

Tesis Doctoral

Estudio de Lumazina Sintasa de Brucella como proteína transportadora de antígenos: relación entre estructura, estabilidad e inmunogenicidad

Ainciart, Natalia

2011

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:

Ainciart, Natalia. (2011). Estudio de Lumazina Sintasa de Brucella como proteína transportadora de antígenos: relación entre estructura, estabilidad e inmunogenicidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ainciart, Natalia. "Estudio de Lumazina Sintasa de Brucella como proteína transportadora de antígenos: relación entre estructura, estabilidad e inmunogenicidad". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

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

**"Estudio de Lumazina Sintasa de *Brucella* como
proteína transportadora de antígenos: relación
entre estructura, estabilidad e inmunogenicidad"**

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

Natalia Ainciart

Director: Dr. Fernando A. Goldbaum

Consejero de estudios: Dr. Luis Ielpi

Fundación Instituto Leloir – IIBBA – CONICET

Buenos Aires, 2011

A Diego
A Lucas y Rocío

Agradecimientos

A Fernando, mi director, por haber confiado en mí y haberme permitido trabajar en su laboratorio con tanta libertad.

A todos mis compañeros de laboratorio, los actuales y los que pasaron: Guille, Juan, Ana, Meli, Seba, Pato, Sergio, Laura, María Laura, Marie, Vane, Vani, Pau, Gastón, Hernán, Daiana, Victor, Marisol, Marielita, Gi, Jime, Ine, Gaby e Ignacio. Por su compañía y ayuda incondicional, por hacerme reír y por hacer que el lugar de trabajo sea familiar y de gusto ir cada día. Por ayudarme con la tesis y bancarme en los últimos tramos. Sebas, Hernán y Pau, gracias por las correcciones y los aportes a la escritura y al formato, sin los cuales mi tesis no sería la misma! Pato, gracias por las discusiones permanentes sobre mis resultados, fue un placer compartir tantas charlas con vos. Marie, gracias por estar y ponerme el hombro en los momentos más difíciles de mi vida. Vane, gracias por tu amistad, por estar cada vez que te necesite, por todos los cafecitos y charlas que compartimos, por las correcciones y por tu guía permanente en todo mi trabajo de tesis y en la escritura.

A Gi, Sabri y Vero por todas las charlas, cafés, almuerzos y todo lo que compartimos en los pasillos de la FIL.

A nuestros ex vecinos del labo de Angeles y los actuales de Guille. Gracias a todos por los momentos y las charlas compartidas.

A toda la gente del Instituto. A los becarios, porque siempre tienen la mejor onda para ayudar con el experimento que no sale. Gracias por los almuerzos inolvidables del comedor del tercero, los voy a extrañar! A los jefes de grupo por estar disponibles y fomentar la discusión de resultados permanentemente. A la gente de biblioteca, por contar con ustedes siempre y por conseguirme tantas citas! A Dora, Bernabé, Pancho y Andrés por estar siempre con una sonrisa y darnos el buenos días todos los días. A los técnicos, la gente de soporte, de droguero, de administración y de mantenimiento, que hacen que todo funcione de maravilla. A las secretarias por su buena voluntad para hacer

siempre las cosas lo mejor posible, más allá de las dificultades. Lili sos un fenómeno, la mamá de todos los becarios del Instituto!

Al CONICET y a la Fundación Instituto Leloir, por la beca otorgada y por haberme dado la oportunidad de hacer mi doctorado.

Al Dr. Luis Ielpi por haber aceptado ser mi consejero.

Al Dr. Eduardo Castaño, a la Dra. Andrea Llera y al Dr. Ielpi por formar mi comite de seguimiento de tesis. Escuchar cada año mis avances con atención y por hacer aportes para mi trabajo de tesis.

A los Dres. Julio Caramelo, Andrea Llera y Norberto Zwirner por aceptar ser jurados de mi tesis.

A Pato y Fer, por haber compartido conmigo tantos años de Facu. Porque cuando nos juntamos volvemos a ser esas estudiantes y nos reímos tanto de nosotras mismas. Gracias por su amistad.

A Mirta, por darles todo tu amor a mis hijos. Por cuidar lo más importante de mi vida y por permitir que me fuera de casa tranquila todos los días.

A Vera, Caro y Naty, por ser mis amigas. Por compartir tantos almuerzos y charlar de todo sin filtros. Porque con ustedes soy yo misma. Por acompañarme en el hermoso camino de la maternidad. Porque como una vez les dije, me mantienen despierta y atenta. Por hacer que ir todos los días a trabajar tuviera un plus muy difícil de encontrar. Las quiero amigas!

A Vera, por estar siempre, por entenderme y adivinarme siempre. Por ser mi hermana del alma.

A mi familia. A mis hermanos, porque son mis compañeros de toda la vida y por darme esos sobris hermosos que amo tanto. A Susi y Ana, por ser tan amorosas conmigo y por querer tanto a mis hijitos. A mis sobrinos hermosos,

Cami, Joaqui, Juli e Isabella, los adoro! A mis viejos, por apoyarme siempre en lo que quería hacer. Por permitirme estudiar sin tener ninguna otra preocupación. Por enseñarme lo importante de una profesión y a enfrentar y disfrutar los desafíos que me trajera.

A mis hijitos, Lucas y Rocío, por ser los soles de mi vida. Por hacer que cada minuto valga la pena, porque con el nacimiento de cada uno de ustedes mi vida cambio completamente, y me permitieron saber quien soy realmente. Por entender que cada día me fuera a trabajar y bancar el difícil proceso de la escritura.

A Die, por ser mi amor, mi compañero de ruta. Por estar siempre, por caminar a mi lado, por ayudarme a levantarme cuando me caigo. Por amarme tan incondicionalmente. Gracias por haber fundado juntos la familia hermosa que tenemos.

Resumen:

La proteína lumazina sintasa de *Brucella abortus* (BLS) tiene características estructurales, de estabilidad y de inmunogenicidad que la convierten en un candidato interesante para su utilización como *carrier* o proteína transportadora de distinto tipo de moléculas (péptidos, dominios proteicos, azúcares, etc)

BLS tiene una estructura de dímero de pentámero en solución y los estudios realizados en el laboratorio establecieron que tiene una temperatura de melting aparente de 89 °C y un ΔG de desnaturalización de 320 ± 22 kJ/mol. Además, genera una alta respuesta tanto celular como humoral cuando la proteína recombinante es administrada en ratones o conejos (inclusive sin adyuvante) o como vacuna a DNA en un vector de expresión eucariota. La fusión de distintos péptidos y dominios proteicos en su extremo amino terminal da lugar a quimeras de BLS y permite utilizarla como proteína transportadora y aumentar la inmunogenicidad contra las moléculas transportadas en distintos modelos animales.

BLS se disocia en dos pentámeros plegados cuando es incubada con cloruro de guanidinio 2M o en buffer fosfato a pH 5. Si la concentración de desnaturalizante aumenta por encima de 2,3 M, se produce una disociación y desnaturalización concertadas que dan lugar a monómeros desplegados. Conocer en detalle estos equilibrios nos permitió diseñar dos estrategias para obtener proteínas mixtas de BLS que contuvieran una mezcla de péptidos provenientes de dos quimeras diferentes.

Obtuvimos proteínas mixtas con diferente cantidad de péptido OMP31 y pudimos establecer una relación lineal entre la inmunogenicidad y la densidad de epitopes en la presentación antigénica. Al mismo tiempo, obtuvimos mutantes de estabilidad de BLS y estudiamos el efecto que tiene la estabilidad de la proteína transportadora en la inmunogenicidad contra el péptido transportado.

Mediante el estudio de este modelo pudimos establecer que la densidad local de epitopes que se consigue con las quimeras de BLS y las elevadas estabilidad e inmunogenicidad intrínseca de BLS son las principales características que hacen que esta proteína funcione tan eficientemente como *carrier* de moléculas.

Palabras clave: *Brucella abortus*, lumazina sintasa, densidad de epitopes, estructura, estabilidad, inmunogenicidad, antígeno.

Abstract:

The enzyme lumazine synthase from *Brucella spp.* is highly immunogenic. This decameric protein is remarkably stable to thermal or chemical denaturation, suggesting a correlation between thermodynamic stability, polymeric arrangement and immunogenicity. The three-dimensional structure of this protein shows that it is possible to insert foreign peptides or full-length proteins at the amino terminus without disrupting its general folding. These peptides are presented to the immune system in a polymeric way and in the context of a high specific immune response.

BLS is a dimer of pentamers in solution, has a melting temperature of 89 °C and a ΔG of denaturation of 320 ± 22 kJ/mol. BLS induces a high humoral and cellular response when the recombinant protein is inoculated in mice and rabbits (even in the absence of adjuvants) or when it is used as a DNA vaccine in a eukaryotic expression vector. The decoration with peptides or protein domains (chimeras) shows that BLS acts as an efficient carrier and enhances the immunogenicity against the transported molecules.

BLS dissociates into two folded pentamers when it is incubated in 2 M guanidinium chloride in phosphate buffer at pH 5. Guanidinium chloride concentrations above 2.3 M produce a concerted dissociation and denaturation process resulting in unfolded monomers. The knowledge of these equilibria allowed us to design two different strategies to obtain mixed proteins of BLS with peptides from different chimeras. We obtained mixed chimeras decorated with different numbers of OMP31 peptides and established a linear relationship between the immunogenicity against the peptide and the epitope density. At the same time, we obtained mutants of BLS with decreased stability and studied the effect of the stability of the carrier protein in the immunogenicity of the peptide. This experimental model allowed us to demonstrate that the local density of epitopes and the high stability and intrinsic immunogenicity of BLS are the main features that make BLS an efficient carrier for vaccine design.

Key words: *Brucella abortus*, lumazine synthase, epitope density, structure, stability, immunogenicity, antigen.

Parte de los resultados mostrados en esta tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

Molecular basis of immunogenicity: The BLS model.

Ainciart, N., Zylberman, V., Goldbaum, F.A.

Manuscrito en preparación.

Sensing the dissociation of a polymeric enzyme by means of an engineered intrinsic probe.

Ainciart N, Zylberman V, Craig PO, Nygaard D, Bonomi HR, Cauerhff AA, Goldbaum FA. *Proteins*. 2011 Apr;79(4):1079-88. doi: 10.1002/prot.22945.

Effective protection against experimental *Taenia solium* tapeworm infection in hamsters by primo-infection and by vaccination with recombinant or synthetic heterologous antigens.

Cruz-Revilla C, Toledo A, Rosas G, Huerta M, Flores-Perez I, Peña N, Morales J, Cisneros-Quiñones J, Meneses G, Díaz-Orea A, Ainciart N, Goldbaum F, Aluja A, Larralde C, Fragoso G, Sciotto E. *J Parasitol*. 2006 Aug;92(4):864-7.

***Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity.**

Rosas G, Fragoso G, Ainciart N, Esquivel-Guadarrama F, Santana A, Bobes RJ, Ramírez-Pliego O, Toledo A, Cruz-Revilla C, Meneses G, Berguer P, Goldbaum FA, Sciotto E. *Microbes Infect*. 2006 Apr;8(5):1277-86. Epub 2006 Feb 7.

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

Craig PO, Berguer PM, Ainciart N, Zylberman V, Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Bulloj A, Boccaccio GL, Goldbaum FA. *Proteins*. 2005 Dec 1;61(4):1089-100.

***Brucella* spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system.**

Sciotto E, Toledo A, Cruz C, Rosas G, Meneses G, Laplagne D, Ainciart N, Cervantes J, Fragoso G, Goldbaum FA. *Vaccine*. 2005 Apr 15;23(21):2784-90.

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

Laplagne DA, Zylberman V, Ainciart N, Steward MW, Sciotto E, Fossati CA, Goldbaum FA. *Proteins*. 2004 Dec 1;57(4):820-8.

Indice

Introducción	13
1. Brucelosis	14
1.1 Vacunas	16
1.2 Establecimiento del nicho replicativo.	16
2. La lumazina sintasa de <i>Brucella</i> spp.	19
2.1 Características estructurales de BLS y otras lumazinas sintasas	22
2.2 Características termodinámicas de BLS	25
2.3 BLS como inmunógeno.	27
2.4 BLS como proteína transportadora.	29
2.5. BLS como proteína transportadora de distintos péptidos: proteínas mixtas.	31
3. Vacunas.....	34
3.1 Vacunas clásicas.....	35
3.2 Vacunas de nueva generación.	36
4. Relación entre estructura e inmunogenicidad	37
4.1 Virus like particles como modelo	37
4.2 Otras proteínas multiméricas utilizadas como transportadoras.....	43
Objetivos	45
Capítulo I. BLS como proteína transportadora de péptidos.....	46
Capítulo II. Relación entre inmunogenicidad y estructura / estabilidad de BLS.....	46
Resultados	47
Capítulo I	48
1. Construcción de quimeras de BLS.....	50
2. Expresión y purificación de quimeras.....	50
3. Quimeras de BLS.....	54
4. Proteínas mixtas: BLS como proteína transportadora de más de un péptido.....	62
4.2. Relación repetitividad / inmunogenicidad del epítopo transportado por BLS.	65
4.2.1. Estrategia para la formación y la obtención de proteínas mixtas:	65
4.2.2. Obtención y selección de proteínas mixtas.....	67
4.2.2.1. Proteínas mixtas por disociación.	68
4.2.2.2. Proteínas mixtas por desnaturalización.	69
BLS-OMP31: Riboflavina.....	70
BLS-OMP31:Hemina.....	71
Obtención de proteínas mixtas por desnaturalización	73
4.2.3. Análisis de las distintas poblaciones.....	76
4.2.4. Inmunizaciones.....	78

Primer plan de inmunización.	78
Segundo plan de inmunización.	81
5. Conclusiones del capítulo I.	84
Capítulo II	86
6. Mutantes de BLS OMP31.	89
6.1. Obtención de mutantes de BLS-OMP31.	89
6.2. Expresión y purificación.	90
6.3. Mutantes de BLS y BLS-OMP31: análisis estructural.	90
6.4. Análisis de las mutantes de BLS-OMP31 en estado nativo.	93
6.5. Estabilidad termodinámica de las mutantes.	94
6.6. Análisis termodinámico de las mutantes.	96
6.7. Inmunizaciones.	98
7. Estudio de estabilidad – inmunogenicidad de las proteínas RibH2 de Brucella spp. y de Mesorhizobium loti.	100
7.1. Características de RibH2 de Mesorhizobium loti.	100
7.2. Clonado y expresión de RibH2 de Mesorhizobium loti.	102
7.3. Purificación.	103
7.4 Análisis de estructura secundaria.	103
7.5. Análisis de estabilidad.	103
7.6. Inmunización.	104
8. Conclusiones del capítulo II.	106
Discusión.....	107
Conclusiones generales	115
Materiales y Métodos	118
1. Construcción de quimeras de BLS.....	119
1.1. Protocolos de construcción de las proteínas quiméricas	120
1.1.1. Inserto sintético	120
1.1.2. Digestión del vector	121
1.1.3. Screening de la ligación por colony-PCR	121
2. Expresión recombinante de BLS y quimeras de BLS.....	122
3. Purificación de las proteínas.....	123
4. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).	124
5. Obtención de proteínas mixtas.	124
5.1. Tratamientos para la obtención de las proteínas mixtas.	124
5.2. Tratamientos de renaturalización de BLS-OMP31.....	125
5.2.1 Tratamiento con riboflavina.	125
5.2.2. Tratamiento con hemina.....	125

6. Purificación y caracterización de proteínas mixtas por fluorescencia.....	126
6.1. Purificación de las proteínas mixtas.....	126
6.2. Análisis de las poblaciones purificadas.....	127
7. Mutagénesis sitio dirigida de BLS-OMP31.....	127
8. Análisis estructural de las mutantes: representación gráfica.....	128
9. Estudios de las proteínas en estado nativo – Dicroísmo circular y fluorescencia.....	128
9.1 Mediciones de dicroísmo circular.....	129
9.2 Fluorescencia intrínseca del triptofano.	129
10. Curvas de desnaturalización.....	130
11. Obtención de los parámetros termodinámicos calculados a partir de la curva de desnaturalización con GdnHCl.....	130
12. Ensayos de inmunización.	132
13. Ensayos de ELISA.	132
14. Análisis estadístico.	133
Referencias.....	134

Introducción

1. Brucelosis

La brucelosis es una de las cinco zoonosis más difundidas en el mundo (Godfroid, J. *et al.* 2005). Esta enfermedad es producida por una bacteria Gram-negativa del género *Brucella* pertenecientes a la familia Brucellaceae, cuyas diferentes especies muestran predilección por un huésped determinado (Corbel, M. J. 1997; Godfroid, J. *et al.* 2005; Moreno, E. *et al.* 2002). Fueron aisladas por primera vez por el médico escocés David Bruce en 1887 y se han descrito un total de siete especies de acuerdo a la variación antigénica y al huésped primario (Tabla I-1) (Corbel, M. J. 1990; Jahans, K. L. *et al.* 1997; Parker, T. and Collier., L. H.). De todas ellas se encuentran los genomas de algunas cepas de *B. abortus* (Halling, S. M. *et al.* 2005); (Chain, P. S. *et al.* 2005); (Crasta, O. R. *et al.* 2008), *B. melitensis* cepa 16M (DelVecchio, V. G. *et al.* 2002), *B. suis* cepa 1330 (Paulsen, I. T. *et al.* 2002), *B. ovis* cepa ATCC 25840 (reciente, sin publicación asociada) y *B. microti* recientemente aislada y secuenciada (Audic, S. *et al.* 2009).

Tabla I-1. Distintas especies de *Brucella*, su hospedador y grado de patogenicidad causada en el hombre.

Especies lisas	Hospedador	Patogenicidad en el hombre
<i>B. abortus</i>	bovinos	moderada
<i>B. melitensis</i>	caprinos y ovinos	elevada
<i>B. suis</i>	porcinos	intermedia
<i>B. neotomae</i>	roedores	no posee
<i>B. maris</i>	mamíferos marinos	moderada
Especies rugosas		
<i>B. ovis</i>	ovinos	no posee
<i>B. canis</i>	caninos	moderada

En la brucelosis animal, el síntoma más común es el aborto de las hembras preñadas e infecciones genitales en los machos con las consecuentes pérdidas económicas que esto origina a la industria ganadera. El problema es aún mayor debido al alto grado de contagio dentro de una manada por transmisión venérea o por ingesta de tejidos infectados.

La brucelosis no se contagia entre humanos y es transmitida mediante contacto directo con la sangre, la placenta, fetos o secreciones uterinas, o por el consumo de productos de origen animal infectados (especialmente leche y productos lácteos) y constituye un importante problema de salud en muchos países desarrollados.

De las especies de *Brucella* caracterizadas hasta el momento, cinco son patógenas para el hombre. *B. melitensis* es la más virulenta, en tanto que *B. abortus* y

B. canis producen infecciones leves. *B. suis* exhibe una virulencia intermedia. Recientemente se han identificado dos casos de infección humana por *B. maris*. El grupo de riesgo de esta enfermedad son las personas en contacto con el ganado, como veterinarios, carniceros, granjeros, ganaderos, etc (figura I-1), o bien en laboratorios a través de la inhalación accidental de aerosoles (Pappas, G. *et al.* 2005).

