ambas mutantes se observó que las interacciones bacteria-bacteria están alteradas. Macroscópicamente se observó que las cepas mutantes son incapaces de sedimentar en los tiempos en los que lo hace la cepa silvestre y por microscopía se pudo determinar que la formación de agregados bacterianos está impedida. Curiosamente los fenotipos observados en ambas mutantes fueron muy similares. También se observó que en un cultivo mixto en el que se hallan juntas las dos mutantes se logró cierta “compactación” de las bacterias, que podría ser interpretada como una complementación en *trans*. En este cultivo mixto las funciones faltantes en una cepa podrían ser complementadas por la otra y viceversa. En base a estos resultados, se podría especular que existe una interacción de tipo BmaA-BmaB en la superficie de estas células, y que las interacciones de tipo BmaA-BmaA (o BmaB-BmaB) no son relevantes en la autoagregación. En la bibliografía existen ejemplos de ambos tipos de interacción mediando la autoagregación; en particular las uniones AidA-Ag43 (dos adhesinas-AT de *E. coli*) han sido muy bien caracterizadas¹⁶². En este punto es importante discutir sobre la relevancia que podría tener la formación de agregados (asi como la formación de biofilms) en *Brucella*. La agregación es un comportamiento usual en estas bacterias cuando se las cultiva en laboratorio²²², pero existen muy pocas evidencias que confirmen que hay un correlato *in vivo* de este comportamiento. Castañeda-Roldán y col. demostraron por microscopía electrónica que *B. abortus* forma agregados similares a microcolonias sobre las células epiteliales a infectar⁶⁹, y otros autores han sugerido que la formación de agregados podría evitar la desecación de las bacterias en los cortos períodos que sobreviven fuera del hospedador²⁵⁸. Inesperadamente, en los ensayos con células HeLa, o con células de epitelio alveolar, las

mutantes *bmaA* y *bmaB* exhibieron recuentos totales de bacterias asociadas a las células mayores que la cepa silvestre. Esta diferencia no se observó en cultivos de osteoblastos, en los que los recuentos fueron similares para todas las cepas. En ensayos de replicación intracelular se determinó que no existen diferencias en la supervivencia intracelular entre las cepas silvestre y mutantes en ninguno de los modelos empleados. Es decir, que la mayor adhesión/invasión no prospera en un mayor recuento a tiempos posteriores post-infección. Baldi y col. describieron recientemente que las cepas rugosas de *Brucella* presentan números mayores de bacterias adherentes e intracelulares en ciertos tejidos epiteliales, pero que sólo las cepas lisas exhiben una replicación intracelular eficiente²⁰. Si las mutantes hubiesen sufrido un cambio de fase (disociación) los fenotipos de mayor adhesión/invasión, sin afectar la replicación intracelular podrían ser explicados. Sin embargo, este fenotipo no puede deberse a una conversión al fenotipo rugoso porque ambas mutantes continúan siendo lisas, tal como fue confirmado por tests de aglutinación por acriflavina. Otras mutantes en una proteína de membrana de *B. abortus* exhibieron un comportamiento “rough-like” ocasionado por alteraciones en su LPS, a pesar de que seguían siendo lisas en los tests de aglutinación²¹². Este tipo de conversión no puede ser descartado en las mutantes *bmaA* y *bmaB*. Otra posible explicación es que la mutación en uno de estos genes ocasione una desregulación en la expresión de otras proteínas de membrana externa, y que estas sean responsables de la mayor adherencia de la cepa mutante; sin embargo, sería necesario que las mutaciones en *bmaA* y *bmaB* ocasionen fenómenos de este tipo. También es factible que ambos autotransportadores estén co-regulados, y que la ausencia de uno dispare la expresión del otro. Se han descrito ejemplos de regulación cruzada de este tipo en otros patógenos¹⁶⁹. Por último, mostramos que en estas cepas mutantes la formación de agregados está inhibida, por lo que también es posible que algún mecanismo que usualmente es controlado por la cantidad de bacterias presentes esté desregulado; o más simplemente, es posible que la falta de agregación ocasione un artefacto en los recuentos de unidades formadoras de colonias. Los experimentos realizados hasta el momento no permiten confirmar ni descartar ninguna de estas posibilidades.

En estas adhesinas también se evaluó su capacidad de reclutar a factores del complemento para incrementar la resistencia a suero. Al igual que lo observado para BmaC, los resultados obtenidos indican que BmaA y BmaB tampoco cumplirían una función en la modulación de las defensas del hospedador.

Bandara y col. estudiaron al autotransportador BmaB (al que denominaron OmaA) como un posible blanco para vacunas contra *Brucella*. Sin embargo, no analizaron ninguna de sus propiedades como adhesina. En su análisis determinaron que la mutante en este gen fue eliminada del bazo de ratones más rápidamente que la cepa parental, sugiriendo que esta proteína tendría también una función en la etapa crónica de la infección²⁵⁹.