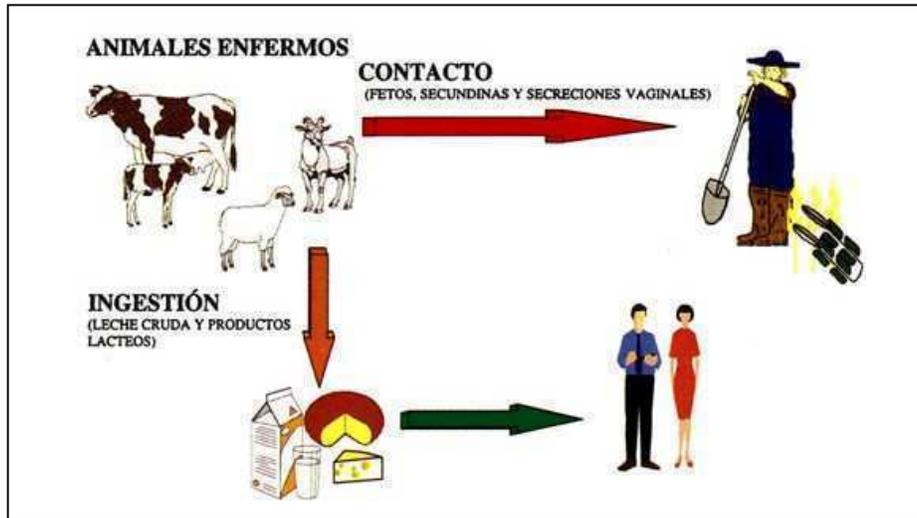


Figura I-1. Esquema de contagio de la brucelosis. El contagio a los humanos en general se produce a través de contacto directo con animales infectados o del consumo de productos derivados de los mismos.

La incidencia de la brucelosis es muy alta en nuestro país, donde no sólo hay un alto consumo de carnes y lácteos, sino que además la producción y elaboración de derivados de estos productos es una de las principales actividades económicas, convirtiendo a la brucelosis en una de las enfermedades más importantes. Se considera que las pérdidas económicas relacionadas con esta enfermedad superan los 300 millones de pesos anuales.

Los síntomas de brucelosis en humanos aparecen entre los 5 y 30 días posteriores al contacto con la bacteria y se presentan como cuadros gripales con fiebres intermitentes e irregulares de duración variable, dolor de cabeza, debilidad, sudoración profusa, escalofríos, dolores abdominales, pérdida de peso y dolores musculares y articulares generalizados. Son característicos los picos febriles por la tarde. Pasados los síntomas agudos, la brucelosis puede convertirse en crónica. En estos casos, la bacteria persiste durante años en la persona enferma afectando a distintos órganos.

1.1 Vacunas

En los países en los que la brucelosis constituyó un problema de importancia, las campañas de vacunación masiva del ganado y la eliminación de los animales positivos en los ensayos de diagnóstico, permitieron lograr el control de la enfermedad. La vacunación animal permitió reducir la tasa de incidencia de brucelosis en el ganado, y las consecuentes pérdidas económicas por abortos y baja productividad. Como consecuencia de la interrupción de la cadena de contagio animal – hombre se produjo una concomitante disminución de la brucelosis humana. Sin embargo no se ha eliminado por completo el riesgo de contagio.

En la actualidad no existe una vacuna que haya proporcionado buenos resultados en humanos. Por otro lado, en animales se utilizan las cepas *B. abortus* RB51 y *B. abortus* S19 para inmunizar vacas y la cepa *B. melitensis* REV.1 para inmunizar ovejas y cabras (Blasco, J. M. 1997; Bosseray, N. 1991; Corbel, M. J. 1997; Jimenez de Bagues, M. P. *et al.* 1989). No hay vacunas disponibles para otros animales.

1.2 Establecimiento del nicho replicativo.

Las bacterias del género *Brucella* son patógenos intracelulares facultativos que invaden células fagocíticas profesionales y no profesionales, incluyendo a macrófagos, células dendríticas (CDs), células epiteliales y trofoblastos placentarios (Gorvel, J. P. 2008). En macrófagos, *Brucella* dirige la vía endocítica para evitar la muerte por los mecanismos bactericidas de la misma y logra establecerse en su nicho replicativo intracelular, que es un compartimento membranoso derivado de retículo endoplásmico (RE). Al establecer contacto con la membrana celular, las bacterias adheridas se acumulan, formando microcolonias (Castaneda-Roldan, E. I. *et al.* 2004). Posteriormente ingresan a la célula por macropinocitosis. En este proceso es necesaria la presencia de *lipid rafts* (balsas lipídicas) en la membrana. Los *lipid rafts* se caracterizan por ser porciones de membrana o microdominios, ricos en esfingolípidos y colesterol (Watarai, M. *et al.* 2002). Una vez dentro de la célula, *Brucella* se localiza en una vacuola especializada denominada BCV (*Brucella Containing Vacuole*) (figura I-2). Las bacterias que ingresan a la célula por interacción con *lipid rafts* son capaces de evitar la vía endocítica degradativa, mientras que las BCVs que se forman a partir de *Brucella* opsonizada (*lipid raft*-independiente) o con la estabilidad de los *lipid rafts* comprometida, no pueden controlar el tráfico

correctamente y derivan en fagolisosomas (Arellano-Reynoso, B. *et al.* 2005; Celli, J. 2006; Porte, F. *et al.* 2003).

Las BCVs tempranas son rápidamente acidificadas en una interacción transitoria con lisosomas, que disminuyen el pH hasta 4-5, lo cual es esencial para la activación de los genes de virulencia de *Brucella*, como el Sistema de Secreción Tipo IV (SST4) (Porte, F. *et al.* 1999; Starr, T. *et al.* 2008). Hay evidencias que muestran que las BCVs interactúan con elementos de la vía endocítica, formando interacciones con endosomas tempranos, tardíos y fusiones limitadas con lisosomas. Luego, las BCVs intermedias interactúan con los sitios de salida del RE (ERES), captando las vesículas de transporte recubiertas de COPII y fusionándose al RE. Allí forman BCVs multimembranas con numerosos marcadores de RE (como sec61 β , calnexina y calreticulina) y no presentan marcadores lisosomales típicos, como LAMP-1. Este es el nicho replicativo de *Brucella*, que se denomina BCV replicativa o brucelosoma (Celli, J. *et al.* 2003; Starr, T. *et al.* 2008). Luego de 12 horas de la entrada a la célula, *Brucella* replica extensivamente sin restringir las funciones celulares básicas ni inducir daño aparente al hospedador. Las BCVs replicativas se multiplican, dando origen a nuevas BCVs hijas individuales. Probablemente este sea un proceso de fisión de una BCV madre en dos BCVs hijas luego de tomar membranas derivadas de RE (Celli, J. 2006).

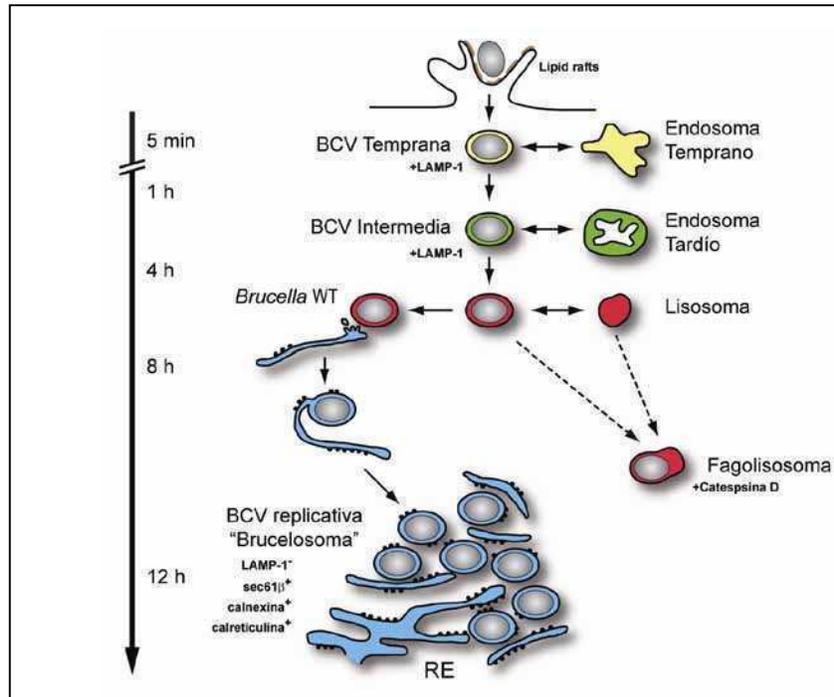


Figura I-2. Modelo simplificado del tráfico intracelular de *Brucella*. Figura adaptada de (Starr, T. *et al.* 2008). Después de la entrada a través de los *lipid rafts* de la membrana celular, las bacterias se localizan en vacuolas especializadas llamadas *Brucella Containing Vacuoles* (BCVs) que trafican por parte de la ruta endocítica. Estas interactúan secuencialmente con los compartimentos tempranos (amarillo) donde la vacuola adquiere marcadores como LAMP-1. Luego interactúa con los endosomas tardíos (verde) antes de fusionarse limitadamente con lisosomas (rojo). Si el proceso de maduración de los fagosomas no puede ser modificado y éstos derivan en fagolisosomas, como ocurre con algunas mutantes, las bacterias son eliminadas. Las BCVs intermedias interactúan con los sitios de salida del RE (ERES) para luego fusionarse al RE (azul) y generar BCVs replicativas derivadas de RE (brucelosoma).

El conjunto de interacciones complejas entre *Brucella* y su hospedador tienen como objetivo asegurar la supervivencia y transmisión del patógeno. Más aún, el proceso evolutivo permitió que tanto la bacteria como la célula invadida puedan sobrevivir, siendo los síntomas de la brucelosis el resultado de la reacción inmunológica contra las células infectadas más que el daño directo producido en ellas por la multiplicación interna de la bacteria (Ugalde, R. A. 1999). Los factores de virulencia presentes en *Brucella* difieren notoriamente de los encontrados en otros patógenos. En este sentido, *Brucella* carece de exotoxinas, citolisinas, fimbrias, flagelos, plásmidos, variación antigénica e islas de patogenicidad (Gorvel, J. P. and Moreno, E. 2002; Ko, J. and Splitter, G. A. 2003). Por este motivo, los verdaderos factores de virulencia son aquellos que le permiten a esta bacteria invadir las células blanco, resistir la lisis intracelular y alcanzar su nicho replicativo (Ficht, T. A. 2003; Roop, R. M., 2nd *et al.* 2004; Roop, R. M., 2nd *et al.* 2002).

2. La lumazina sintasa de *Brucella* spp.

A comienzos de la década del 90, los ensayos serológicos utilizados para diagnosticar brucelosis estaban basados en la detección de anticuerpos anti-LPS (Alton G.G., J. L. M., Angus R.D. & Verger J.M. 1988). Estos ensayos, sin embargo, presentaban la desventaja de una reacción cruzada con otras bacterias Gram-negativas, siendo además imposible diferenciar entre animales infectados con *Brucella* y aquellos vacunados con cepas atenuadas. Más aún, en muchos casos resultaban ineficientes para diagnosticar la enfermedad en humanos porque las personas recuperadas poseían gran cantidad de estos anticuerpos en su sangre.

La lumazina sintasa de *Brucella* spp. (BLS) fue identificada como una proteína de 18 KDa útil en el desarrollo de ensayos de diagnóstico por ELISA para la identificación de individuos infectados. Mediante el uso de esta proteína se pudo diferenciar entre pacientes con brucelosis activa (enfermos con síntomas) e inactiva (infectados pero asintomáticos) (Baldi, P. C. *et al.* 1996; Baldi, P. C. *et al.* 2000; Baldi, P. C. *et al.* 1997; Goldbaum, F. A. *et al.* 1993; Goldbaum, F. A. *et al.* 1992). Esta proteína (llamada posteriormente RibH2 por estar ubicada en el cromosoma II de *Brucella*) resultó tener homología de secuencia con la familia de las lumazinas sintasas (Hemmen, F. *et al.* 1995) y más tarde se pudo confirmar su identidad mediante ensayos de actividad enzimática (Goldbaum, F. A. *et al.* 1999).

La lumazina sintasa está implicada en el penúltimo paso de la biosíntesis de riboflavina (vitamina B₂). La riboflavina, es el precursor de flavina mononucleótido (FMN) y flavina-adenina dinucleótido (FAD), dos coenzimas claves en innumerables procesos redox celulares que implican transferencia de uno o dos electrones. Más aún, estas sustancias están involucradas en otros procesos fisiológicos tales como reparación del ADN, bioluminiscencia, detección de radiación y regulación del ritmo circadiano (Massey, V. 2000).

La riboflavina es un cofactor esencial para todos los organismos y es biosintetizada en plantas, hongos y microorganismos. Por el contrario, los animales carecen de las enzimas necesarias para producir riboflavina y deben adquirirla mediante la dieta.

Esta observación, sumada al hecho de que muchos microorganismos son incapaces de adquirir riboflavina de fuentes exógenas, promovió el estudio de las enzimas involucradas en la síntesis de esta vitamina como un blanco atractivo para el desarrollo de fármacos antimicrobianos (Bacher, A. *et al.* 1996). La ruta biosintética de la riboflavina y sus coenzimas asociadas han sido extensamente estudiadas en las últimas décadas (figura I-3). Los productos de partida son GTP y ribulosa 5-fosfato,

este último proveniente de la ruta de las pentosas fosfato (Fischer, M. and Bacher, A. 2005, 2006). De todos los pasos señalados, el que se encuentra resaltado en color gris es el que reviste la mayor atención para la presente Tesis. Este es catalizado por la enzima 6,7-dimetil-8-ribitillumazina sintasa, llamada también por simplicidad "lumazina sintasa" (LS), la cual favorece la condensación de 5-amino-6-ribitilamino-2,4 (1*H*,3*H*)- pirimidinadiona **1** con 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato **2** para dar 6,7-dimetil-8- ribitillumazina **3**. Esta etapa corresponde al penúltimo paso de la biosíntesis de la riboflavina, ya que el compuesto **3** sufre luego una reacción de dismutación, catalizada por la enzima riboflavina sintasa (RS, paso **IX**) para dar riboflavina. Asimismo, se regenera una molécula del compuesto **1** que sirve como sustrato de LS para dar lugar a un nuevo ciclo de reacción. Desde un punto de vista estequiométrico, dos equivalentes de ribulosa 5-fosfato y uno de GTP dan lugar a un equivalente de riboflavina.

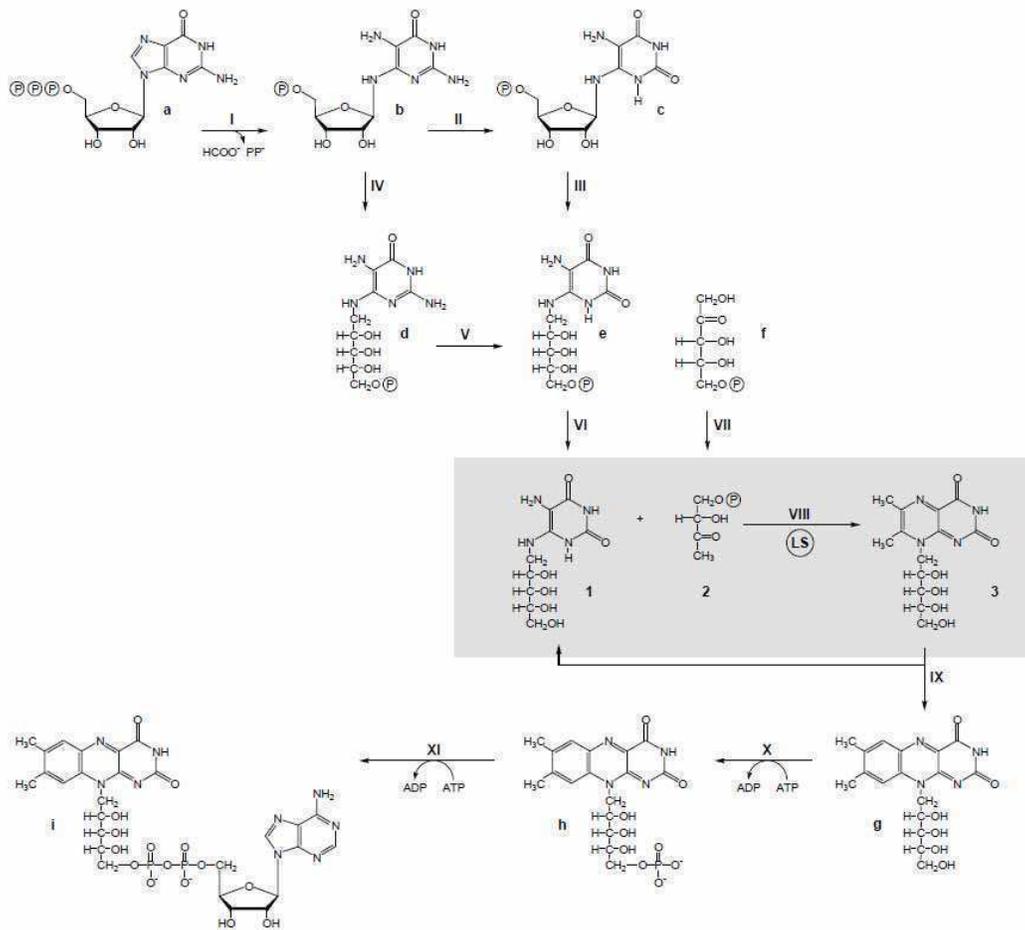


Figura I-3. Reacciones involucradas en la biosíntesis de riboflavina, FMN y FAD. Paso I: GTP ciclohidrolasa II, paso II: 2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinona 5'-fosfato deaminasa (sólo en eubacterias y plantas), paso III: 5-amino-6-ribosilamino-2,4 (1H,3H)-pirimidinadiona 5'-fosfato reductasa (sólo en eubacterias y plantas), paso IV: 2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinona 5'-fosfato reductasa (sólo en hongos y arqueobacterias), paso V: 2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinadiona 5'-fosfato deaminasa (sólo en hongos y arqueobacterias), paso VI: fosfatasa desconocida, paso VII: 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintasa, paso VIII: 6,7-dimetil-8-ribitilumazina sintasa (reacción destacada en fondo gris), paso IX: riboflavina sintasa, paso X: riboflavina quinasa, paso XI: FAD sintasa, a: GTP, b: 2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinona 5'-fosfato, c: 5-amino-6-ribosilamino-2,4 (1H,3H)-pirimidinadiona 5'-fosfato, d: 2,5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H)-pirimidinadiona 5'-fosfato, e: 5-amino-6-ribosilamino-2,4 (1H,3H)-pirimidinadiona 5'-fosfato, f: ribulosa 5-fosfato, 1: 5-amino-6-ribosilamino-2,4 (1H,3H)-pirimidinadiona, 2: 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato, 3: 6,7-dimetil-8-ribitilumazina, g: riboflavina, h: FMN, i: FAD.

Las especies de *Brucella* patogénicas adaptadas a la vida intracelular tienen dos genes involucrados en la síntesis de riboflavina, ribH1 y ribH2, que están localizadas en los cromosomas I y II respectivamente.

2.1 Características estructurales de BLS y otras lumazinas sintasas

La estructura de BLS se estudió extensamente en nuestro laboratorio. BLS tiene una estructura homodecamérica en solución, la cual puede ser descrita convenientemente como un dímero de pentámeros asociados entre sí en forma cabeza - cabeza (figura I-4 A). Esta es una de las características más distintivas de esta proteína ya que las estructuras del resto de las lumazinas sintasas descritas hasta ese momento eran de tipo pentaméricas o icosaédricas (figura I-4 C (Gerhardt, S. *et al.* 2002) y figura I-4 D (Persson, K. *et al.* 1999)).

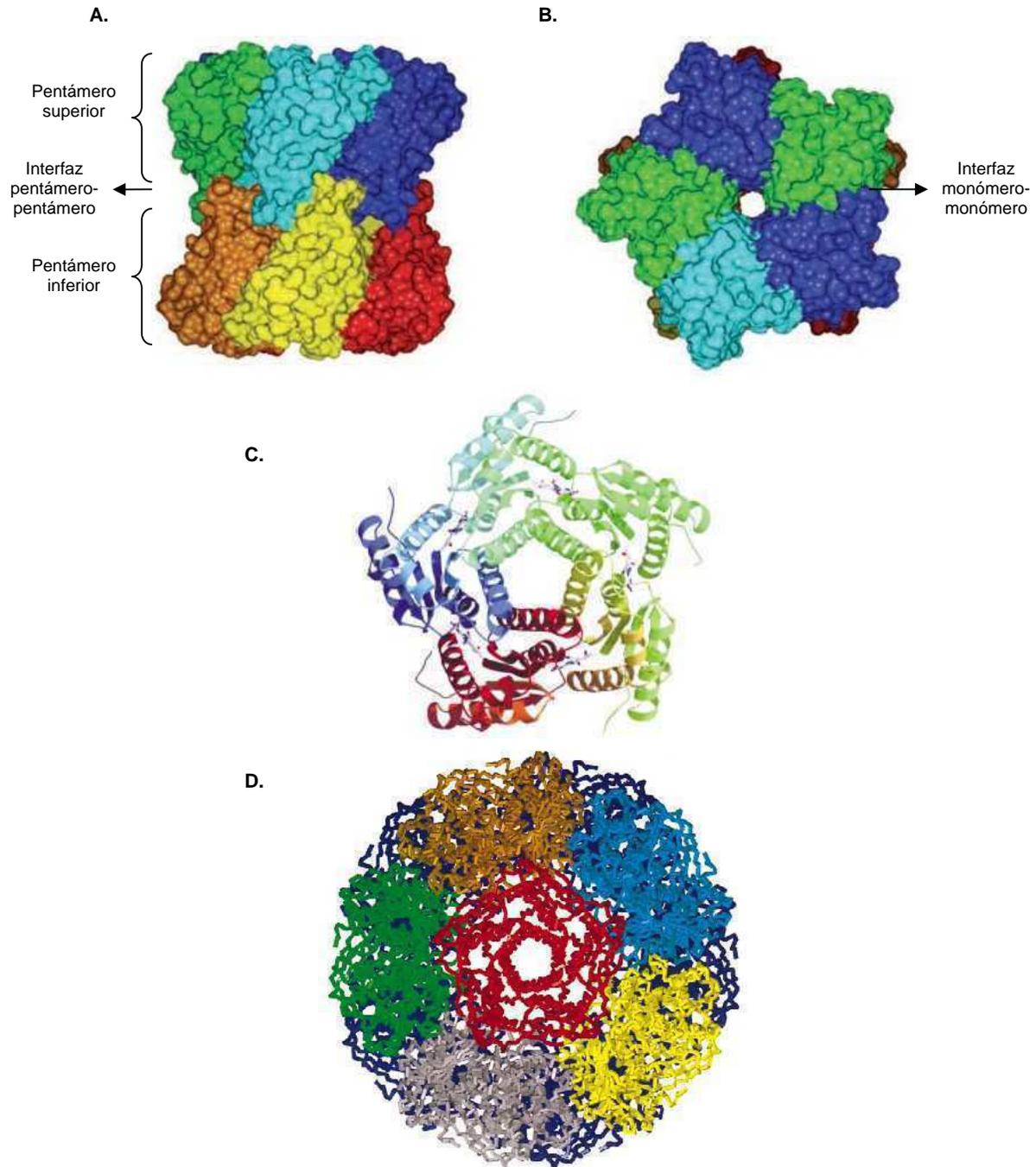


Figura I-4. Estructura tridimensional de las LS decamérica de Brucella vista lateral (A), vista superior (B), pentamérica de *S. pombe* (C)(extraída de (Gerhardt, S. *et al.* 2002)) e icosaédrica de espinaca (D) (extraída de (Persson, K. *et al.* 1999)). Cada monómero está representado con un color diferente.

El monómero de BLS tiene un peso molecular de 18 kDa y 159 residuos. Su estructura consiste en un motivo repetitivo de cuatro hebras β paralelas y cuatro hélices α que dan lugar a una hoja β central rodeada por dos hélices α a cada cara de la misma. Los sitios activos están localizados en las interfaces entre subunidades

adyacentes en el pentámero, involucrando residuos de ambos monómeros, igual que en las otras lumazinas sintasas descritas (Ladenstein, R. *et al.* 1988).

Todas las lumazinas sintasas conocidas hasta el momento comparten un bloque común de construcción pentamérica. La diferencia entre las lumazinas pentaméricas, icosaédricas y decaméricas radica en el largo del loop que une las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$. En la figura I-5 se ve claramente como varía el largo de este loop en las lumazinas pentaméricas y las icosaédricas. En todas las lumazinas icosaédricas este loop está compuesto por cinco residuos que están involucrados y parecen ser esenciales en el contacto pentámero-pentámero estabilizando la cápside icosaédrica (Braden, B. C. *et al.* 2000; Persson, K. *et al.* 1999; Ritsert, K. *et al.* 1995; Zhang, X. *et al.* 2001). Las lumazinas pentaméricas de hongos y levaduras tienen un loop más largo, de 9 aminoácidos entre las hélices $\alpha 4$ y 5 , lo cual hace imposible la formación de icosaedros (Gerhardt, S. *et al.* 2002; Meining, W. *et al.* 2000; Morgunova, E. *et al.* 2005; Persson, K. *et al.* 1999); (Morgunova, E. *et al.* 2007)

En el caso de BLS, existe un alto grado de divergencia con las otras lumazinas en este sentido. BLS tiene residuos extras en este loop que llevan a la formación de una hélice sin distorsiones entre las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ (o a una hélice $\alpha 4$ extendida). Esta característica da lugar a un arreglo cuaternario diferente (figura I-4).

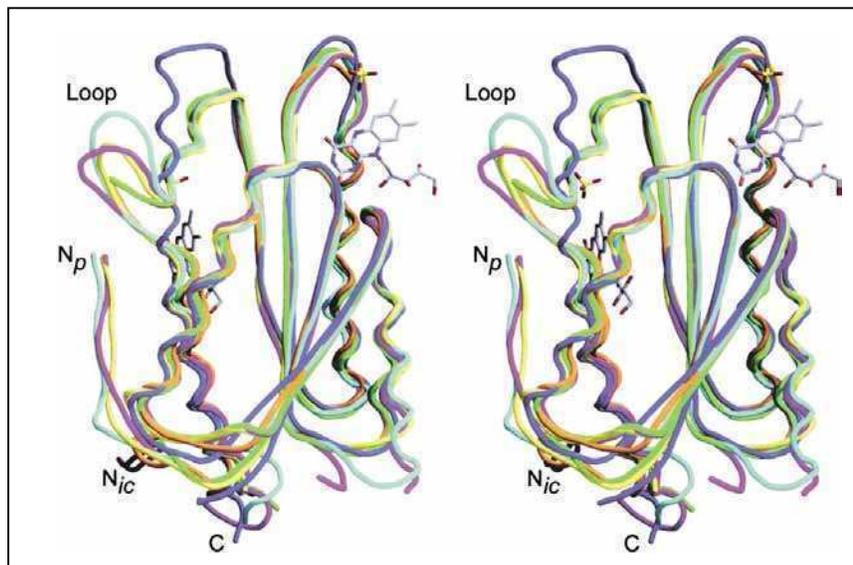


Figura I-5. Superposición estructural de los monómeros de varias lumazina sintasa. Las enzimas de *S. pombe* (amarillo), *S. cerevisiae* (azul claro), and *M. grisea* (magenta) son pentaméricas, la lumazina de *B. abortus* (azul oscuro) es decamérica, mientras que las lumazinas de *B. subtilis* (verde), y espinaca (naranja) forman cápsides icosaédricas (Gerhardt, S. *et al.* 2002).

BLS tiene una interfaz entre monómeros estabilizada fundamentalmente por contactos de tipo Van der Waals, y cada monómero aporta también 6 puentes de hidrógeno y 1 puente salino en la estabilización del pentámero. Por otro lado, la interfaz entre pentámeros tiene características estructurales poco habituales y que contribuyen enormemente a la estabilidad de la molécula. Esta interfaz tiene una inusual cantidad de residuos de histidinas que son capaces de formar una serie de *stackings* aromáticos con los residuos de His del pentámero vecino. Además en esta zona se forman también dos puentes salinos intrapentaméricos. El área superficial de contacto entre los dos penámeros de BLS es de 3300 Å cuadrados (Klinke, S. *et al.* 2005).

2.2 Características termodinámicas de BLS

Se ha estudiado en detalle la estabilidad termodinámica de BLS utilizando distintas técnicas como dicroísmo circular (DC), fluorescencia intrínseca del triptofano (FT) y dispersión estática de luz (en inglés, *static lighth scattering*, SLS). Se pudo ver por DC y FT que la estructura de BLS permanece inalterada cuando es incubada en concentraciones elevadas de urea. También se observó por SLS que BLS conserva el mismo peso molecular en estas mismas condiciones, y que por lo tanto BLS es estable y conserva su estructura cuaternaria aun en 8 M urea (Zylberman, V. *et al.* 2004).

Asimismo se comprobó que BLS es resistente a digestión con diferentes proteasas, como papaína, tripsina o quimotripsina, resistiendo a la degradación por tripsina durante 24 hs (Zylberman, V. 2006).

Contrariamente a lo observado con urea, la incubación con cloruro de guanidinio (GdnHCl) da lugar a una transición reversible y cooperativa que se ve reflejada por la disminución en la emisión de FT. Además mediante la señal de DC a 222 nm se pudo observar la pérdida total de estructura secundaria a concentraciones mayores a 4 M GdnHCl (figura I-6).

En concentraciones crecientes de GdnHCl, los análisis de SLS revelaron que el desplegamiento de la proteína muestra un comportamiento bifásico (figura I-6). En un primer paso, observado en el rango de 1,5-2,2 M GdnHCl, la intensidad de la señal de SLS se reduce a la mitad del valor medido en ausencia de desnaturizante. Sin embargo, en este rango de concentraciones no se observa cambios en las mediciones de DC en el UV lejano y de fluorescencia, lo cual indica que se esta produciendo un fenómeno de disociación de la estructura decaamérica en dos subunidades pentaméricas.

Por otro lado, se observó que en el rango de 2,4-3,5 M GdnHCl la señal de SLS desciende 5 veces coincidiendo con la desaparición de la señal de DC a 222 nm y con una pérdida significativa de intensidad en la señal de fluorescencia. Este resultado se interpretó como un proceso de disociación y desnaturalización con pérdida de estructura secundaria.

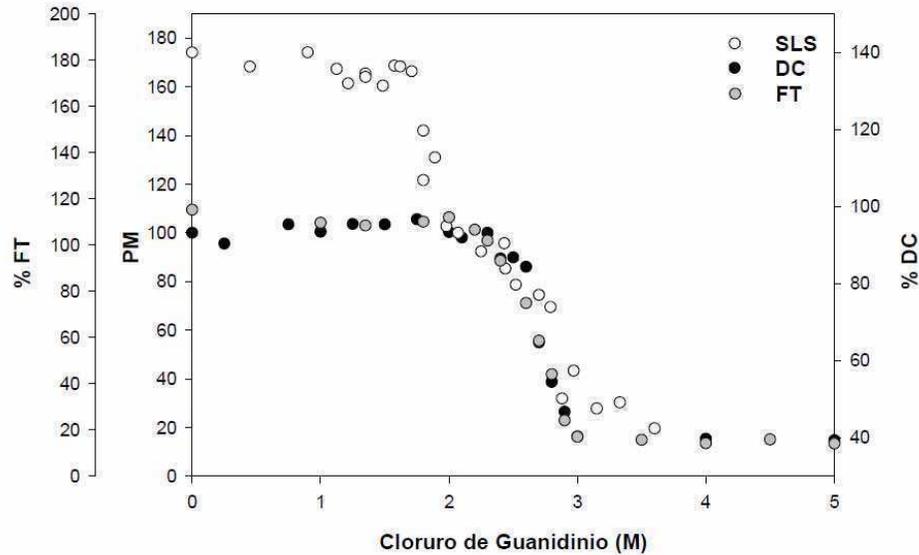


Figura I-6. Superposición de las curvas de desplegamiento de BLS inducido por GdnHCl y monitoreada por SLS/IR/UV, FT y DC (Zylberman, V. 2006).

Se estudio además la estabilidad térmica de BLS, monitoreando la señal de DC a 222 nm aumentando gradualmente la temperatura de la muestra. La temperatura de melting aparente de la proteína (Tma) es de 88°C (figura I-7).

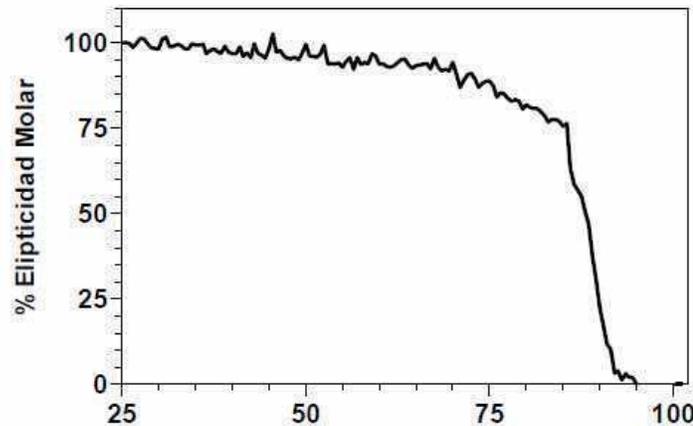


Figura I-7. Estabilidad térmica de la proteína nativa (en PBS ó buffer fosfato pH 7,0). Se midió la variación en la señal de DC UV lejano (a222 nm) en función del incremento de temperatura (de 25 a 100°C a una velocidad de 4 °C/min). Se tomaron medidas de DC cada intervalo de 0,5 °C. La Tma se calculó como el punto medio de la transición.

Los equilibrios de disociación y desnaturalización por GdnHCl estudiados dieron como resultado el modelo que se muestra en la figura I-8.

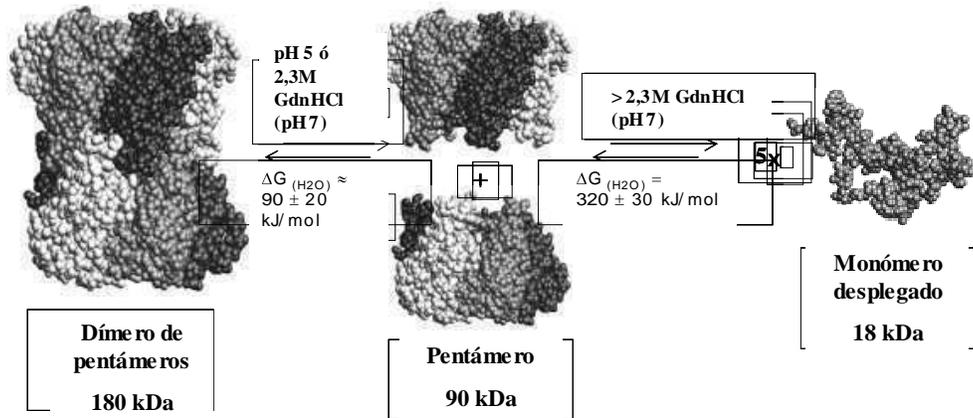


Figura I-8. Mecanismo propuesto de disociación y de desplegamiento de BLS. El dímero de pentámero se disocia en dos pentámeros plegados de 90 kDa cuando la proteína es incubada en un buffer con pH 5 o en un buffer con 2,3 M de GdnHCl. A concentraciones mayores se produce una disociación y desnaturalización concertada de los pentámeros a monómeros desplegados. (figura extraída de (Zylberman, V. 2006)).

El dímero de pentámero se disocia en dos pentámeros de 90 KDa cuando la proteína es incubada en 2,3 M de GdnHCl a pH = 7 o en buffer fosfato a pH = 5. Cuando se aumenta la concentración de agente desnaturizante por encima de esta concentración se produce la disociación y desnaturalización concertada de los pentámeros a monómeros desplegados de 18 KDa. Ambas reacciones son reversibles.

Los ΔG de disociación y desnaturalización fueron calculados a partir de distintas técnicas y los valores fueron: $\Delta G^{\circ}_{\text{disociación}} = 90 \pm 20$ KJ/mol (calculado por SLS) y el $\Delta G^{\circ}_{\text{desnaturalización}} = 320 \pm 22$ KJ/mol (calculado por DC en el UV lejano) (Zylberman, V. *et al.* 2004).

2.3 BLS como inmunógeno.

Otra característica relevante de BLS es su alta inmunogenicidad. BLS fue estudiada inicialmente como un marcador serológico para su utilización en diagnóstico de brucelosis humana y bovina. Más tarde se estudió en detalle su estructura cuaternaria y su estabilidad termodinámica. Asimismo resultó interesante estudiar sus propiedades como inmunógeno. BLS fue utilizada como inmunógeno en forma de proteína recombinante (rBLS) y también como vacuna a DNA (pcDNA-BLS).