Por último, y como tercera estrategia para estudiar el rol de los AT1 de *B. suis* en la interacción de la bacteria con la célula hospedadora, se realizaron experimentos de expresión heteróloga. En estos experimentos una de las posibles adhesinas de *B. suis* fue expresada sobre la superficie de una cepa de

E. coli (derivada de K12) incapaz de invadir o adherirse a células eucariotas. Esto fue posible gracias la propiedad de estas proteínas de promover su propia secreción. Se observó que BmaA le confiere a *E. coli* no adhesiva la capacidad de adherirse e invadir células HeLa. Esta observación sugiere que esta proteína podría participar en la interacción de la bacteria con la célula eucariota, ya que ella sola facilita la colonización de dicho modelo celular. En los ensayos de autoagregación y sedimentación realizados con esta cepa se observó que *E. coli bmaA+* sedimenta a la misma velocidad que el control; esto podría indicar que las interacciones responsables de la autoagregación en *B. suis* no son dependientes de un único tipo de proteína interaccionando con otras moléculas idénticas (BmaA-BmaA), sino que las uniones entre bacterias involucran al menos dos tipos de proteínas distintas (BmaA-BmaB?). En este caso, las hipótesis que pueden surgir de este experimento son coherentes con lo discutido para los experimentos con cultivos mixtos de las mutantes *bmaA* y *bmaB*, en los que también se sugería que las moléculas interaccionantes serían distintas. También se podría especular que la membrana externa de *E. coli* es muy diferente a la de *B. suis*, y que las interacciones que se pueden dar en un ambiente están vedadas en el otro; o que las interacciones BmaA-BmaA son relevantes en la autoagregación de *B. suis*, pero necesitan estar acompañadas de otras interacciones hasta el momento desconocidas.

Uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar factores extracelulares que puedan potencialmente influenciar la adherencia de *Brucella* spp. a las células del hospedador, a otras superficies como la matriz extracelular o entre las mismas bacterias. Los resultados obtenidos contestan en gran parte algunas las preguntas subyacentes: existen proteínas de *Brucella* capaces de interaccionar con la matriz extracelular eucariota y/o la superficie de la célula hospedadora? Cuáles son estas proteínas?. Por otra parte, se determinó que algunas de estas adhesinas también están involucradas en las interacciones entre bacterias, por lo que su rol como adhesinas quedó confirmado. Los resultados obtenidos conforman la primera caracterización de autotransportadores de *B. suis* involucrados en la adhesión a los tejidos del hospedador

Bibliografía

1. Boschirolì, M. L., Foulongne, V. & O'Callaghan, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 4, 58-64 (2001).
2. Corbel, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3, 213-21 (1997).
3. Georgios Pappas, M. D., Nikolaos Akritidis, M.D., Mile Bosilkovski, M.D., and Epameinondas Tsianos, M.D. Brucellosis. *New England Journal of Medicine* Volume 352:2325-2336 (2005).
4. Chain, P. S. et al. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun* 73, 8353-61 (2005).
5. Young, E. J. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 21, 283-9; quiz 290 (1995).
6. Lucero, N. E., Escobar, G. I., Ayala, S. M. & Jacob, N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol* 54, 457-61 (2005).
7. Sohn, A. H. et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis* 9, 485-8 (2003).
8. Palanduz, A., Palanduz, S., Guler, K. & Guler, N. Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. *Int J Infect Dis* 4, 55-6 (2000).
9. Giannacopoulos, I., Eliopoulou, M. I., Ziambaras, T. & Papanastasiou, D. A. Transplacentally transmitted congenital brucellosis due to *Brucella abortus*. *J Infect* 45, 209-10 (2002).
10. Mesner, O. et al. The many faces of human-to-human transmission of brucellosis: congenital infection and outbreak of nosocomial disease related to an unrecognized clinical case. *Clin Infect Dis* 45, e135-40 (2007).
11. Ruben, B., Band, J. D., Wong, P. & Colville, J. Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Lancet* 337, 14-5 (1991).
12. Manddell, G. *Infectología* (Editorial Medica Panamericana, Madrid, 1995).
13. DelVecchio, V. G. et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 443-8 (2002).
14. Baldwin, C. L. & Winter, A. J. Macrophages and *Brucella*. *Immunol Ser* 60, 363-80 (1994).
15. Dettleux, P. G., Deyoe, B. L. & Cheville, N. F. Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy. *Vet Pathol* 27, 317-28 (1990).
16. Dettleux, P. G., Deyoe, B. L. & Cheville, N. F. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect Immun* 58, 2320-8 (1990).
17. Celli, J. & Gorvel, J. P. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol* 7, 93-7 (2004).
18. Billard, E., Cazevielle, C., Dornand, J. & Gross, A. High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Infect Immun* 73, 8418-24 (2005).
19. Billard, E., Dornand, J. & Gross, A. Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells. *Infect Immun* 75, 5916-23 (2007).
20. Ferrero, M. C., Fossati, C. A. & Baldi, P. C. Smooth *Brucella* strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death. *Microbes Infect* 11, 476-83 (2009).
21. Delpino, M. V., Fossati, C. A. & Baldi, P. C. Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp. *Infect Immun* 77, 984-95 (2009).
22. Garcia-Rodriguez, J. A., Garcia Sanchez, J. E. & Trujillano, I. Lack of effective bactericidal activity of new quinolones against *Brucella* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 756-9 (1991).
23. Bannatyne, R. M., Rich, M. & Memish, Z. A. Co-trimoxazole resistant *Brucella*. *J Trop Pediatr* 47, 60 (2001).