Velikovsky y colaboradores demostraron que BLS induce altos títulos de anticuerpos (1/6400) cuando se inmunizan ratones con la proteína recombinante. El título que se obtiene no se modifica notoriamente con las sucesivas inmunizaciones. Esta fuerte respuesta humoral se obtiene aún en ausencia de adyuvantes e indica que la proteína es un inmunógeno muy potente. Por otro lado, cuando se inyectan ratones con un plásmido conteniendo la secuencia de BLS (pcDNA-BLS), se obtiene una alta respuesta tanto humoral como celular. Se obtienen títulos de anticuerpos de 1/200 luego de la primera inmunización y aumentan con las sucesivas inmunizaciones hasta llegar a 1/51200 – 1/102400 luego de la cuarta inmunización, a diferencia de lo que ocurre con la inmunización con rBLS en la que el título obtenido en la primera inmunización es alto y prácticamente no se ve modificado con las inmunizaciones subsiguientes (Velikovsky, C. A. *et al.* 2002).

Se obtuvo protección contra *B. abortus* sólo en los ratones inmunizados con pcDNA-BLS. Este resultado está íntimamente relacionado con el hecho de que sólo en el caso de inmunizaciones a DNA se obtuvo respuesta celular. Esto era esperable sabiendo que en brucelosis, como en otras infecciones bacterianas, la protección parece ser altamente dependiente de la inmunidad mediada por células (Velikovsky, C. A. *et al.* 2002).

Por otro lado rBLS se administró tanto con adyuvantes que inducen mayoritariamente respuesta celular de tipo Th1 (como MPA, *monophosphoril lipid A*) como con adyuvantes que inducen predominantemente respuesta celular de tipo Th2 (Al, *aluminum hydroxide gel* y IFA, *incomplete Freund's adjuvant*). En estos experimentos se logró inducir tanto respuesta humoral como celular, y la respuesta celular fue de tipo mixta Th1-Th2 en todos los casos. Además, se obtuvo un grado significativo de protección cuando se hicieron ensayos de infección en los ratones inmunizados (Velikovsky, C. A. *et al.* 2003).

Se llevaron a cabo estudios con el objetivo de profundizar en la respuesta celular inducida por BLS. Con este objetivo se estudió la capacidad de BLS para activar y madurar células dendríticas y se pudo comprobar que BLS es un potente activador de células dendríticas de médula ósea vía TLR4 (*toll like receptor 4*) (Berguer, P. M. 2009; Berguer, P. M. *et al.* 2006). Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno fundamentales en la iniciación y regulación de la respuesta inmune adaptativa. El TLR 4 pertenece a una clase de receptores de la familia de los TLRs, que se encuentran en la superficie de las células dendríticas y que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Los resultados muestran que la activación de las células dendríticas por parte de BLS es un factor importante en su capacidad antigénica, aunque sabemos

que otras características de BLS como su estructura ordenada y repetitiva y su estabilidad juegan también un rol fundamental en este sentido.

2.4 BLS como proteína transportadora.

BLS fue cristalizada y su estructura tridimensional fue resuelta en tres formas, la forma libre a pH 6,5 y 4,8 y en un complejo con el análogo de sustrato NRP (5-nitro-6-(D-ribitilamino)-2.4(1H,3H)-pirimidinadiona 5) a pH 6,3. Las estructuras de rayos X fueron resueltas por el método de reemplazo molecular usando la estructura previamente conocida de BLS a pH 4,8 como modelo de búsqueda. (Klinke, S. 2007; Klinke, S. *et al.* 2005). Los cristales de BLS-NRP difractaron a un máximo de resolución de 2,90 Å.

Mediante estos estudios de cristalografía se pudo observar que los 10 primeros aminoácidos del extremo amino terminal del monómero de BLS no presentan densidad electrónica debido a que es una zona de mucha movilidad.

Aprovechando que estos aminoácidos no participan en el plegamiento general de la proteína, se construyó una mutante de BLS en la que se generaron dos sitios de digestión en el extremo amino terminal de la proteína para poder clonar distintos péptidos en este sitio (se explica en detalle en Materiales y Métodos). De esta manera se pueden reemplazar los primeros 10 aminoácidos del extremo amino terminal y utilizar a BLS como proteína transportadora de diferentes péptidos (quimeras de BLS) (Laplagne, D. A. 2003; Laplagne, D. A. *et al.* 2004)

Debido a la estructura cuaternaria característica de dímero de pentámeros que presenta BLS se obtiene una distribución repetitiva y ordenada del péptido en estudio (figura I-9).

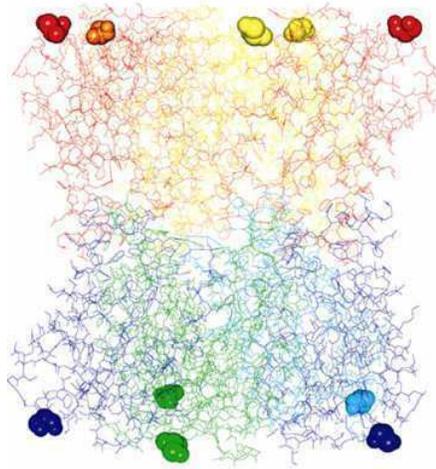


Figura I-9. Estructura de una quimera de BLS. Cada monómero fue identificado con un color distinto y las esferas representan el residuo donde se inserta el péptido de cada monómero. Figura extraída de (Cassataro, J. *et al.* 2007a).

Con este tipo de construcciones (quimeras de BLS) se empezó a estudiar la capacidad de BLS de incrementar la inmunogenicidad contra distintos péptidos y dominios proteicos cuando la proteína de fusión era inyectada en animales. Estas quimeras se utilizaron para estudiar inmunogenicidad en modelo murino y bovino, se estudiaron distintas vías de inmunización y en algunos casos se hicieron ensayos de infección.

Una de las quimeras más estudiadas fue BLS-OMP31, donde OMP31 es un péptido de 27 aa que corresponde al loop expuesto de la proteína de membrana de *B. melitensis*. BLS-OMP31 fue utilizada para inmunizar ratones y se observó que OMP31 aumentaba casi 200 veces su capacidad para generar respuesta humoral al estar unida a BLS. En el caso de la respuesta celular, el nivel de respuesta obtenida en el caso de BLS-OMP31 fue similar al obtenido para rOMP31 (proteína entera) o para rBLS. Los niveles de protección alcanzados contra *B. ovis* fueron estadísticamente similares a los que induce la vacuna disponible *B. melitensis* Rev. 1, y en el caso de *B. melitensis* los niveles de protección no son tan altos (Cassataro, J. 2003; Cassataro, J. *et al.* 2007a).

También se estudió la inmunogenicidad y la capacidad protectora de BLS-OMP31 cuando es utilizada en vacunación a ADN (pCIBLS-OMP31). La respuesta humoral contra OMP31 se ve aumentada con respecto a la obtenida para la construcción pCIOMP31 (construcción a DNA con la secuencia de la proteína OMP31 entera). Sin embargo en la respuesta celular no se vio un aumento tan pronunciado. Se obtuvo una protección muy alta (aún mas que la obtenida para la vacuna disponible) contra *B. ovis* en los ratones inmunizados con pCIBLS-OMP31, sin

embargo el grado de protección no fue tan alto para *B. melitensis* (Cassataro, J. 2003; Cassataro, J. et al. 2007b).

Más recientemente se hicieron estudios de respuesta humoral y de eficacia protectora contra brucelosis ovina. Se inmunizaron carneros utilizando BLS-OMP31 recombinante en dos adyuvantes diferentes (IFA por adyuvante incompleto de Freund y QUIL A) y plásmido pCIBLS-OMP31 administrado por vía intramuscular o utilizando electroporación. Además se inmunizó utilizando la técnica heterogénea de *prime-boost*, inmunizando primero con pCIBLS-OMP31 y luego con proteína recombinante. Se obtuvieron niveles altos de protección para los animales inmunizados con la técnica de *prime-boost* y BLS-OMP31 recombinante en IFA (76 % y 63% respectivamente) (Estein, S. M. et al. 2009).

Otra quimera muy estudiada fue BLS-Ketc1, donde Ketc1 es un péptido utilizado en vacunación contra cisticercosis, una enfermedad causada por un parásito que afecta principalmente cerdos y que causa grandes pérdidas económicas en México. Se probó en vacunación por vía oral en ratones y la protección fue del 98% (Rosas, G. et al. 2006).

BLS también se utilizó como proteína transportadora de dominios proteicos, como BLS-RBD3 y BLS-VP8. RBD3 es un dominio proteico de unión a RNA. Se inmunizaron ratones y se observó un aumento en la respuesta humoral cuando RBD3 es presentada por BLS (Craig, P. O. et al. 2005). VP8 es una proteína de rotavirus bovino. La quimera BLS-VP8 se utilizó para inmunizar ratones y se obtuvo una protección del 100% (Bellido, D. et al. 2009).

2.5. BLS como proteína transportadora de distintos péptidos: proteínas mixtas.

BLS se estudió como proteína transportadora de más de un péptido y se demostró que en este contexto todavía conserva la propiedad de aumentar la inmunogenicidad contra los mismos (Laplagne, D. A. et al. 2004).

Se construyó una molécula de BLS que transporte 5 copias del péptido OMP31 y 5 copias del péptido KETc1, mezclando cantidades iguales de las quimeras BLS-OMP31 y BLS-KETc1 en un buffer PBS, 2 M GdnHCl (condiciones del equilibrio de disociación de BLS) y luego de incubarlas por 2 horas a temperatura ambiente se dializan contra buffer PBS. Las poblaciones se separan por cromatografía de intercambio iónico (MonoQ). Como se puede ver en la figura I-10 A, se obtiene un perfil de elución de tres picos que corresponden a las especies BLS-KETc1, BLS-KETc1-OMP31 y BLS-OMP31. Estos picos se analizaron por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (figura I-10 B) y en isoelectroenfoque (figura I-10 C).

En el gel desnaturalizante se pueden ver las especies constituyentes correspondientes a cada pico. En el pico 1 se observa una banda perteneciente a BLS-KETc1, en el pico 2 se observan dos bandas que pertenecen a BLS-KETc1 y BLS-OMP31 (la cual corre anómalamente como una proteína de más de 20 kDa) y en el pico 3 se puede ver nuevamente a la banda perteneciente a BLS-OMP31 y en forma minoritaria una banda que corresponde a BLS-KETc1 copurificacada. Mediante el análisis del isoelectroenfoque se demostró que el pico 2 corresponde a una sola especie homogénea con un único punto isoléctrico que tiene un desplazamiento intermedio y no a la mezcla de dos especies.

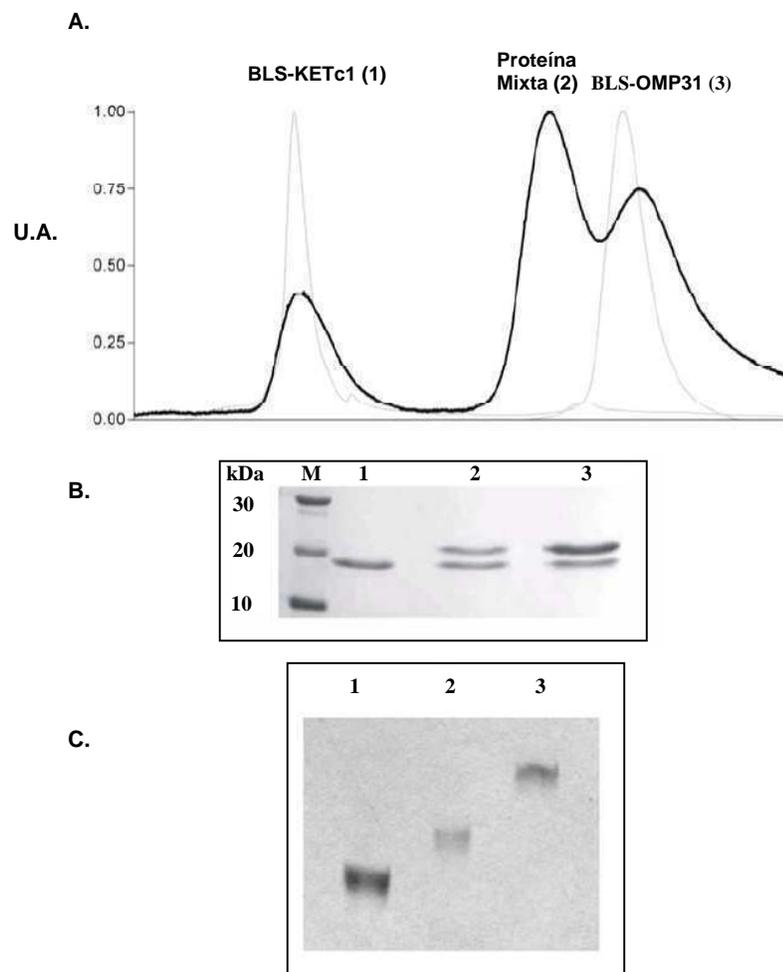


Figura I-10. A Purificación por columna de intercambio aniónico (monoQ) de las proteínas BLS-KETc1, BLS-OMP31 y la mezcla de proteínas mixtas. B Electroforesis en gel desnaturalizante (SDS-PAGE) de los tres picos obtenidos en la purificación. C Isoelectroenfoque de los tres picos (figura extraída de (Laplagne, D. A. *et al.* 2004)).

Una vez purificada y caracterizada la proteína mixta se inmunizaron ratones para testear la respuesta humoral contra ambos péptidos transportados por BLS y los sueros luego de la cuarta inmunización fueron testeados por ELISA.

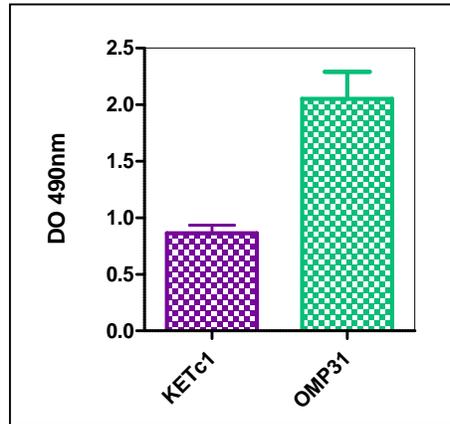


Figura I-11. Ensayo de ELISA de una dilución 1/100 de los sueros luego de la cuarta inmunización con adyuvante.

Como se ve en la figura I-11, los sueros presentaron reactividad contra ambos péptidos. Por lo tanto en este trabajo se probó que BLS es capaz de transportar dos péptidos simultáneamente y se obtiene respuesta inmune humoral contra ambos cuando se inmunizan ratones.

3. Vacunas

En los últimos 100 años, las vacunas han sido una de las herramientas más poderosas para prevenir enfermedades infecciosas. Enfermedades como la viruela han sido erradicadas y otras han sido reducidas a niveles muy bajos en muchas regiones del mundo debido al desarrollo e implementación de las vacunas (como es el caso de la poliomielitis y el sarampión). Aunque se ha avanzado mucho en este campo de estudio, sigue siendo una prioridad el desarrollo de vacunas para prevenir enfermedades infecciosas así como también mejorar la eficacia y la seguridad de vacunas existentes (Leclerc, C. 2003).

Una vacuna, según su definición tradicional, es una sustancia formada por un microorganismo completo, atenuado o muerto, o bien fracciones del mismo, capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera frente a la variante virulenta de dicho microorganismo. La finalidad de las vacunas es la de prevenir y controlar futuras infecciones.

Sin embargo, los retos en este campo se encaminan no sólo a la prevención de enfermedades infecciosas, sino también a evitar patologías crónicas como las enfermedades autoinmunes, o procesos cancerosos de distinta índole. Otro de los desafíos planteados es el desarrollo de vacunas terapéuticas, no para prevenir la enfermedad sino para tratarla. El objetivo de estos nuevos desarrollos, que todavía es muy incipiente, es erradicar la enfermedad o al menos atenuarla en los pacientes afectados, no sólo para prolongar la supervivencia sino también de mejorar la calidad de vida de los individuos afectados.

Las características generales que debe tener una vacuna ideal son:

- Reproducir (mimetizar) una respuesta inmunológica a la de la infección natural.
- Ser efectiva (mas del 90 % de protección).
- Tener mínimos efectos secundarios y ser completamente segura.
- Generar inmunidad persistente y a largo plazo.
- Ser de dosis única y poder ser administrada con otras vacunas.
- Administración no invasiva (vía oral preferentemente).
- Administración precoz en los primeros meses de vida.
- Ser estable a temperatura ambiente.
- Ser de fácil producción y económicamente accesible.

Las vacunas pueden ser subdivididas en dos grupos, vacunas clásicas y vacunas de nueva generación.

3.1 Vacunas clásicas

El grupo de vacunas clásicas está formado por las vacunas inactivadas, compuestas por bacterias, virus o parte de ellos, vacunas vivas atenuadas formadas por bacterias o virus cuya virulencia ha sido reducida y vacunas a subunidades que consisten en fragmentos de proteínas antigénicas pertenecientes a patógenos.

Vacunas inactivadas: Son aquellas que contienen microorganismos enteros o toxinas, inactivados por métodos físicos (como calor) o químicos (utilizando formol, formaldehído u otros) (Salleras, L. 2002a). En este tipo de vacunas los microorganismos están muertos y sólo se conservan intactas las subunidades responsables de generar la inmunidad, con lo cual no se corre el riesgo de que se desencadene la enfermedad (Corbel, M. J. 1997; Laplagne, D. A. 2003). Por otro lado, al no replicarse el microorganismo en el paciente, estas vacunas son menos efectivas, y en general se necesita mayor cantidad de antígeno, varias dosis e inclusive la coadministración de adyuvantes (sustancia que incrementa de manera inespecífica la respuesta inmune a un antígeno) para potenciar la respuesta inmune generada.

Vacunas atenuadas: La principal característica de las vacunas vivas atenuadas consiste en que los agentes inmunizantes pueden replicarse en el organismo sin causar enfermedad. Estas vacunas proporcionan en teoría una vacunación ideal, intensa y duradera sin causar enfermedad. Sin embargo existe la posibilidad de que la atenuación se revierta y los microorganismos vuelvan a ser patogénicos y desencadenen la enfermedad (Nieba, L. and Bachmann, M. F. 2000; Salleras, L. 2002b).

Vacunas a subunidades: Estas vacunas contienen un preparado de subunidades antigénicas que pueden ser lipopolisacáridos, extractos ribosómicos o proteínas purificadas o sintetizadas químicamente. Estas vacunas se suelen emplear cuando han sido identificados y aislados los componentes responsables de la patogenicidad del agente infeccioso y de esta manera se evita el riesgo de desencadenar la enfermedad. Sin embargo, se sabe que la administración de subunidades antigénicas puras solas normalmente da como resultado una respuesta inmune pobre; los antígenos aislados son administrados generalmente con adyuvantes que ayudan a obtener una respuesta inmune más fuerte (Vogel, F. R. 2000).

3.2 Vacunas de nueva generación.

Los avances en biología molecular y en la tecnología del ADN recombinante han permitido el diseño de nuevas vacunas que sean más seguras y capaces de generar una respuesta inmune eficaz y duradera. La mayoría de estas nuevas vacunas están aún en etapa de desarrollo.