24. Lucero, N. E. (A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán", 2004).
25. Solera, J., Beato, J. L., Martínez-Alfaro, E., Segura, J. C. & de Tomas, E. Azithromycin and gentamicin therapy for the treatment of humans with brucellosis. *Clin Infect Dis* 32, 506-9 (2001).
26. Kohler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M. & Liautard, J. P. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *Trends Microbiol* 11, 215-9 (2003).
27. Roop, R. M., 2nd, Bellaire, B. H., Valderas, M. W. & Cardelli, J. A. Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol Microbiol* 52, 621-30 (2004).
28. Halling, S. M. et al. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* 187, 2715-26 (2005).
29. Kaufmann, A. F., Meltzer, M. I. & Schmid, G. P. The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? *Emerg Infect Dis* 3, 83-94 (1997).
30. DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G. & Mújer, C. V. The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* 90, 587-92 (2002).
31. Cameron, H. S. & Meyer, M. E. Metabolic studies on *Brucella neotomae* (Stoener and Lackman). *J Bacteriol* 76, 546-8 (1958).
32. Jahans, K. L., Foster, G. & Broughton, E. S. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* 57, 373-82 (1997).
33. Szyfres, P. N. A. B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales (Organización Panamericana de la Salud; OMS, 2001).
34. Sreevatsan, S. et al. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Clin Microbiol* 38, 2602-10 (2000).
35. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. & Tsianos, E. V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 6, 91-9 (2006).
36. OMS. in *Boletín Epidemiológico* (2000).
37. Liautard, J. P., Gross, A., Dornand, J. & Kohler, S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia* 12, 197-206 (1996).
38. Sangari, F. J. & Aguero, J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. *Microbiologia* 12, 207-18 (1996).
39. Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J. L. & Gorvel, J. P. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun* 66, 2387-92 (1998).
40. Arenas, G. N., Staskevich, A. S., Aballay, A. & Mayorga, L. S. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* 68, 4255-63 (2000).
41. Moreno, E., and I. Moriyón. *The genus Brucella* (2001).
42. Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., O'Callaghan, D. & Ramuz, M. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* 27, 99-106 (1998).
43. Paulsen, I. T. et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13148-53 (2002).
44. Rajashekara, G., Glasner, J. D., Glover, D. A. & Splitter, G. A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J Bacteriol* 186, 5040-51 (2004).
45. Gandara, B., Merino, A. L., Rogel, M. A. & Martínez-Romero, E. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 39, 235-40 (2001).
46. Verger, J. M. M. G. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriology* 35, 292-295 (1985).
47. Gibby, I. W. & Gibby, A. M. Host-Parasite Relationships with *Brucella Neotomae*. *J Bacteriol* 89, 9-16 (1965).

48. Buddle, M. B. Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J Hyg (Lond)* 54, 351-64 (1956).
49. Jones, L. M., Merz, G. S. & Wilson, J. B. Phage typing reactions on *Brucella* species. *Appl Microbiol* 16, 1179-90 (1968).
50. Morisset, R. & Spink, W. W. Epidemic canine brucellosis due to a new species, *brucella canis*. *Lancet* 2, 1000-2 (1969).
51. Foster, G., Jahans, K. L., Reid, R. J. & Ross, H. M. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Vet Rec* 138, 583-6 (1996).
52. Scholz, H. C. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 375-82 (2008).
53. O'Callaghan, D. et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* 33, 1210-20 (1999).
54. Comerchi, D. J., Martinez-Lorenzo, M. J., Sieira, R., Gorvel, J. P. & Ugalde, R. A. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* 3, 159-68 (2001).
55. Marchesini, M. I., Ugalde, J. E., Czibener, C., Comerchi, D. J. & Ugalde, R. A. N-terminal-capturing screening system for the isolation of *Brucella abortus* genes encoding surface exposed and secreted proteins. *Microb Pathog* 37, 95-105 (2004).
56. Zorreguieta, A. & Ugalde, R. A. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in beta-D(1-2) glucan synthesis. *J Bacteriol* 167, 947-51 (1986).
57. Ugalde, R. A. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes Infect* 1, 1211-9 (1999).
58. B. Arellano-Reynoso, I. M., R. Ugalde et al. Cyclic bold beta-1,2-glucan is a *brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature Immunology*, 618-625 (2005).
59. Briones, G. et al. *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun* 69, 4528-35 (2001).
60. Guzman-Verri, C. et al. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12375-80 (2002).
61. Sola-Landa, A. et al. 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, 125-38 (1998).
62. Charles, T. C. & Nester, E. W. A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 175, 6614-25 (1993).
63. Cheng, H. P. & Walker, G. C. Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J Bacteriol* 180, 20-6 (1998).
64. Fernandez-Prada, C. M. et al. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun* 71, 2110-9 (2003).
65. Ugalde, J. E., Czibener, C., Feldman, M. F. & Ugalde, R. A. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infect Immun* 68, 5716-23 (2000).
66. Porte, F., Liautard, J. P. & Kohler, S. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* 67, 4041-7 (1999).
67. Wanke, M. M. Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci* 82-83, 195-207 (2004).
68. Spera, J. M., Ugalde, J. E., Mucci, J., Comerchi, D. J. & Ugalde, R. A. A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16514-9 (2006).