Estas vacunas son:

- Vacunas atenuadas mediante modificación genética: están constituidas por patógenos modificados genéticamente de manera que los genes relacionados con su patogenicidad se encuentren mutados, o bien que posean antígenos modificados que desencadenen la respuesta inmune protectora. Este tipo de vacunas está en desarrollo.
- Vacunas anti-idiotipo: son anticuerpos que reproducen la morfología del antígeno, induciendo inmunidad.
- Vacunas génicas: Consiste en la administración de material genético del patógeno. Se utilizan vectores bacterianos, virales o vacunas a ADN desnudo, se encuentran en etapa de desarrollo.
- Vacunas comestibles: Se trata de producción de proteínas antigénicas en plantas comestibles (en desarrollo)
- Vacunas de péptidos sintéticos: Consisten en la copia de la secuencia aminoacídica de las proteínas antigénicas procedentes de patógenos.

Vacunas de proteínas y péptidos recombinantes: Se utiliza la producción de grandes cantidades de proteína por medio de la inserción de su gen en sistemas de expresión bacterianos, vegetales o virales. Ej: Hepatitis B, expresado en bacterias.

El uso de péptidos y proteínas como inmunógenos tienen un problema de costo y baja inmunogenicidad propios de este tipo de vacunas. La administración de proteínas solubles no es por lo general suficiente para generar una respuesta inmune fuerte (Nieba, L. and Bachmann, M. F. 2000), por lo que se hace necesario la aplicación de varias dosis de refuerzo y el uso de sustancias adyuvantes, cuya toxicidad previene su uso en humanos.

4. Relación entre estructura e inmunogenicidad

4.1 Virus like particles como modelo

Hace varias décadas algunos grupos se están dedicando al estudio detallado de algunas moléculas que tienen la capacidad de transportar péptidos y proteínas y aumentar considerablemente la respuesta inmune contra estos. Las VLPs (por *virus-like particles*) son ensamblados supramoleculares que tienen forma de icosaedros o bastoncillos con diámetros en un rango de 25-100 nm (Johnson, J. E. and Chiu, W. 2000). Las VLPs son un tipo de vacuna a subunidad altamente efectiva que mimetiza la estructura de la partícula viral, sin los riesgos de reversión o recombinación, ya que en su gran mayoría carecen de genoma viral. Están compuestas por múltiples copias de una o más proteínas virales estructurales que se ensamblan espontáneamente en partículas multiméricas luego de ser expresadas en forma recombinante, formando una estructura similar al virus auténtico (Delchambre, M. *et al.* 1989; French, T. J. *et al.* 1990; Gheysen, D. *et al.* 1989; Miyanojara, A. *et al.* 1986).

Las VLPs poseen varias características inmunológicas de los virus claves para el desarrollo de una respuesta inmune fuerte. Estas incluyen: una superficie repetitiva, estructura particulada e inducción de la respuesta inmune innata a través de la activación de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Bachmann y colaboradores establecieron que existe una correlación entre el grado de repetitividad y el orden de un epítopo en una molécula y la eficiencia de la respuesta de células B inducida (figura I-12) (Nieba, L. and Bachmann, M. F. 2000). Ellos vieron que a mayor ordenamiento y cantidad de epítopos presentados en una misma molécula transportadora, mayor es la respuesta humoral. De esta manera, pudieron establecer que existe una relación lineal entre el ordenamiento molecular y la respuesta de linfocitos B.

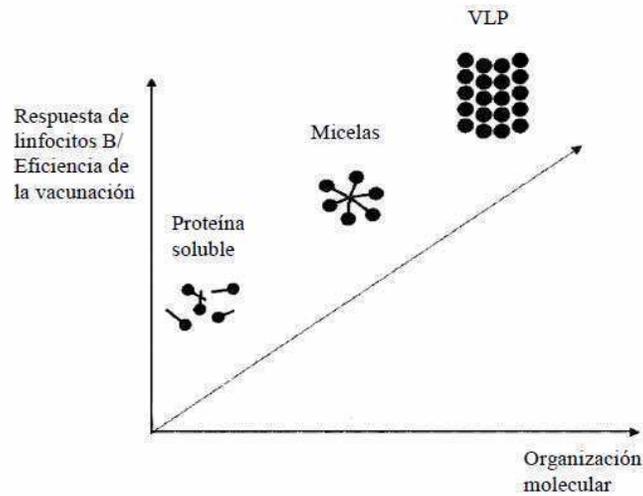


Figura I-12. Relación lineal entre la organización molecular y la respuesta de linfocitos B. (Figura extraída de (Nieba, L. and Bachmann, M. F. 2000))

La coevolución de virus y vertebrados ha resultado en la adquisición por parte del sistema inmune adaptativo de la habilidad de detectar rápidamente, discriminar y responder a estas estructuras repetitivas y ordenadas encontradas en las superficies virales (Bachmann, M. F. and Zinkernagel, R. M. 1996). Esta distribución regular de epitopes induce una eficiente respuesta inmune por entrecruzamiento (crosslink) de los epitopes y las inmunoglobulinas de membrana de las células B, lo que desencadena su activación y la producción de IgM (Bachmann, M. F. *et al.* 1995; Thyagarajan, R. *et al.* 2003). Las proteínas virales expresadas en una forma ordenada y repetitiva son considerablemente más inmunogénicas que en forma soluble, aun más, pueden vencer la tolerancia de las células B (Bachmann, M. F. *et al.* 1993; Justewicz, D. M. *et al.* 1995; Schodel, F. *et al.* 1993). En este mismo sentido se observó que la tolerancia a la proteína RBD fue superada cuando este dominio proteico fue presentado en forma ordenada y repetitiva en la estructura de BLS (figura I-13) (Craig, P. O. *et al.* 2005).

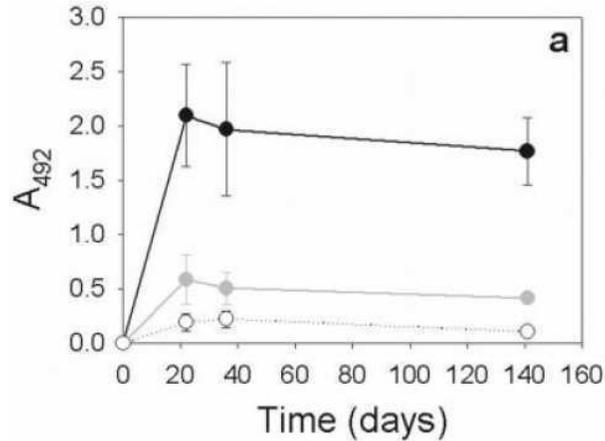


Figura I-13. Evolución de la respuesta anti RBD3 en suero de ratones inmunizados con 1 dosis (gris) o dos dosis (negro) de BLS-RBD3. Como control se inmunizó 2 veces con cantidades equimolares de BLS y RBD3 (blanco). (Figura extraída de (Craig, P. O. *et al.* 2005))

Dintzis utilizó un modelo de haptenos como antígenos unidos a una molécula transportadora y determinó que el espacio óptimo entre antígenos para la activación de células B era de 5 a 10 nm y que de 20 a 25 epitopes sería suficiente para una activación óptima (Dintzis, R. Z. *et al.* 1982).

Hay otras características que hacen que las VLPs sean buenas transportadoras. Una de ellas es su tamaño y otra es su alta estabilidad. Partículas pequeñas de las dimensiones de las VLPs drenan y difunden a los nódulos linfáticos desde el sitio de inyección. De esta manera, pueden entrar en órganos linfáticos secundarios e interactuar directamente con las células B para desencadenar la respuesta de anticuerpos. Por otro lado, estas proteínas son extremadamente estables, las VLPs del bacteriofago PP7 son estables aun cuando son incubadas a una temperatura de entre 85 y 90°C durante 2 minutos (Caldeira, J. C. and Peabody, D. S. 2007). Las Norwalk VLPs tienen una temperatura de melting aparente de 55-60 °C y su estructura secundaria permanece inalterada en un rango de pH de 4 a 6 (Ausar, S. F. *et al.* 2006).

En la bibliografía se puede encontrar que se han producido VLPs a partir de más de 30 virus diferentes que infectan humanos y animales (tabla I-2).

Tabla I-2. Producción de VLPs por diversidad estructural de familias de virus. Abreviaturas: BIV, bovine inmunodeficiency virus; BLV, bovine leucemia virus; FeLV, feline leucemia virus; FIV, feline inmunodeficiency virus; HIV, human inmunodeficiency virus; SIV, simian inmunodeficiency virus; SV40, simian virus-40. Tabla extraída de (Noad, R. and Roy, P. 2003). Extraída de (Noad, R. and Roy, P. 2003)

Familia	Virus	Genoma	Capside / estructura			Ref.
			Envoltura	Proteínas Mayoritarias	Proteínas Minoritarias	
Caliciviridae	Norwalk, Hawaii, Grimsby, Burwash, Landing, White, River, Florida, Enfermedad hemorrágica de conejo, Hepatitis E	SsRNA	No	1	1-2	1
Picomaviridae	Polio	SsRNA	No	4	0	2
Flaviviridae	Hepatitis C	SsRna	Si, 2 proteínas	1		3
Retroviridae	HIV, SIV, FIV, BIV, Visna, FeLV, BLV, rous sarcoma.	SsRNA	Si, 2 proteínas	1	0	4
Paramyxoviridae	Enfermedad de Newcastle	SsRNA	Si, 2 proteínas	4	0	5
Bunyaviridae	Hantaan	SsRNA segmentado	Si, 2 proteínas	1	0	6
Orthomyxoviridae	Influenza A	SsRNA segmentado	Si, 3 proteínas	2	3	7
Birnaviridae	Enfermedad infecciosa de la bursa	DsRNA segmentado	No	3	0	8
Reoviridae	Bluetongue, rotavirus	dsRNA segmentado	No	4	2-4	9
Parvoviridae	parvovirus Porcino, Parvovirus Enteritis de Visón, parvovirus Canina, B19, Adenoasociado	SsDNA	No	1	2	10
Circoviridae	Anemia de pollo, Circovirus porcino	SsDNA	No	1	0	11
Papillomaviridae	papilomavirus	DsDNA	No	1	1	12
Polyoviridae	SV40, JC	DsDNA	No	1	2	13
Hepadnaviridae	Hepatitis B	DsDNA discontinuo	si, 3 proteínas	1	0	14

Referencias: **1.** (Belliot, G. *et al.* 2001; Belliot, G. M. *et al.* 2001; Hale, A. D. *et al.* 1999; Laurent, S. *et al.* 1994; Li, T. C. *et al.* 1997; Pletneva, M. A. *et al.* 1998; Prasad, B. V. *et al.* 1996). **2.** (Brautigam, S. *et al.* 1993). **3.** (Baumert, T. F. *et al.* 1998). **4.** (Delchambre, M. *et al.* 1989; Gheysen, D. *et al.* 1989; Yamshchikov, G. V. *et al.* 1995). **5.** (Nagy, E. *et al.* 1991). **6.** (Bettenbaugh, M. *et al.* 1995). **7.** (Latham, T. and Galarza, J. M. 2001). **8.** (Fernandez-Arias, A. *et al.* 1998; Kibenge, F. S. *et al.* 1999). **9.** (Crawford, S. E. *et al.* 1994; French, T. J. *et al.* 1990; French, T. J. and Roy, P. 1990). **10.** (Brown, C. S. *et al.* 1991; Christensen, J. *et al.* 1994; Hoque, M. *et al.* 1999; Lopez de Turiso, J. A. *et al.* 1992; Martinez, C. *et al.* 1992). **11.** (Nawagitgul, P. *et al.* 2000; Noteborn, M. H. *et al.* 1998). **12.**

(Kimbauer, R. *et al.* 1992; Kimbauer, R. *et al.* 1993; Zhou, J. *et al.* 1991). **13.** (Chang, D. *et al.* 1997; Kosukegawa, A. *et al.* 1996). **14.** (Kunke, D. *et al.* 1993; McAleer, W. J. *et al.* 1984; Miyanojara, A. *et al.* 1986).

Las características estructurales de los virus utilizados son muy diversas. Hay virus que tienen una sola proteína de cápside, otros que tienen múltiples proteínas, con lípidos o sin ellos en su estructura (figura I-14). No todos los virus estudiados son apropiados para su utilización en vacunas, sin embargo muchos de ellos han sido usados para estudiar la estructura y el ensamblado de las VLPs. Lo importante es destacar la variedad de virus que pueden ser potencialmente utilizados para la producción de VLPs y ser buenos candidatos para ser utilizados en vacunas (Noad, R. and Roy, P. 2003).

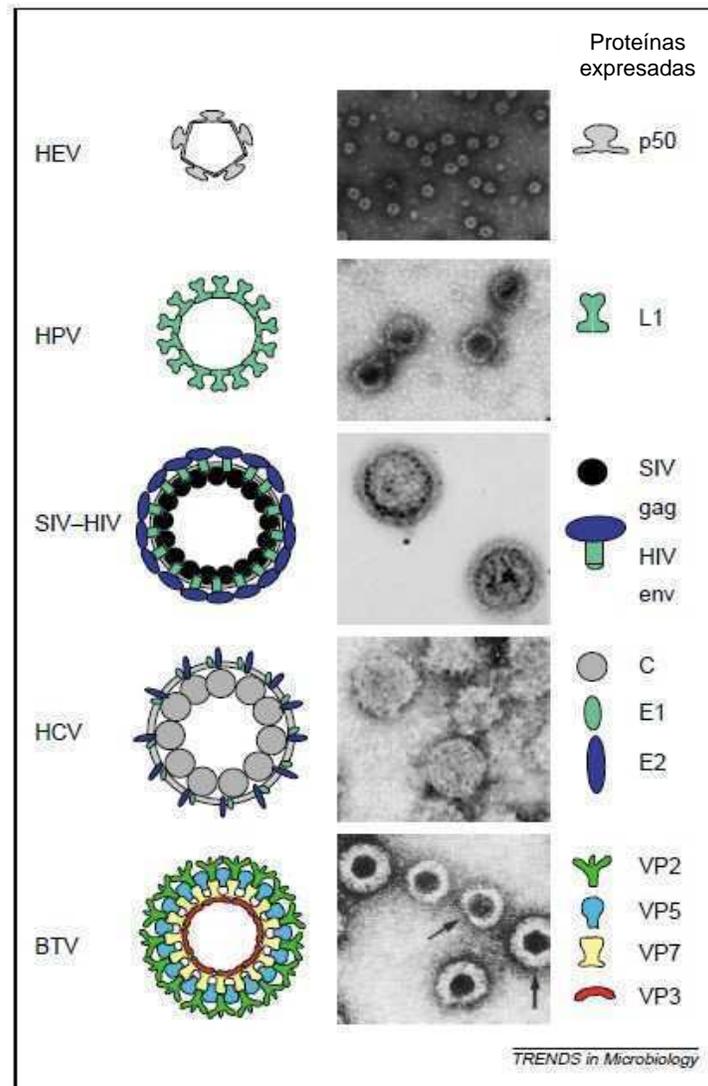


Figura I-14. Estructura de algunas VLPs. Se representan las cápsides virales y las proteínas expresadas de distintos virus. En cada caso se muestra la micrografía electrónica de cada VLP producida. Abreviatura: BTV, bluetongue virus; HCV, hepatitis C virus; HEV, hepatitis E virus; HPV, human papillomavirus 16; SIV-HIV, Irbid VLP between simian immunodeficiency virus gag and human immunodeficiency virus env. (Figura extraída de (Noad, R. and Roy, P. 2003)).

En términos prácticos, que las VLPs mimeticen la estructura de partículas virales usualmente significa que bajas dosis de antígeno (relacionado a subunidades de vacuna) son suficientes para desarrollar una respuesta protectora similar. Además de su capacidad de estimular la respuesta inmune mediada por células B, las VLPs han demostrado ser muy efectivas en la estimulación de proliferación de linfocitos CD4 y linfocitos T citotóxicos (Murata, K. *et al.* 2003; Paliard, X. *et al.* 2000; Schirmbeck, R. *et al.* 1996). Esta es la característica de mayor contribución en la efectividad de las vacunas de VLPs. Si bien muchas VLPs se han utilizado sólo para conocer más

acerca de este campo y no tienen una aplicación práctica, vale la pena destacar que la adición de las VLPs enriquece al arsenal de estrategias de vacunación disponibles.

4.2 Otras proteínas multiméricas utilizadas como transportadoras

Las VLPs son el modelo por excelencia en el estudio de la respuesta inmune en función de la repetitividad de epitopes, sin embargo hay otras proteínas multiméricas que se utilizan como transportadoras.

Desde hace algunos años, varios grupos están dedicados a estudiar a la subunidad B de la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* como transportadora. Esta proteína es un homopentámero no tóxico que fusionado o acoplado a distintos péptidos se utilizó para estudiar la respuesta inmune en ratones (Adotevi, O. *et al.* 2007; Haicheur, N. *et al.* 2003; Haicheur, N. *et al.* 2000; Lee, R. S. *et al.* 1998; Vingert, B. *et al.* 2006).

Por otro lado, Domingo y colaboradores utilizaron la proteína E2 del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* para transportar péptidos y proteínas. El polipéptido de 187 aminoácidos E2 forma dos dominios proteicos y dos *linkers* que constituyen la región N terminal. Sesenta copias de E2 se ensamblan para formar una estructura con simetría icosaedral de un peso molecular de 1,5 MDa. Este grupo modificó la región N terminal creando sitios de digestión para poder insertar distintos péptidos o proteínas y utilizaron las quimeras de E2 para medir respuesta humoral y para ver expresión y localización en *E. coli* utilizando la GFP (*green fluorescence protein*) (Domingo, G. J. *et al.* 2001)

El grupo de Barrios utilizó proteínas de choque térmico (HSP, del inglés *heat shock proteins*) de distintos organismos acopladas a un péptido. Las inmunizaciones dieron como resultado una fuerte respuesta humoral que no se observaba cuando se inmunizaba a los ratones con una mezcla de las HSP y el péptido sin conjugar. En el caso de estas proteínas se presume que los resultados obtenidos son debidos a una mezcla de efectos, la repetitividad del péptido (estas proteínas tienen una estructura de heptámero) y la alta estabilidad de la proteína transportadora, ya que se sabe que son proteínas que son estables a altas temperaturas y condiciones de estrés en los organismos de origen (Barrios, C. *et al.* 1994).

Alta inmunogenicidad, repetitividad, alta estabilidad y tamaño molecular, parecen ser la clave para el éxito de moléculas como las VLPs o las *heat shock proteins*, entre otras. Estas características son sin duda la causa de que este tipo de moléculas induzcan una respuesta humoral y celular alta y que sean buenos candidatos para ser utilizadas como transportadoras de péptidos y proteínas y en el

desarrollo de vacunas para la prevención de enfermedades y para terapias en pacientes con enfermedades diagnosticadas.

Objetivos

Las proteínas normalmente utilizadas como transportadoras de péptidos comparten características comunes. Existen numerosos trabajos que estudian el efecto que la repetitividad de un epítipo en una molécula transportadora genera en la inmunogenicidad contra el mismo. Pero la discusión sigue abierta con respecto a como influye en la respuesta inmune la estabilidad, el tamaño, la repetitividad y la inmunogenicidad intrínseca de la molécula transportadora.

En esta tesis estudiamos a BLS como modelo de proteína transportadora y nuestro objetivo general es estudiar que características propias de BLS son las que la hacen tan versátil como proteína transportadora.

Nos propusimos los siguientes objetivos particulares:

Capítulo I. BLS como proteína transportadora de péptidos.

- Desarrollar y optimizar la obtención de proteínas mixtas con más de un péptido por molécula de BLS.
- Obtener proteínas mixtas con distinta cantidad de péptidos por molécula de BLS.
- Estudiar la inmunogenicidad de los péptidos transportados por BLS y como influye la densidad de los epítopes dentro de la molécula transportadora en la inmunogenicidad de los mismos.

Capítulo II. Relación entre inmunogenicidad y estructura / estabilidad de BLS.

- Obtener mutantes de estabilidad de BLS-OMP31.
- Caracterizar estas mutantes.
- Estudiar como influye la estabilidad de la proteína transportadora en la inmunogenicidad contra el péptido OMP31.
- Estudiar las diferencias de estabilidad entre RibH2 de *Brucella* spp. (BLS) y RibH2 de *Mesorhizobium loti*.
- Estudiar como influyen estas diferencias de estabilidad en la inmunogenicidad contra estas proteínas.

Resultados

Capítulo I

Basándonos en los conocimientos previos de BLS y su enorme versatilidad como transportadora de péptidos y proteínas, nos propusimos ampliar los conocimientos para poder aprovechar al máximo su utilidad. BLS es un buen candidato para estudios de inmunogenicidad contra péptidos y para ser utilizada como plataforma en el desarrollo de vacunas. En esta parte de la tesis nuestro objetivo principal fue mejorar la obtención de quimeras de BLS y obtener proteínas mixtas de BLS transportando más de un tipo de péptido por molécula de BLS o un sólo tipo de péptido en diferentes presentaciones de acuerdo a su número y ubicación en la molécula transportadora. Nos planteamos estos objetivos no sólo a fin de desarrollar mi tesis doctoral sino con el objetivo claro de poder aplicar este tipo de tecnología y aportar conocimientos para la posible utilización de BLS como transportadora de distintas moléculas (péptidos, dominios proteicos, azúcares, etc).

Por lo tanto los objetivos puntuales que nos planteamos en esta parte de la tesis fueron:

- Expresar y purificar distintas quimeras de BLS y evaluar la respuesta humoral contra los péptidos en ratones.
- Explorar la obtención de distintos tipos proteínas mixtas que transportaran más de un tipo de péptido por molécula de BLS.
- Obtener proteínas mixtas con distinto número de un sólo tipo de péptidos por molécula de BLS.
- Estudiar como influye la repetitividad de epitopes por molécula de BLS en la inmunogenicidad contra el mismo.

1. Construcción de quimeras de BLS.

Para el clonado de las distintas quimeras de BLS se diseñó un sistema de tipo “cassette” que permitiera el reemplazo rápido y sencillo del extremo 5’ del gen de la lumazina sintasa (LS), el cual codifica para su extremo N-terminal. Esto permitió disponer de un sistema simple para la creación de las distintas quimeras de interés (Laplagne, D. A. 2003).

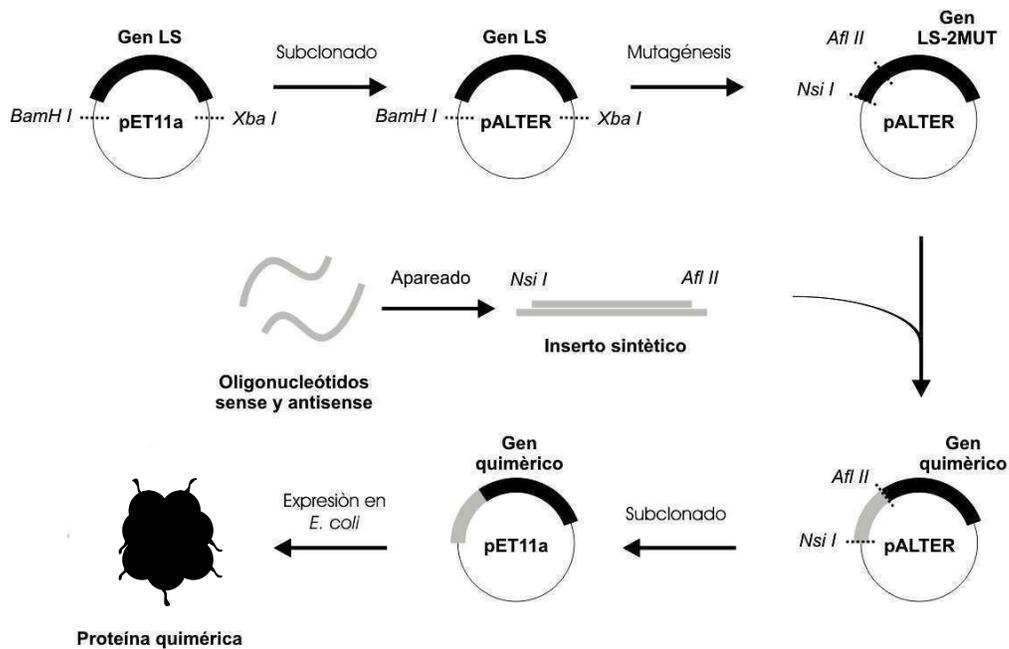


Figura 1. Esquema de diseño del sistema tipo “cassette” que permite la obtención que quimeras de BLS con distintos péptidos. (Figura extraída de (Laplagne, D. A. 2003)).

Para generar este sistema tipo “cassette” se introdujeron dos sitios de digestión (Nsi I y Afl II) en el extremo amino terminal de la secuencia de BLS. De esta manera, por digestión con estas enzimas y posterior ligación con el inserto sintético diseñado con los mismos sitios, se obtiene rápidamente la quimera deseada.

2. Expresión y purificación de quimeras.

BLS y las quimeras fueron clonadas en el vector de expresión pET11a y expresadas en las bacterias BL21 de *E. coli* (figura 1). Se probaron distintas

condiciones de expresión de las proteínas tratando de encontrar la condición óptima para favorecer el mayor nivel de expresión posible de las proteínas en forma soluble.

Se probaron condiciones de expresión ON, o por 4 horas, a 37 o 28 °C e induciendo la expresión con diferentes cantidades de IPTG.

Las muestras fueron procesadas de forma diferente según provinieran de citoplasma o de cuerpos de inclusión y de acuerdo a lo explicado en detalle en Materiales y Métodos. Luego las muestras fueron dializadas contra el buffer de siembra (buffer A: Tris 50 mM, pH = 7,5) y purificadas por una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharosa o MonoQ) como primer paso de purificación. Para la elución de la muestra se hizo un gradiente de NaCl, 1 M concentración final con el buffer A y el buffer B (Tris 50 mM, 1 M NaCl, pH = 7,5). Como podemos ver en el perfil de elución (figura 2 A) obtenemos un pico mayoritario correspondiente a la proteína de interés.

La muestra proveniente de este pico mayoritario fue concentrada y posteriormente purificada por una columna de exclusión molecular (superdex 200) (figura 2 B).

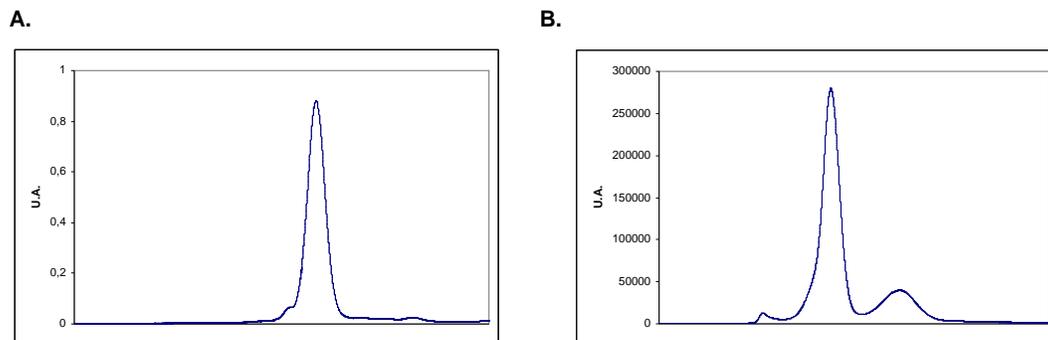


Figura 2. Perfiles de purificación de BLS. A. Primer paso de purificación por Q-Sepharosa. B. Segundo paso de purificación por Superdex 200. U.A., son unidades arbitrarias. Para el primer paso de purificación se utiliza el buffer A: Tris 50 mM, pH = 7,5 y buffer B para el gradiente (buffer A, 1M NaCl). Se utiliza un gradiente de 33 minutos, 1M NaCl final (100% buffer B). Para la columna de exclusión molecular, se utilizó buffer PBS. Para las quimeras de BLS se agrega a los buffers, inhibidor de proteasas y para BLS WT se utiliza DTT 1mM como agente reductor.

Luego de estos dos pasos de purificación la proteína se obtiene con un alto grado de pureza (figura 3).

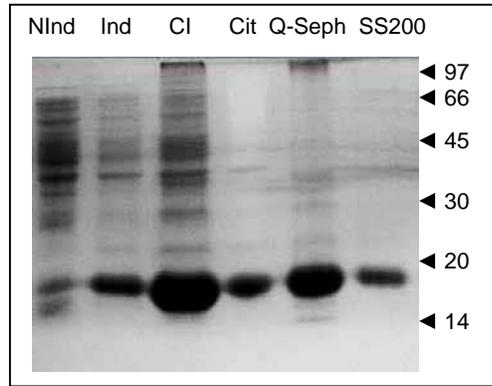


Figura 3. Gel desnaturalizante de poliacrilamida. Pasos de purificación de BLS. En orden de izquierda a derecha, no inducido (NInd), inducido (Ind), fracción de cuerpos de inclusión (CI), fracción de citoplasma (Cit), pico correspondiente a la proteína mayoritaria de la purificación por Q-Sepharosa (Q-Seph), pico correspondiente a la proteína mayoritaria de la purificación por superdex 200 (SS200).

El rendimiento de proteína purificada obtenida al final del proceso varía según la quimera. Algunas quimeras se obtienen de cuerpos de inclusión y otras de citoplasma. La obtención de proteínas de CI mediante la utilización de agentes desnaturalizantes siempre requiere varios pasos para recuperar la proteína plegada y esto implica una pérdida considerable de masa (aunque es muy difícil cuantificar la proteína que había previamente en los cuerpos de inclusión). Además hay que tener en cuenta que una de las razones por las que una proteína va a cuerpos de inclusión es porque se expresa en cantidades tan grandes que la maquinaria celular no llega a plegarla correctamente, con lo cual se podría suponer que se parte de una gran cantidad de proteína. En la tabla 1 se muestra un resumen de las condiciones de expresión y de los rendimientos aproximados de las proteínas utilizadas durante la tesis.

Tabla 1. Condiciones de expresión y rendimientos de BLS, la mutante W22F y 3 quimeras de BLS transportando los péptidos OMP31, KETc1 y AMY.

Proteína	Condición de expresión	Fracción	Rendimiento final (mg/L de cultivo)
BLS	ON – 37°C / 28°C	CI / CITO	60
W22F	ON – 37°C	CI	20
BLS-OMP31	ON – 37°C	CITO	80
BLS-AMY	ON – 37°C	CI	60
BLS-KETc1	ON – 37°C	CI	10

La proteína W22F es una mutante en la cual se reemplazó el único triptofano del monómero de BLS por fenilalanina. Esta mutante se diseñó y utilizó en el

laboratorio en los estudios realizados para caracterizar la estabilidad de BLS y en estudios de actividad enzimática, ya que este triptofano se encuentra en el sitio activo de la enzima y su actividad se ve afectada por el reemplazo de este residuo (Zylberman, V. 2006). En esta tesis vamos a utilizar esta mutante, que sabemos no tiene modificada su estructura secundaria y se expresa y purifica sin dificultades, pero le daremos un uso diferente que explicaremos más adelante.

Durante el proceso de purificación de BLS y de W22F, se agregó DTT a todos los buffers utilizados, ya que estas proteínas tienen un residuo de cisteína en su extremo amino terminal. Estas cisteínas están expuestas al solvente, forman puentes disulfuro y la proteína tiende a formar agregados y precipitar. Con el agregado de DTT esta agregación se revierte y es posible trabajar con las proteínas en forma soluble. Luego de los pasos de purificación la muestra se trata con iodoacetamida para bloquear estas cisteínas. De esta manera, se puede continuar trabajando con más facilidad sin el agregado continuo de agente reductor. Esto no ocurre en el caso de las quimeras ya que en el proceso de reemplazo de los 10 primeros aminoácidos por los distintos péptidos, esta cisteína se deletorea.

En todos los casos se utilizan inhibidores de proteasas (usualmente PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo) durante todo el proceso de purificación y hasta que la proteína es congelada. De otro modo y particularmente en el caso de las quimeras, se produce primero una degradación parcial y luego una degradación total del péptido (Figura 4).

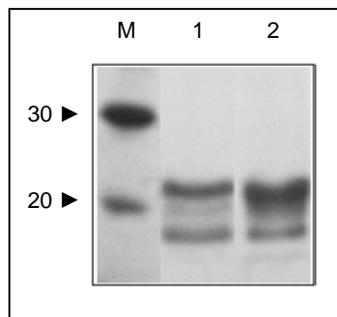


Figura 4. Gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%. Se corrieron dos muestras de BLS-OMP31 puras, guardadas a 4 °C durante 1 semana (calle 1) y a -20 °C durante 1 mes (calle 2), ninguna de las muestras fue tratada con inhibidor de proteasas.

3. Quimeras de BLS.

Con el objetivo de encontrar un buen modelo para el estudio de BLS como transportadora de péptidos se eligieron tres quimeras con distintos péptidos. Se clonaron, expresaron y purificaron las quimeras BLS-KETc1, BLS-AMY y BLS-OMP31. Estos péptidos tienen distintos orígenes y características (tabla 2). Algunas de estas quimeras ya se habían comenzado a estudiar durante la tesis de Licenciatura de Diego Laplagne.

Tabla 2. Características de las quimeras. Longitud del péptido fusionado, peso molecular y punto isoeléctrico de cada quimera.

Quimera	Longitud del Péptido	PM quimera	pl quimera
BLS-OMP31	27 aa	197 kDa	6,52
BLS-KETc1	14 aa	178 kDa	6,69
BLS-AMY	16 aa	189 kDa	6,44

Para las quimeras de BLS se escogieron péptidos que ya estaban siendo estudiados. El interés por estudiar estos péptidos en el contexto de BLS se debía a distintos motivos. En algunos casos se quería obtener anticuerpos contra los mismos para hacer ensayos de protección de enfermedades y en otros casos simplemente para utilizar los sueros en ensayos como microscopía, western blot, etc.

Estos péptidos tienen distintas características. KETc1 es un péptido de 14 aminoácidos que es utilizado, en combinación con otros dos péptidos (GK1 y KETc12), en la vacuna contra cisticercosis porcina (parasitosis causada por *Taenia solium*). Esta es una de las parasitosis más comunes en el hombre y se considera que como el cerdo es el único huésped intermediario una vacuna interrumpiría la transmisión y prevendría la infección en el hombre.

AMY es un péptido de 18 aa que corresponde a una porción del péptido β amiloide. El péptido completo (de 40 a 42 aa) forma las placas amiloides presentes en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y que se supone que juegan un rol central en la cascada de eventos que eventualmente inducen daño y pérdida neuronal en las regiones del cerebro afectadas por esta enfermedad. Desde hace unos años se están tratando de desarrollar terapias para atacar estas placas y mejorar la calidad de vida de los pacientes (Town, T. 2009; Woodhouse, A. *et al.* 2007). Estas terapias son diversas y van desde la utilización de anticuerpos contra el péptido (Pul, R. *et al.* 2011) hasta intentos de vacunas a ADN (Cribbs, D. H. 2010; Qu, B. X. *et al.*

2010), peptídicas (Schenk, D. *et al.* 1999) e inclusive se está probando el péptido β amiloide asociado a VLPs (Chackerian, B. 2010) o a nanopartículas de quitosan, que son microesferas formadas por un biopolímero sintético muy utilizado en inmunizaciones intranasales (Songjiang, Z. and Lixiang, W. 2009).

OMP31 es un péptido de 27 aminoácidos que corresponde a una porción externa de la proteína de membrana externa OMP31 de *Brucella spp.* La quimera BLS-OMP31 fue de las más estudiadas, como explicamos en introducción.

En el laboratorio medimos la señal de dicroísmo circular de las proteínas en el UV lejano y analizamos los espectros como una forma de corroborar el plegamiento correcto de las mismas. Es un criterio de calidad que utilizamos para verificar que los péptidos fusionados a BLS no tienen ningún impacto en el plegamiento general de la proteína. Pudimos ver que los espectros de DC eran prácticamente idénticos (figura 5), por lo tanto podemos decir que la estructura secundaria de BLS no fue afectada luego del agregado de los distintos péptidos estudiados.

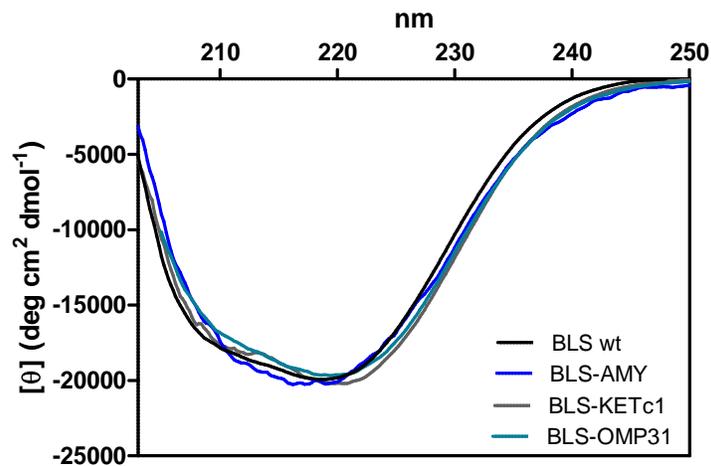


Figura 5. Espectros de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano de BLS wild type, y las quimeras BLS-AMY, BLS-OMP31 y BLS-KETc1. Se graficó elipticidad molar de cada proteína (calculada según explicamos en materiales y métodos) en función de la longitud de onda. Todas las proteínas se utilizaron en una concentración 10 μ M de monómero en PBS. BLS WT se utilizó iodoacetilada y a todas las proteínas se les agregó inhibidor de proteasas.

Habiendo comprobado la alta pureza de las proteínas mediante geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) (calle SS200, figura 3) y que tenían una estructura secundaria conservada, decidimos estudiar la inmunogenicidad de los distintos péptidos transportados por BLS en ratones a fin de evaluar las diferencias en la respuesta humoral.