69. Castaneda-Roldan, E. I. et al. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol* 6, 435-45 (2004).
70. del, C. R.-G. R., Castaneda-Roldan, E. I., Giono-Cerezo, S. & Giron, J. A. *Brucella* sp. bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS Microbiol Lett* 213, 219-24 (2002).
71. Castaneda-Roldan, E. I. et al. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell Microbiol* 8, 1877-87 (2006).
72. Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K. & Shirahata, T. Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* 4, 341-55 (2002).
73. Celli, J. et al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 198, 545-56 (2003).
74. Pizarro-Cerda, J. et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 66, 5711-24 (1998).
75. Braibant, M., Guilloteau, L. & Zygmunt, M. S. Functional characterization of *Brucella melitensis* NorMI, an efflux pump belonging to the multidrug and toxic compound extrusion family. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3050-3 (2002).
76. Posadas, D. M. et al. The TolC homologue of *Brucella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence. *Infect Immun* 75, 379-89 (2007).
77. Martin, F. A. et al. Interplay between two RND systems mediating antimicrobial resistance in *Brucella suis*. *J Bacteriol* 191, 2530-40 (2009).
78. Arthur, M., Reynolds, P. & Courvalin, P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol* 4, 401-7 (1996).
79. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 593-656 (2003).
80. Riordan, J. R. & Ling, V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J Biol Chem* 254, 12701-5 (1979).
81. Kartner, N., Riordan, J. R. & Ling, V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221, 1285-8 (1983).
82. Doige, C. A. & Ames, G. F. ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol* 47, 291-319 (1993).
83. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* 1, 945-51 (1982).
84. Holland, I. B. & Blight, M. A. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 293, 381-99 (1999).
85. Poelarends, G. J. et al. An ABC-type multidrug transporter of *Lactococcus lactis* possesses an exceptionally broad substrate specificity. *Drug Resist Updat* 3, 330-334 (2000).
86. Poelarends, G. J., Mazurkiewicz, P. & Konings, W. N. Multidrug transporters and antibiotic resistance in *Lactococcus lactis*. *Biochim Biophys Acta* 1555, 1-7 (2002).
87. Huda, N. et al. Molecular cloning and characterization of an ABC multidrug efflux pump, VcaM, in Non-O1 *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2413-7 (2003).
88. Kobayashi, N., Nishino, K. & Yamaguchi, A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 5639-44 (2001).
89. Zhou, Z., White, K. A., Polissi, A., Georgopoulos, C. & Raetz, C. R. Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. *J Biol Chem* 273, 12466-75 (1998).

90. Lubelski, J., Konings, W. N. & Driessen, A. J. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 463-76 (2007).
91. Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N. & Poole, K. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 65-71 (1998).
92. Nies, D. H. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid* 27, 17-28 (1992).
93. Saier, M. H., Jr., Tam, R., Reizer, A. & Reizer, J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* 11, 841-7 (1994).
94. Ma, D. et al. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175, 6299-313 (1993).
95. Baranova, N. & Nikaido, H. The *baeSR* two-component regulatory system activates transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol* 184, 4168-76 (2002).
96. Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. & Yamaguchi, A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419, 587-93 (2002).
97. Hagman, K. E. et al. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology* 141 (Pt 3), 611-22 (1995).
98. Lee, E. H. & Shafer, W. M. The *farAB*-encoded efflux pump mediates resistance of gonococci to long-chained antibacterial fatty acids. *Mol Microbiol* 33, 839-45 (1999).
99. Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J. & Nishino, T. The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2567-9 (1995).
100. Kohler, T. et al. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 23, 345-54 (1997).
101. Palumbo, J. D., Kado, C. I. & Phillips, D. A. An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J Bacteriol* 180, 3107-13 (1998).
102. Burse, A., Weingart, H. & Ullrich, M. S. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 43-54 (2004).
103. Saier, M. H., Jr. & Paulsen, I. T. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol* 12, 205-13 (2001).
104. Tate, C. G., Kunji, E. R., Lebendiker, M. & Schuldiner, S. The projection structure of EmrE, a proton-linked multidrug transporter from *Escherichia coli*, at 7 Å resolution. *Embo J* 20, 77-81 (2001).
105. Littlejohn, T. G., DiBerardino, D., Messerotti, L. J., Spiers, S. J. & Skurray, R. A. Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene* 101, 59-66 (1991).
106. Schuldiner, S. et al. Small is mighty: EmrE, a multidrug transporter as an experimental paradigm. *News Physiol Sci* 16, 130-4 (2001).
107. Schuldiner, S. et al. Precious things come in little packages. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3, 155-62 (2001).
108. Yerushalmi, H., Lebendiker, M. & Schuldiner, S. EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *J Biol Chem* 270, 6856-63 (1995).
109. Brown, M. H., Paulsen, I. T. & Skurray, R. A. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol* 31, 394-5 (1999).

110. Morita, Y., Kataoka, A., Shiota, S., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. NorM of vibrio parahaemolyticus is an Na(+)-driven multidrug efflux pump. *J Bacteriol* 182, 6694-7 (2000).
111. Morita, Y. et al. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1778-82 (1998).
112. Helling, R. B. et al. Toxic waste disposal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184, 3699-703 (2002).
113. Paulsen, I. T., Park, J. H., Choi, P. S. & Saier, M. H., Jr. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 156, 1-8 (1997).
114. Ferhat, M. et al. The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion. *PLoS One* 4, e7732 (2009).
115. Gil, H. et al. Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12897-902 (2006).
116. Young, J. P. et al. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* 7, R34 (2006).
117. Aono, R., Tsukagoshi, N. & Yamamoto, M. Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 180, 938-44 (1998).
118. Wandersman, C. & Delepelaire, P. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4776-80 (1990).
119. Koronakis, V. TolC--the bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS Lett* 555, 66-71 (2003).
120. Fralick, J. A. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178, 5803-5 (1996).
121. Lomovskaya, O. & Lewis, K. Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8938-42 (1992).
122. Vakharia, H., German, G. J. & Misra, R. Isolation and characterization of *Escherichia coli* tolC mutants defective in secreting enzymatically active alpha-hemolysin. *J Bacteriol* 183, 6908-16 (2001).
123. Nagel de Zwaig, R. & Luria, S. E. Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 94, 1112-23 (1967).
124. Lazdunski, C. J. et al. Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 180, 4993-5002 (1998).
125. Pilsl, H. & Braun, V. Novel colicin 10: assignment of four domains to TonB- and TolC-dependent uptake via the Tsx receptor and to pore formation. *Mol Microbiol* 16, 57-67 (1995).
126. Vetter, I. R. et al. Crystal structure of a colicin N fragment suggests a model for toxicity. *Structure* 6, 863-74 (1998).
127. Elkins, P., Bunker, A., Cramer, W. A. & Stauffacher, C. V. A mechanism for toxin insertion into membranes is suggested by the crystal structure of the channel-forming domain of colicin E1. *Structure* 5, 443-58 (1997).
128. German, G. J. & Misra, R. The TolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage. *J Mol Biol* 308, 579-85 (2001).
129. Hiraga, S. et al. Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J Bacteriol* 171, 1496-505 (1989).
130. Hendrickson, W. G. et al. Binding of the origin of replication of *Escherichia coli* to the outer membrane. *Cell* 30, 915-23 (1982).
131. Morona, R. & Reeves, P. The tolC locus of *Escherichia coli* affects the expression of three major outer membrane proteins. *J Bacteriol* 150, 1016-23 (1982).
132. Dorman, C. J., Lynch, A. S., Bhriain, N. N. & Higgins, C. F. DNA supercoiling in *Escherichia coli*: topA mutations can be suppressed by DNA amplifications involving the tolC locus. *Mol Microbiol* 3, 531-40 (1989).

133. Mackman, N., Nicaud, J. M., Gray, L. & Holland, I. B. Secretion of haemolysin by *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* 125, 159-81 (1986).
134. Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C. & Koronakis, V. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *Embo J* 17, 6487-96 (1998).
135. Andersen, C., Hughes, C. & Koronakis, V. Channel vision. Export and efflux through bacterial channel-tunnels. *EMBO Rep* 1, 313-8 (2000).
136. Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. & Hughes, C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914-9 (2000).
137. Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124, 715-27 (2006).
138. Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 6, 370-8 (1998).
139. Jose, J., Jahnig, F. & Meyer, T. F. Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* 18, 378-80 (1995).
140. Sijbrandi, R. et al. Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. *J Biol Chem* 278, 4654-9 (2003).
141. Henderson, I. R. & Nataro, J. P. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 69, 1231-43 (2001).
142. Miyazaki, H., Yanagida, N., Horinouchi, S. & Beppu, T. Characterization of the precursor of *Serratia marcescens* serine protease and COOH-terminal processing of the precursor during its excretion through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171, 6566-72 (1989).
143. Cover, T. L., Tummuru, M. K., Cao, P., Thompson, S. A. & Blaser, M. J. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 269, 10566-73 (1994).
144. Stein, M., Kenny, B., Stein, M. A. & Finlay, B. B. Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol* 178, 6546-54 (1996).
145. Oomen, C. J. et al. Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* 23, 1257-66 (2004).
146. van den Berg, B. Crystal structure of a full-length autotransporter. *J Mol Biol* 396, 627-33.
147. Barnard, T. J., Dautin, N., Lukacik, P., Bernstein, H. D. & Buchanan, S. K. Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1214-20 (2007).
148. Lattemann, C. T., Maurer, J., Gerland, E. & Meyer, T. F. Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J Bacteriol* 182, 3726-33 (2000).
149. Jain, S. et al. Polar localization of the autotransporter family of large bacterial virulence proteins. *J Bacteriol* 188, 4841-50 (2006).
150. Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Loch, C. & Jacob-Dubuisson, F. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *Embo J* 20, 5040-8 (2001).
151. Yen, M. R. et al. Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1562, 6-31 (2002).
152. Veiga, E., de Lorenzo, V. & Fernandez, L. A. Autotransporters as scaffolds for novel bacterial adhesins: surface properties of *Escherichia coli* cells displaying Jun/Fos dimerization domains. *J Bacteriol* 185, 5585-90 (2003).
153. Roggenkamp, A. et al. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* 185, 3735-44 (2003).