Los ensayos de inmunización con las quimeras de BLS había sido puestos a punto en el laboratorio y las condiciones elegidas para medir respuesta humoral fueron inmunizando vía intraperitoneal con 50 µgr de proteína por dosis en adyuvante, repitiendo las inmunizaciones 4 veces, cada 20 días.

Para testear la respuesta humoral contra los péptidos transportados, los sueros obtenidos luego de la cuarta inmunización se utilizaron para poner a punto el ensayo de ELISA. A modo de ejemplo mostramos la puesta a punto de los ELISAS realizados con sueros de ratones inmunizados con BLS-KETc1.

Se utilizaron sueros de 2 ratones obtenidos luego de la cuarta inmunización con 50 µgr BLS-KETc1 en adyuvante incompleto de Freund. Para medir respuesta humoral contra KETc1 necesitabamos eliminar de alguna manera la respuesta contra BLS de los sueros policlonales. Con este fin, incubamos los sueros con distintas cantidades de BLS antes de medir respuesta humoral. Para evaluar si los anticuerpos anti BLS habían sido preabsorbidos con la incubación, se sensibilizó la placa de ELISA con 0,2 µgr de BLS por pocillo y luego de 1 hora a temperatura ambiente, se bloqueó con leche descremada (Molico) al 3 % en buffer PBS. Los sueros se preincubaron con 1 y 10 µgr de BLS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 14000 rpm por 3 minutos y se hicieron diluciones de estos sueros preincubados para utilizar en la placa de ELISA. Como control se utilizan las mismas diluciones de los sueros sin incubar.

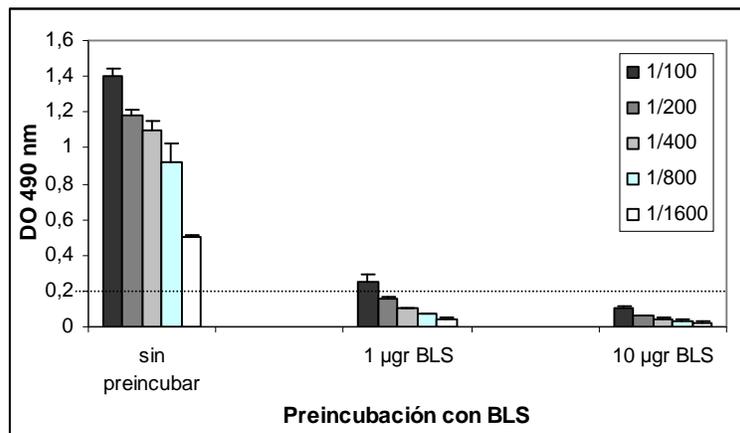


Figura 6. Ensayo de ELISA. Se sensibiliza la placa de ELISA con 0,2 µgr de BLS. Se utilizan los sueros sin incubar y previamente incubados con 1 y 10 µgr de BLS, en distintas diluciones. La línea punteada (DO = 0,2) representa la línea de corte para las respuestas positivas.

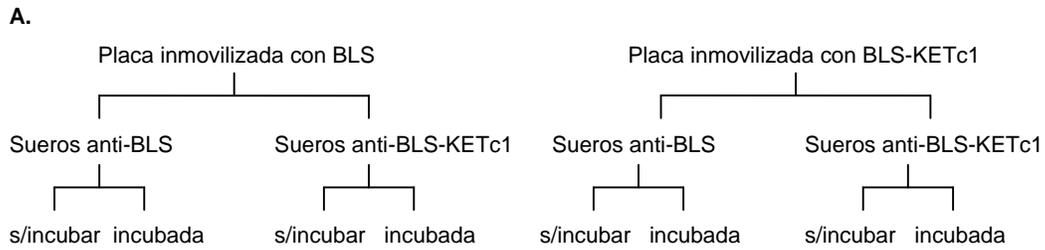
Como vemos en la figura 6 al incubar los sueros con BLS la señal de DO a 490 nm disminuye y llega a valores negativos en los sueros preincubados con 10 µgr de BLS. De esta forma comprobamos que esta técnica sirve para capturar los anticuerpos

contra BLS presentes en los sueros y así eliminar del ensayo la señal que corresponde a la respuesta humoral contra BLS.

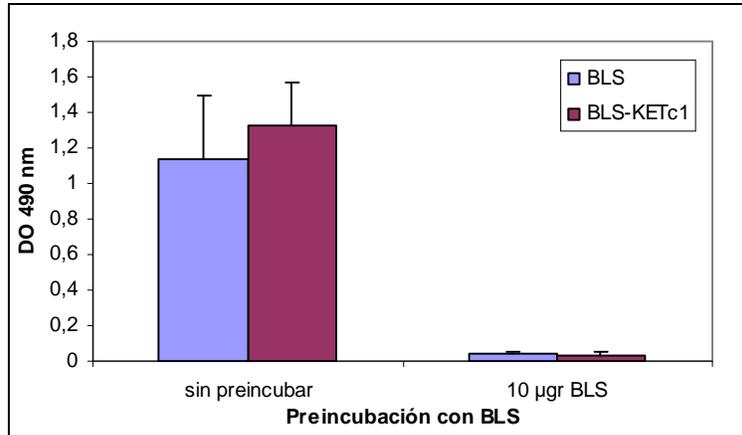
Una vez comprobado que la preincubación con 10 µgr de BLS es la más adecuada para eliminar la señal correspondiente a la respuesta humoral contra BLS, quisimos probar si podíamos medir la respuesta contra KETc1 de manera confiable. Para ello la placa de ELISA se sensibilizó con 0,2 µgr de BLS (figura 7 B) o de BLS-KETc1 (figura 7 C), utilizamos cuatro sueros (correspondientes al sangrado de la cuarta dosis de inmunizaciones con BLS o con BLS-KETc1) en una dilución 1/100, y medimos la señal de DO a 490 nm de los sueros sin preincubar y preincubados con 10 µgr de BLS (esquemático en la figura 7 A).

Analizamos la respuesta humoral contra BLS en sueros de ratones inmunizados con BLS o con BLS-KETc1. Sensibilizamos la placa con 0,2 µgr de BLS y utilizamos una dilución 1/100 de los sueros preincubados o sin preincubar con BLS y medimos la señal de DO a 490 nm. En la figura 7 B podemos ver que la señal de los sueros de ratones inmunizados tanto con BLS como con BLS-KETc1 disminuye hasta valores negativos cuando los sueros con preincubados con BLS. Es decir que como ya habíamos visto con las diluciones seriadas de los sueros, logramos preabsorber los anticuerpos anti BLS de los sueros.

Una vez probado que la señal que corresponde a la respuesta humoral contra BLS es eliminada de los sueros con la preincubación con BLS, queremos ver que ocurre con la respuesta humoral contra KETc1 que es el parámetro que estamos interesados en medir. Para esto sensibilizamos la placa con BLS-KETc1 y fueron testeadas las diluciones 1/100 de los mismos sueros preincubados con BLS. Como vemos en la figura 7 C, la señal de los sueros de ratones inmunizados con BLS, baja hasta valores negativos cuando se los preincuba con BLS. Sin embargo, en los sueros de ratones inmunizados con BLS-KETc1, la señal de DO disminuye pero mantiene valores positivos, lo que nos indica que está señal corresponde exclusivamente a la respuesta humoral contra KETc1. Por lo tanto, esta era una forma confiable de medir respuesta humoral contra el péptido sin que interfiera la señal que corresponde a la respuesta humoral contra BLS.



B.



C.

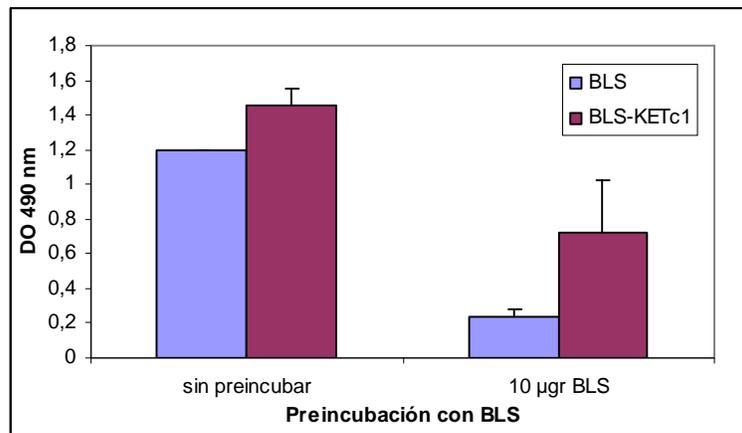


Figura 7. A. Esquema de los ELISAS realizados con sueros provenientes de la cuarta inmunización con BLS o con BLS-KETc1. B. Resultados del ELISA de la placa inmobilizada con BLS. C. Resultados del ELISA de la placa inmobilizada con BLS-KETc1.

Luego tratando de encontrar un protocolo más sencillo probamos medir la respuesta humoral de los sueros contra KETc1 sensibilizando la placa con el péptido KETc1 y comparando con los resultados obtenidos con el protocolo anterior. Esta comparación es importante para estar seguros de que los ensayos de ELISA utilizando los péptidos para sensibilizar la placa son confiables, ya que es muy común que los péptidos tiendan a deformarse cuando se pegan a la placa y no sean reconocidos por

los anticuerpos presentes en los sueros. De esta manera la señal que se obtiene es más baja que la real y se puede interpretar el resultado como una respuesta humoral menor. Entonces, sensibilizamos la placa con 100 ngr de péptido KETc1 por pocillo diluído en buffer carbonato de sodio 63,5mM pH 9,6, durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de bloquear la placa utilizamos los sueros de ratones inmunizados con BLS-KETc1 diluídos 1/100, sin preincubar con BLS y comparamos la señal de DO a 490 nm de estos sueros con la señal obtenida en los pocillos en los que se había inmobilizado BLS-KETc1 y para los cuales los sueros en una dilución 1/100 habían sido preincubados con BLS como hicimos anteriormente. Como control se utilizaron los sueros sin incubar en una dilución 1/100.

En este ensayo de Elisa vemos nuevamente como disminuye la señal de DO cuando los sueros anti-BLS-KETc1 son preincubados con BLS. Podemos observar que no existe una diferencia significativa entre las señales de DO obtenidas cuando sensibilizamos la placa con BLS-KETc1 (y preincubamos los sueros con BLS) y cuando inmobilizamos con péptido KETc1 (y utilizamos los sueros sin preincubar). Por lo tanto en los siguientes ELISAS se va a utilizar péptido para sensibilizar las placas de ELISA, ya que este protocolo es más directo y confiable.

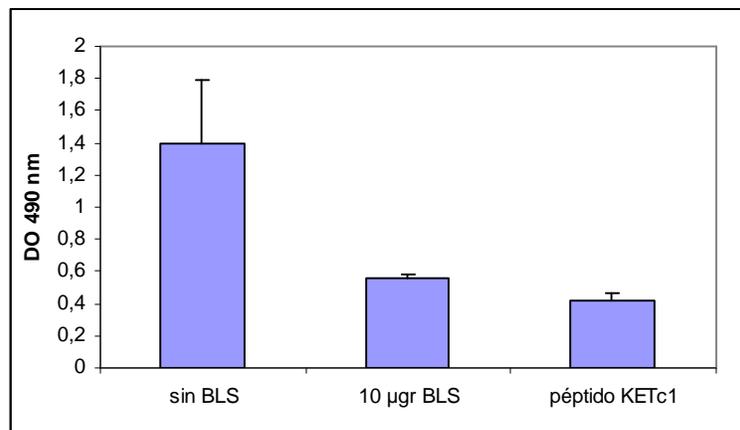


Figura 8. Ensayo de ELISA realizado en distintas condiciones. Sensibilizando la placa con BLS-KETc1 y utilizando los sueros sin incubar con BLS (en el primer caso), e incubando con 10 µg de BLS (en el segundo caso). En el tercer caso se sensibilizó la placa con péptido KETc1. En todos los casos los sueros se utilizaron en una dilución 1/100.

A continuación quisimos comparar las respuestas humorales generadas contra los péptidos OMP31, KETc1 y AMY, de los sueros de ratones obtenidos al inmunizar con estos péptidos fusionados a BLS.

Inmunizamos 5 ratones BALB/c con 50 µgr de las quimeras BLS-OMP31, BLS-KETc1 y BLS-AMY utilizando adyuvante (según se explica en Materiales y Métodos) y por vía intraperitoneal. Mediante ensayos de ELISA de los sueros obtenidos luego de

la cuarta inmunización, estudiamos la respuesta humoral contra los péptidos (figura 9). Utilizamos los péptidos para sensibilizar la placa y los sueros se utilizaron en una dilución 1/100.

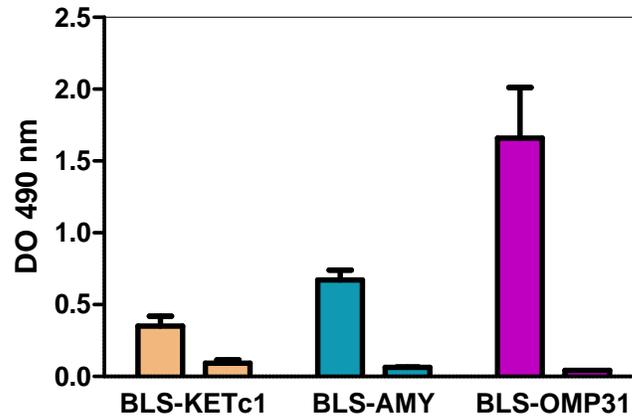


Figura 9. ELISAs de los sueros obtenidos luego de la cuarta inmunización. Se utilizaron los sueros 1/100, y los péptidos KETc1, OMP31 y AMY en buffer carbonato de sodio pH 9, 6 para inmovilizar en la placa de Elisa. En la figura se muestra la densidad óptica medida a 490 nm de los sueros contra KETc1, OMP31 y AMY y los respectivos sueros preinmunes.

Como podemos ver en la figura 11 la respuesta humoral contra los péptidos es diferente en cada caso, para el péptido OMP31 fue notoriamente mayor que para AMY y KETc1 y de acuerdo a la bibliografía consultada se pudo obtener respuesta humoral contra los péptidos presentados por BLS cuando en general la respuesta contra los péptidos solos es pobre o nula.

En el caso de KETc1, el grupo de Edda Sciutto de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México) demostró que el péptido KETc1 sólo, genera muy baja respuesta humoral, mientras que cuando es transportado por BLS esta se incrementa (Sciutto, E. *et al.* 2005).

OMP31 se estudió extensamente como proteína recombinante y como péptido fusionado a BLS. Se estudió la respuesta humoral anti OMP31 de sueros de ratones inmunizados con BLS-OMP31 que dieron un título menor que los sueros de ratones inmunizados con OMP31 entera recombinante. (Cassataro, J. 2003; Cassataro, J. *et al.* 2007a).

Petrushina y colaboradores demostraron que se necesitan varias dosis de una concentración alta del péptido β amiloide para generar respuesta humoral y obtener un buen efecto terapéutico (Petrushina, I. *et al.* 2007), sin embargo otros autores advierten que un porcentaje de los pacientes inmunizados con el péptido en adyuvante, presentaron inflamación cerebral consistente con una meningoencefalitis aséptica (Check, E. 2002; Town, T. 2009).

La utilidad de BLS como transportadora de péptidos es clara pero cada péptido fusionado a BLS se comporta de manera diferente y es necesario el estudio detallado de la respuesta inmune para dilucidar si puede ser útil para ser utilizado en vacunación o en alguna otra aplicación en cada caso en particular.

4. Proteínas mixtas: BLS como proteína transportadora de más de un péptido.

BLS ya fue estudiada como transportadora de más de un péptido (Laplagne, D. A. *et al.* 2004) y se comprobó que transportando 5 péptidos KETc1 en un pentámero (o cara) de la molécula y 5 péptidos OMP31 en el otro pentámero, todavía conserva la capacidad de aumentar la inmunogenicidad de los péptidos transportados cuando la proteína mixta es utilizada para inmunizar ratones.

En este trabajo de tesis queremos utilizar a BLS como modelo de estudio de proteína transportadora y para este fin es necesario encontrar la mejor quimera que sirva como modelo para los experimentos subsiguientes.

Estudiamos varias quimeras para obtener proteínas mixtas en las que una molécula de BLS transportara 2 péptidos diferentes o para modificarla con el fin de que transportara una cantidad controlada de péptidos. Para poder formar proteínas mixtas a partir de dos quimeras, la característica más importante que deben tener es un punto isoeléctrico lo suficientemente diferente para que se puedan separar por cromatografía y visualizar dos bandas cuando se quiere constatar la formación de las proteínas mixtas mediante un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). En este sentido BLS-OMP31 es una buena candidata porque tiene un desplazamiento anómalo y corre como una proteína de mayor peso molecular en este tipo de geles. Para obtener una buena separación por monoQ, en cada caso, cada par de quimeras debe ser estudiado.

Ya sabíamos que se habían obtenido con éxito proteínas mixtas a partir de las quimeras BLS-OMP31 y BLS-KETc1, pero seguimos buscando opciones e intentando encontrar la mejor combinación de quimeras para utilizar como modelo en este trabajo de tesis, tuvimos algunos intentos frustrados en la obtención de proteínas mixtas.

Para obtener estas proteínas mixtas y poder evaluar cada una seguimos un esquema (figura 10) que fue el mismo que se utilizó para la obtención de las proteínas mixtas BLS-OMP31-KETc1.

Nuestro grupo estudió en detalle los equilibrios de disociación y desnaturación de BLS. Cuando se incubaba la proteína en un buffer fosfato con una concentración 2 M GdnHCl, se produce disociación de los pentámeros. En este equilibrio de disociación se obtienen pentámeros plegados sin que su estructura secundaria se vea modificada. Si la proteína es luego incubada en buffer PBS sin GdnHCl los pentámeros se reasociaban recuperando la estructura de dímero de pentámero original (Zylberman, V. *et al.* 2004).

Entonces la estrategia que utilizamos para obtener las proteínas mixtas fue mezclar cantidades iguales de ambas quimeras en un buffer PBS, 2 M GdnHCl y luego de incubarlas por 2 horas a temperatura ambiente se dializan contra buffer PBS. De esta manera se obtiene una mezcla de dímeros de pentámeros pertenecientes a las quimeras originales (cuyos pentámeros se vuelven a reasociar) y de la proteína mixta (figura 10).