154. Loveless, B. J. & Saier, M. H., Jr. A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol Membr Biol* 14, 113-23 (1997).
155. Kim, K. P. et al. Adhesion characteristics of *Listeria* adhesion protein (LAP)-expressing *Escherichia coli* to Caco-2 cells and of recombinant LAP to eukaryotic receptor Hsp60 as examined in a surface plasmon resonance sensor. *FEMS Microbiol Lett* 256, 324-32 (2006).
156. Alamuri, P. & Mobley, H. L. A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. *Mol Microbiol* 68, 997-1017 (2008).
157. Sherlock, O., Vejborg, R. M. & Klemm, P. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect Immun* 73, 1954-63 (2005).
158. Lindenthal, C. & Elsinghorst, E. A. Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. *Infect Immun* 69, 52-7 (2001).
159. Elsinghorst, E. A. & Weitz, J. A. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* tib locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infect Immun* 62, 3463-71 (1994).
160. Berge, A., Kihlberg, B. M., Sjöholm, A. G. & Björck, L. Streptococcal protein H forms soluble complement-activating complexes with IgG, but inhibits complement activation by IgG-coated targets. *J Biol Chem* 272, 20774-81 (1997).
161. Ochiai, K., Kurita-Ochiai, T., Kamino, Y. & Ikeda, T. Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria. *J Med Microbiol* 39, 183-90 (1993).
162. Sherlock, O., Schembri, M. A., Reisner, A. & Klemm, P. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J Bacteriol* 186, 8058-65 (2004).
163. Henderson, I. R., Meehan, M. & Owen, P. Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* 149, 115-20 (1997).
164. Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F. & Jaeger, K. E. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J Bacteriol* 189, 6695-703 (2007).
165. Kingsley, R. A. et al. Fibronectin binding to the *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA autotransporter protein is inhibited by a monoclonal antibody recognizing the A3 repeat. *J Bacteriol* 186, 4931-9 (2004).
166. Kingsley, R. A., Keestra, A. M., de Zoete, M. R. & Baumler, A. J. The ShdA adhesin binds to the cationic cradle of the fibronectin 13FnIII repeat module: evidence for molecular mimicry of heparin binding. *Mol Microbiol* 52, 345-55 (2004).
167. Dorsey, C. W., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Weening, E. H. & Baumler, A. J. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* 57, 196-211 (2005).
168. Laarmann, S. & Schmidt, M. A. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology* 149, 1871-82 (2003).
169. Eitel, J. & Dersch, P. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasins is repressed. *Infect Immun* 70, 4880-91 (2002).
170. Leduc, I., Olsen, B. & Elkins, C. Localization of the domains of the *Haemophilus ducreyi* trimeric autotransporter DsrA involved in serum resistance and binding to the extracellular matrix proteins fibronectin and vitronectin. *Infect Immun* 77, 657-66 (2009).
171. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-7 (1985).
172. Webster, R. Filamentous phage biology. (ed. Barbas III, C. F., Burton, D.R., Scott, J.K. and Silverman, G.J.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001, pp. 1.1-1.37., 2001).

173. Smith, G. P. & Scott, J. K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 217, 228-57 (1993).
174. Scott, J. K. & Smith, G. P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249, 386-90 (1990).
175. Greenwood, J., Hunter, G. J. & Perham, R. N. Regulation of filamentous bacteriophage length by modification of electrostatic interactions between coat protein and DNA. *J Mol Biol* 217, 223-7 (1991).
176. Jacobsson, K., Rosander, A., Bjerketorp, J. & Frykberg, L. Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins. *Biol Proced Online* 5, 123-135 (2003).
177. Russel, M. Filamentous phage assembly. *Mol Microbiol* 5, 1607-13 (1991).
178. Russel, M., Linderoth, N. A. & Sali, A. Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme. *Gene* 192, 23-32 (1997).
179. Koivunen, E. et al. Inhibition of beta(2) integrin-mediated leukocyte cell adhesion by leucine-leucine-glycine motif-containing peptides. *J Cell Biol* 153, 905-16 (2001).
180. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 697-715 (1996).
181. Ruoslahti, E. Integrins. *J Clin Invest* 87, 1-5 (1991).
182. Cheng, X., Kay, B. K. & Juliano, R. L. Identification of a biologically significant DNA-binding peptide motif by use of a random phage display library. *Gene* 171, 1-8 (1996).
183. Matsubara, T., Ishikawa, D., Taki, T., Okahata, Y. & Sato, T. Selection of ganglioside GM1-binding peptides by using a phage library. *FEBS Lett* 456, 253-6 (1999).
184. Noda, K., Yamasaki, R., Hironaka, Y. & Kitagawa, A. Selection of peptides that bind to the core oligosaccharide of R-form LPS from a phage-displayed heptapeptide library. *FEMS Microbiol Lett* 205, 349-54 (2001).
185. Wang, S. et al. Peptides with selective affinity for carbon nanotubes. *Nat Mater* 2, 196-200 (2003).
186. O'Neil, K. T. & Hoess, R. H. Phage display: protein engineering by directed evolution. *Curr Opin Struct Biol* 5, 443-9 (1995).
187. Goodson, R. J., Doyle, M. V., Kaufman, S. E. & Rosenberg, S. High-affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7129-33 (1994).
188. Pasqualini, R. & Ruoslahti, E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 380, 364-6 (1996).
189. Koivunen, E., Arap, W., Rajotte, D., Lahdenranta, J. & Pasqualini, R. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *J Nucl Med* 40, 883-8 (1999).
190. Mintz, P. J. et al. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol* 21, 57-63 (2003).
191. Kolonin, M. G., Pasqualini, R. & Arap, W. Teratogenicity induced by targeting a placental immunoglobulin transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13055-60 (2002).
192. Kolonin, M. G., Saha, P. K., Chan, L., Pasqualini, R. & Arap, W. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat Med* 10, 625-32 (2004).
193. Mullen, L. M. et al. Novel adhesin from *Pasteurella multocida* that binds to the integrin-binding fibronectin FnIII9-10 repeats. *Infect Immun* 76, 1093-104 (2008).
194. Antonara, S., Chafel, R. M., LaFrance, M. & Coburn, J. *Borrelia burgdorferi* adhesins identified using in vivo phage display. *Mol Microbiol* 66, 262-76 (2007).
195. Ausmees, N., Jacobsson, K. & Lindberg, M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology* 147, 549-59 (2001).

196. Binet, R. & Wandersman, C. Cloning of the *Serratia marcescens* hasF gene encoding the Has ABC exporter outer membrane component: a TolC analogue. *Mol Microbiol* 22, 265-73 (1996).
197. Barabote, R. D. et al. *Erwinia chrysanthemi* tolC is involved in resistance to antimicrobial plant chemicals and is essential for phytopathogenesis. *J Bacteriol* 185, 5772-8 (2003).
198. Prentki, P. & Krisch, H. M. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29, 303-13 (1984).
199. Quandt, J. & Hynes, M. F. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 127, 15-21 (1993).
200. Becker, A., Schmidt, M., Jager, W. & Puhler, A. New gentamicin-resistance and lacZ promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* 162, 37-9 (1995).
201. Schafer, A. et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69-73 (1994).
202. Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23 (1979).
203. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5 (1970).
204. Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177, 4121-30 (1995).
205. Sukchawalit, R., Vattanaviboon, P., Sallabhan, R. & Mongkolsuk, S. Construction and characterization of regulated L-arabinose-inducible broad host range expression vectors in *Xanthomonas*. *FEMS Microbiol Lett* 181, 217-23 (1999).
206. NCCLS.
207. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-82 (1997).
208. Swofford, D. L. (Sinauer Associates, Sunderland, MA., 2000).
209. Page, R. D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12, 357-8 (1996).
210. Covert, J., Eskra, L. & Splitter, G. Isolation of *Brucella abortus* total RNA from *B. abortus*-infected murine RAW macrophages. *J Microbiol Methods* 60, 383-93 (2005).
211. Stermitz, F. R., Lorenz, P., Tawara, J. N., Zenewicz, L. A. & Lewis, K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1433-7 (2000).
212. Vemulapalli, T. H., Vemulapalli, R., Schurig, G. G., Boyle, S. M. & Sriranganathan, N. Role in virulence of a *Brucella abortus* protein exhibiting lectin-like activity. *Infect Immun* 74, 183-91 (2006).
213. Eisenschenk, F. C., Houle, J. J. & Hoffmann, E. M. Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Vet Microbiol* 68, 235-44 (1999).
214. Thern, A., Stenberg, L., Dahlback, B. & Lindahl, G. Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J Immunol* 154, 375-86 (1995).
215. Ngampasutadol, J. et al. Human C4b-binding protein selectively interacts with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17142-7 (2005).
216. Berggard, K., Johnsson, E., Mooi, F. R. & Lindahl, G. *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* 65, 3638-43 (1997).

217. Hellwage, J. et al. The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem* 276, 8427-35 (2001).
218. Kirjavainen, V. et al. *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog* 4, e1000140 (2008).
219. <http://pfam.sanger.ac.uk/search/keyword?query=adhesin>. (Sanger Center).
220. Linke, D., Riess, T., Autenrieth, I. B., Lupas, A. & Kempf, V. A. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol* 14, 264-70 (2006).
221. Van Nhieu, G. T. & Isberg, R. R. The *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein and human fibronectin bind to mutually exclusive sites on the alpha 5 beta 1 integrin receptor. *J Biol Chem* 266, 24367-75 (1991).
222. Bergey, D. H. et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Springer, New York, 2001).
223. Maneewannakul, K. & Levy, S. B. Identification for mar mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 1695-8 (1996).
224. Poole, K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4, 500-8 (2001).
225. Webber, M. A. & Piddock, L. J. Absence of mutations in marRAB or soxRS in acrB-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1550-2 (2001).
226. Lin, J., Michel, L. O. & Zhang, Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2124-31 (2002).
227. Thanassi, D. G., Cheng, L. W. & Nikaido, H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 2512-8 (1997).
228. Prouty, A. M., Brodsky, I. E., Falkow, S. & Gunn, J. S. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 150, 775-83 (2004).
229. Piddock, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 19, 382-402 (2006).
230. Elkins, C. A. & Mullis, L. B. Mammalian steroid hormones are substrates for the major RND- and MFS-type tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188, 1191-5 (2006).
231. Evans, K. et al. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180, 5443-7 (1998).
232. Chatterjee, A., Chaudhuri, S., Saha, G., Gupta, S. & Chowdhury, R. Effect of bile on the cell surface permeability barrier and efflux system of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 186, 6809-14 (2004).
233. Kohler, T., van Delden, C., Curty, L. K., Hamzehpour, M. M. & Pechere, J. C. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183, 5213-22 (2001).
234. Pearson, J. P., Van Delden, C. & Iglewski, B. H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 181, 1203-10 (1999).
235. Rambow-Larsen, A. A., Rajashekara, G., Petersen, E. & Splitter, G. Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J Bacteriol* 190, 3274-82 (2008).
236. Delrue, R. M. et al. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* 7, 1151-61 (2005).
237. Taminiau, B. et al. Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 70, 3004-11 (2002).
238. Baykam, N. et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. *Int J Antimicrob Agents* 23, 405-7 (2004).
239. al-Sibai, M. B., Halim, M. A., el-Shaker, M. M., Khan, B. A. & Qadri, S. M. Efficacy of ciprofloxacin for treatment of *Brucella melitensis* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 150-2 (1992).

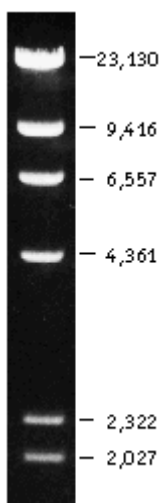
240. Rolain, J. M., Maurin, M. & Raoult, D. Bactericidal effect of antibiotics on *Bartonella* and *Brucella* spp.: clinical implications. *J Antimicrob Chemother* 46, 811-4 (2000).
241. al-Sibai, M. B. & Qadri, S. M. Development of ciprofloxacin resistance in *Brucella melitensis*. *J Antimicrob Chemother* 25, 302-3 (1990).
242. Qadri, S. M., Akhtar, M., Ueno, Y. & al-Sibai, M. B. Susceptibility of *Brucella melitensis* to fluoroquinolones. *Drugs Exp Clin Res* 15, 483-5 (1989).
243. Baucheron, S. et al. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3729-35 (2004).
244. Ricci, V., Tzakas, P., Buckley, A. & Piddock, L. J. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains are difficult to select in the absence of AcrB and TolC. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 38-42 (2006).
245. Godfroid, F. et al. Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun* 66, 5485-93 (1998).
246. Ko, J. & Splitter, G. A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16, 65-78 (2003).
247. Saier, M. H., Jr. et al. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *Faseb J* 12, 265-74 (1998).
248. Foster, T. J. & Hook, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6, 484-8 (1998).
249. Speziale, P. et al. Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol* 4, 1337-52 (2009).
250. Giomarelli, B. et al. Binding of *Streptococcus gordonii* to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett* 265, 172-7 (2006).
251. Jacobsson, K. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. *Vet Microbiol* 96, 103-13 (2003).
252. Schwarz-Linek, U., Hook, M. & Potts, J. R. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol Microbiol* 52, 631-41 (2004).
253. McKeown-Longo, P. J. Fibronectin-cell surface interactions. *Rev Infect Dis* 9 Suppl 4, S322-34 (1987).
254. Hall, P. R. et al. Phage display selection of cyclic peptides that inhibit Andes virus infection. *J Virol* 83, 8965-9 (2009).
255. NIH GUIDELINES FOR RESEARCH INVOLVING RECOMBINANT DNA MOLECULES. National Institutes of Health. (2009).
256. Policy guidelines of the publications board of the ASM in the handling of manuscripts dealing with microbiological sensitive issues. American Society for Microbiology. (2005).
257. Viadas, C., Rodriguez, M. C., Garcia-Lobo, J. M., Sangari, F. J. & Lopez-Goni, I. Construction and evaluation of an ORFeome-based *Brucella* whole-genome DNA microarray. *Microb Pathog* 47, 189-95 (2009).
258. Walker, D. C. H. N. J. M. R. L. *Veterinary Microbiology* (ed. publishing, B.) (Blackwell publishing, 2004).
259. Bandara, A. B., Sriranganathan, N., Schurig, G. G. & Boyle, S. M. Putative outer membrane autotransporter protein influences survival of *Brucella suis* in BALB/c mice. *Vet Microbiol* 109, 95-104 (2005).

Anexo A

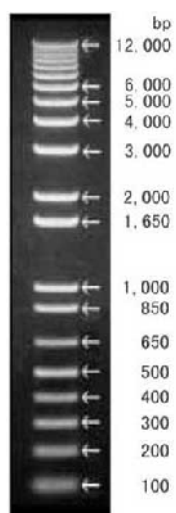
Marcadores de peso molecular

ADN

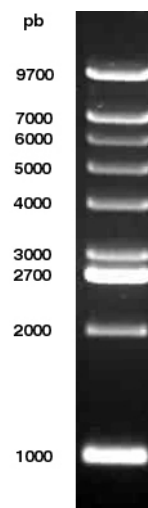
8: 8DNA/Hind III Fragments[®]



1Kb: 1Kb Plus DNA Ladder[®]



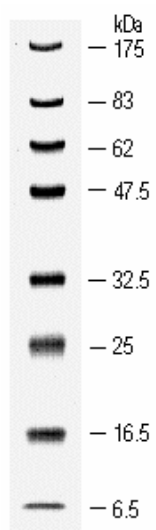
M: 1 Kb móvil



®Gibco

Proteínas

MP: marcador preteñido de proteínas, amplio rango (Premixed Format)[®]



®New England Biolabs

10-20% SDS-PAGE

Anexo B

Vimos que,

$$N = \frac{\ln(1 - P^*)}{\ln(1 - a/b)}$$

con:

N = número de clones requeridos en la biblioteca

P^* = probabilidad de que un cierto fragmento esté presente

a = tamaño promedio de los fragmentos de ADN en Kb

b = tamaño total del genoma.

Definimos P como la probabilidad de acierto con un clon,

$$P \text{ (acierto con un clon)} = \frac{1}{b/a} = \frac{a}{b}$$

Entonces, P (acertar k veces generando N clones) \sim $B_i(N, P)$

$$B_i(N, P) = \binom{n}{k} p^k (1-p)^{n-k} \quad (1)$$

Usando la ecuación (1) es posible calcular la probabilidad de que un fragmento dado no se encuentre en la biblioteca:

$$P \text{ (no acertar)} = P(k = 0)$$

$$B_0(N, P) = \binom{N}{0} p^0 (1-p)^{N-0} = (1-p)^N$$

$$P \text{ (no acertar)} = (1 - a/b)^N$$

A partir de este resultado se puede obtener inmediatamente la probabilidad P^* de que el fragmento esté representado al menos una vez:

$$P^* = 1 - (1 - a/b)^N$$

Es importante notar que esta probabilidad tiende a 1 rápidamente al aumentar N .

Despejando tenemos:

$$1 - P^* = (1 - a/b)^N$$

Aplicando logaritmos a ambos lados de la ecuación:

$$\ln(1 - P^*) = N \ln(1 - a/b)$$

Despejando N obtenemos finalmente:

$$N = \frac{\ln(1 - P^*)}{\ln(1 - a/b)}$$

Que permite calcular el tamaño mínimo N de la biblioteca para un dado nivel de certeza P^* .

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética y Bioquímica de Rhizobacterias, de la Fundación Instituto Leloir, bajo la dirección de la Dra. Angeles Zorreguieta.

Fue finalizada en Abril de 2010.

Diana M. Posadas

Dra. Angeles Zorreguieta