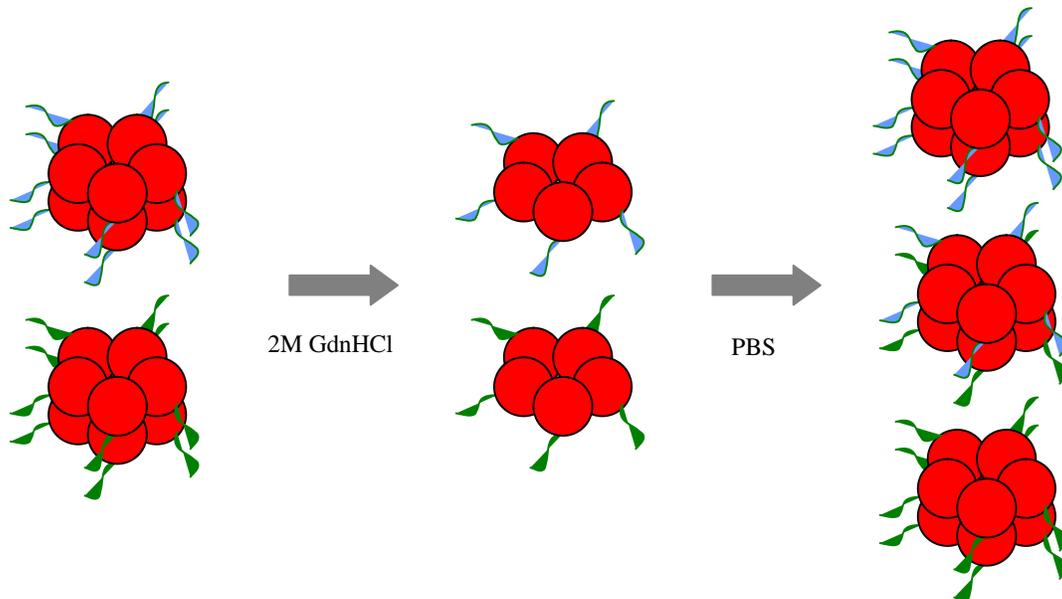


Figura 10. Esquema de formación de proteínas mixtas. Las quimeras se incuban en un buffer PBS / GdnHCl 2M durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego la mezcla se dializa contra PBS para formar la proteína mixta y las quimeras originales que se reconstituyen.

Utilizando este esquema intentamos construir distintas proteínas mixtas a partir de quimeras. Para obtener BLS-OMP31-AMY, mezclamos las quimeras BLS-OMP31 y BLS-AMY en cantidades equimolares para obtener una proteína mixta que transporte 5 péptidos de AMY en una cara de la molécula y 5 péptidos de OMP31 en la otra cara.

Mezclamos las quimeras en las condiciones descritas anteriormente y luego de inducir la reasociación de los pentámeros dializamos la muestra en buffer de siembra y separamos las tres especies en una columna de intercambio aniónico, monoQ. Obtuvimos un sólo pico que fue analizado por gel desnaturante de poliacrilamida, donde pudimos ver dos bandas pertenecientes a las dos especies. En el caso de esta proteína mixta la resolución de la columna monoQ no fue suficiente para separar las tres especies, ya que eluyeron como un sólo pico (resultados no mostrados).

Para cada par de quimeras elegidas las condiciones de disociación son ensayadas en detalle, debido a que hay diferencias entre las proteínas y a veces este equilibrio está un poco desplazado. De esta manera, no siempre se logra la disociación completa de las quimeras en las condiciones descritas anteriormente y hay que poner a punto la disociación para que esto no afecte el rendimiento de las proteínas mixtas.

Decidimos estudiar la formación de una proteína mixta construida a partir de la quimera BLS-OMP31 y la mutante de BLS, W22F. No pudimos obtener proteínas mixtas disociando en 2M GdnHCl y tuvimos dos picos correspondientes a las dos quimeras y ningún pico intermedio cuando corrimos la muestra en monoQ luego de la reasociación. Cuando analizamos estos picos en un gel desnaturante de proteína comprobamos que no había formación de proteínas mixtas (figura 11). Probamos distintas condiciones de desnaturalización (2, 15; 2,17; y 2,2 M de GdnHCl en el buffer de disociación) hasta encontrar la concentración de GdnHCl en la cual ambas proteínas se disociaban (2,2 M GdnHCl) y se producía la formación de proteínas mixtas en el paso de reasociación.

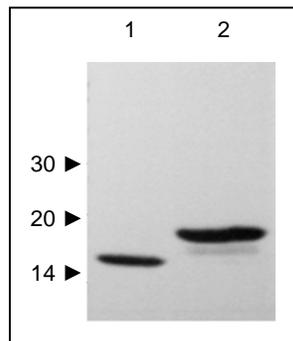


Figura 11. Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15 %. La calle 1 y la calle 2 corresponden al primer pico (W22A) y al segundo pico (BLS-OMP31) obtenidos en la purificación por monoQ de la mezcla de quimeras tratadas en buffer PBS 2 M GdnHCl y luego dializadas contra buffer PBS, para obtener proteínas mixtas.

4.2. Relación repetitividad / inmunogenicidad del epítope transportado por BLS.

4.2.1. Estrategia para la formación y la obtención de proteínas mixtas:

La pregunta más importante que queremos responder en esta parte de la tesis es que impacto tiene en la inmunogenicidad, la densidad y el ordenamiento de un péptido transportado por BLS.

Para contestar esta pregunta decidimos trabajar con la proteína mixta W22F:BLS-OMP31, construida a partir de la quimera BLS-OMP31 y de la mutante de W22F.

BLS-OMP31 es la mejor candidata para utilizar como modelo por varios motivos. Su respuesta humoral fue extensamente estudiada (como explicamos en introducción) y sabemos que OMP31 genera una respuesta humoral alta en ratones cuando es transportada por BLS (figura 9). Los procesos de expresión y purificación dan como resultado una proteína pura de calidad y en cantidad (80 mgr/litro de cultivo). Algunos de los procesos de formación de proteínas mixtas llevan a la pérdida de gran cantidad de proteína o a la formación de especies diferentes a la que queremos obtener, como explicaremos más adelante, por lo tanto es importante partir de una cantidad de masa elevada para obtener resultados que puedan ser evaluados.

Por otro lado W22F, que tiene mutagenizado el único Trp del monómero de BLS no emite fluorescencia en el rango de emisión de este aminoácido.

Por otro lado utilizando sólo una quimera, la proteína mixta transporta sólo un péptido y esta proteína mixta es más adecuada para el fin que perseguimos ya que en este caso sólo nos interesa la inmunogenicidad contra un péptido, presentado con densidades diferentes en cada proteína mixta.

Nos propusimos obtener dos tipos de proteínas mixtas distintas. Una que presentara 5 copias del péptido OMP31 en un pentámero (o cara) de la molécula y ninguna copia en el otro pentámero; y otro tipo de proteína mixta en la que se presentara sólo un péptido OMP31 por molécula transportadora. La ventaja de utilizar a la mutante W22F como parte de estas proteínas mixtas, es que los monómeros que tengan esta mutación (y por lo tanto no tengan péptido) no van a emitir fluorescencia, lo cual nos va a ser de extrema utilidad en el momento de identificar y caracterizar las proteínas mixtas obtenidas.

La estrategia que seguimos para obtener estas proteínas mixtas fue utilizar los equilibrios de disociación (igual que para las proteínas mixtas BLS-OMP31-AMY y

BLS-OMP31-KETc1 explicadas anteriormente) y de desnaturalización de BLS en presencia de cloruro de guanidinio, explicados en detalle en la introducción. El comportamiento de BLS-OMP31 en cloruro de guanidinio fue estudiado también en detalle y es el mismo que se observa para BLS (Laplagne, D. A. 2003).

Así, utilizando estos equilibrios podemos obtener proteínas mixtas por disociación (equilibrio 1) o por desnaturalización (equilibrio 2) dependiendo de que concentración de cloruro de guanidinio utilicemos (figura 12).

Estas proteínas mixtas por disociación tendrían una cara de la molécula decorada con 5 péptidos y la otra cara sin péptidos, a diferencia de las proteínas mixtas obtenidas anteriormente en las que cada pentámero de BLS transportaba un péptido diferente.

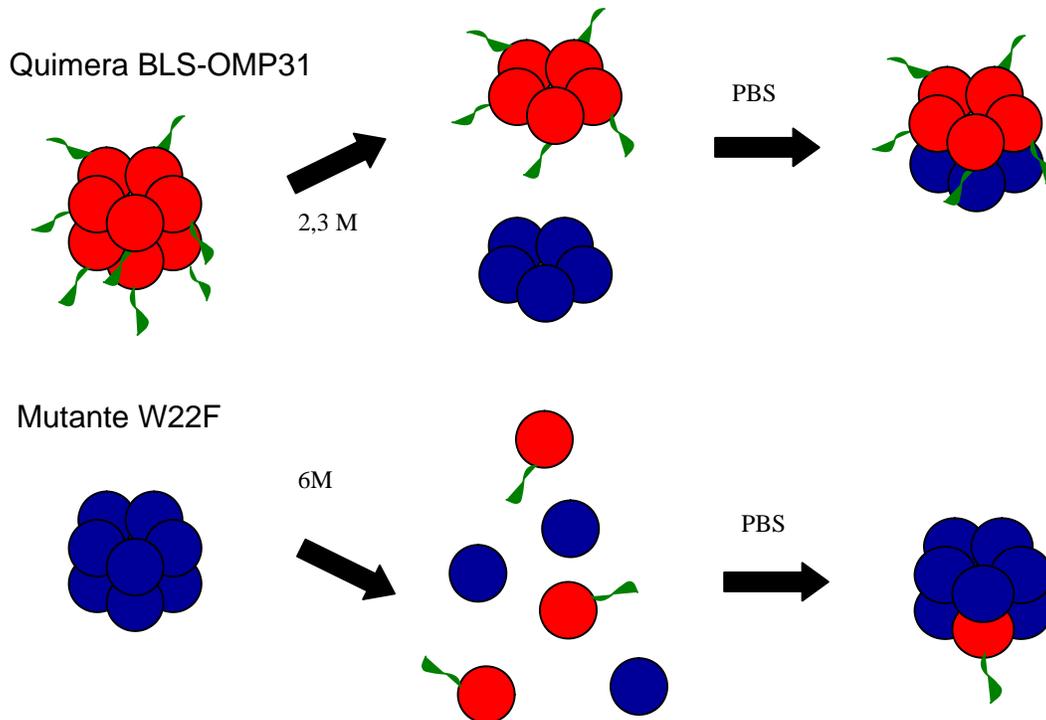


Figura 12. Estrategias para la obtención de proteínas mixtas por disociación (en 2,3 M GdnHCl) y por desnaturalización (en 6M GdnHCl).

Para la obtención de proteínas mixtas por disociación mezclamos cantidades iguales de BLS-OMP31 y W22F y las dializamos en buffer PBS, 2,3 M GdnHCl. En estas condiciones las dos proteínas se disocian en pentámeros y obtenemos una mezcla de pentámeros de las dos especies. Luego por diálisis en PBS, se produce una reasociación de los pentámeros. En este paso, como ya explicamos anteriormente, vamos a obtener una mezcla de tres poblaciones de proteínas. La proteína mixta que

queremos obtener, formada por un pentámero de BLS-OMP31 y un pentámero de W22F, y además se van a reconstituir las proteínas originales, ya que sus pentámeros también se van a reasociar.

En el caso de las proteínas mixtas por desnaturalización, la obtención de la especie con sólo un péptido de OMP31 por molécula transportadora es mucho más compleja. En este caso, las proteínas originales se mezclan en 6 M GdnHCl, produciéndose disociación y desnaturalización concertada de ambas especies a monómeros desplegados. Vamos a obtener una mezcla de monómeros desnaturalizados de las dos proteínas. Luego por diálisis en PBS se produce un replegamiento y una reasociación aleatoria de los monómeros. De esta manera, la población que obtenemos en este caso es mucho más heterogénea. Para tener más probabilidades de obtener la especie que necesitamos, con un sólo péptido de OMP31 por molécula de BLS, mezclamos las proteínas originales en una proporción W22F:BLS-OMP31 9:1. El rendimiento de este tipo de proteínas mixtas es bastante bajo, ya que la población que queremos obtener es sólo una fracción pequeña dentro de todas las poblaciones que se forman. Además el rendimiento del replegamiento siempre es bastante más bajo que para el caso del proceso de disociación y reasociación.

Luego de obtener estas dos mezclas de poblaciones por medio de estos tratamientos, nos concentramos en separar y caracterizar las poblaciones obtenidas a fin de identificar las proteínas mixtas que queríamos obtener. Como mostraremos más adelante se separaron las poblaciones utilizando una columna mono Q y a las fracciones obtenidas se les midió fluorescencia con el fin de caracterizarlas e identificarlas.

4.2.2. Obtención y selección de proteínas mixtas.

Como explicamos las proteínas BLS-OMP31 y W22F eran las mejores candidatas para formar las proteínas mixtas. Además de las características de cada una mencionadas con anterioridad, ambas proteínas tenían puntos isoeléctricos suficientemente distintos para ser separadas por una columna de intercambio aniónico. Además ambas proteínas corren en un gel desnaturalizante de poliacrilamida con una diferencia de desplazamiento que hace posible la posterior visualización de la formación de las proteínas mixtas por medio de este método sencillo, como mostramos en la figura 11.

4.2.2.1. Proteínas mixtas por disociación.

En la figura 13 mostramos el perfil de elución de las proteínas originales y de la mezcla de proteínas mixtas obtenidas luego del tratamiento. Las proteínas originales tienen perfiles de elución distintos entre sí y con respecto a la proteína mixta, lo cual permite una buena separación de las especies obtenidas luego de la reasociación de pentámeros. Las tres fracciones colectadas son corridas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida, donde podemos ver que especies conforman cada pico (figura 14).

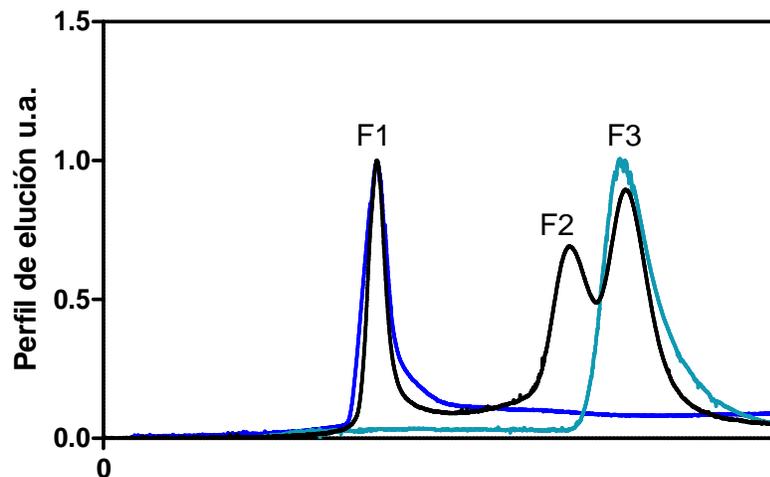


Figura 13. Perfil de elución de las purificaciones de W22F (azul), BLS-OMP31 (celeste) y la mezcla de proteínas mixtas obtenidas (negro). En la corrida de las proteínas mixtas, se colectaron las tres fracciones indicadas como F1, F2 y F3, para ser analizadas e identificadas.

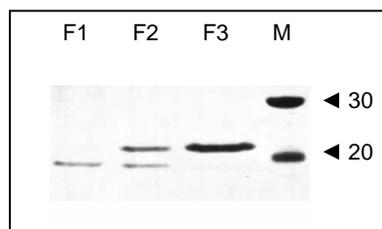


Figura 14. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15 % (SDS-PAGE). Fracciones F1 (calle 1), F2 (calle 2) y F3 (calle 3) correspondientes a las obtenidas en la purificación por mono Q y marcador de peso molecular (calle 4).

Al final del proceso, luego del paso de purificación recuperamos entre un 70 y un 75 % de proteína total. En la tabla 3 mostramos los porcentajes obtenidos de cada proteína reasociada. Los rendimientos de la recuperación de las proteínas siempre son mayores que el que obtenemos para la proteína mixta.

Tabla 3. Rendimiento de cada proteína luego de la purificación. El 100 % equivale al total de proteína recuperada luego de la purificación.

Proteína	Porcentaje
W22F	38
Proteína mixta	16
BLS-OMP31	46

4.2.2.2. Proteínas mixtas por desnaturalización.

La obtención de este tipo de proteína mixta es un proceso mucho más complejo. Durante los procesos de desnaturalización y renaturalización se pierde un porcentaje muy alto de proteína total y luego del proceso de separación la población que nos interesa representa un porcentaje muy bajo con respecto a la cantidad de proteína original utilizada. Debido a esto, nos llevó bastante tiempo encontrar las mejores condiciones en las que se viera favorecido el rendimiento para la formación de estas proteínas mixtas.

En el primer protocolo utilizado para la formación de proteínas mixtas por desnaturalización, las proteínas se dializaban juntas en 6 M GdnHCl y luego de un período de incubación de 2 a 3 horas a temperatura ambiente se dializaban contra PBS para renaturalizarlas. Luego de ese proceso la muestra era centrifugada y la fracción soluble recuperada dializada contra el buffer de siembra (buffer A) y purificada en una columna de intercambio aniónico, monoQ. El rendimiento de proteína mixta obtenida en este proceso, luego de la separación e identificación es de aproximadamente 8 %.

Decidimos probar distintos protocolos de replegamiento para encontrar una condición que mejorara el rendimiento. Probamos primero con las proteínas por separado para simplificar la medición de los rendimientos. Buscábamos lograr un replegamiento mas lento que minimizara la formación de microagregados y favoreciera la obtención de proteína correctamente plegada. Evaluamos distintos protocolos, partiendo de dos condiciones distintas, en un caso partimos de una diálisis en PBS, 4 M GdnHCl y en otro caso en PBS, 6 M de GdnHCl. Hicimos una segunda diálisis en PBS, 8M urea y luego recuperamos la muestra e hicimos una dilución lenta con PBS (por goteo) hasta 3M urea antes de dializar la muestra en PBS. En este caso los rendimientos de proteína total luego del replegamiento fueron de 72 % y de 66 % utilizando los protocolos de 4 y 6 M de GdnHCl respectivamente, con lo cual la proteína parecía replegarse con mayor eficiencia partiendo de 4 M GdnHCl. Pero

luego del paso de purificación para ambos protocolos se recuperó entre un 33 y un 34 % de proteína.

Por otra parte, hicimos otros ensayos utilizando algunos aditivos en los buffers como riboflavina o hemina, y evaluamos como influía este cambio en el replegamiento de las proteínas.

BLS-OMP31: Riboflavina.

Como ya explicamos en la introducción, BLS está implicada en el penúltimo paso de la biosíntesis de riboflavina. Además BLS tiene un sitio de unión a riboflavina y ha sido comprobado para otras lumazinas que la riboflavina se une y actúa regulando esta vía por regulación positiva (Zylberman, V. *et al.* 2006).

En el laboratorio se observó que cuando BLS era incubada en una buffer con riboflavina, su estabilidad se veía incrementada (datos no publicados).

Se sabe que la riboflavina actúa como un inhibidor enzimático para algunas lumazinas sintatas por un mecanismo de inhibición competitiva por unión al sitio donde se une el sustrato. La riboflavina estaría actuando por *feedback* negativo ya que el producto final estaría regulando su propia biosíntesis actuando como inhibidor de una de las enzimas involucradas en su propia síntesis.

Decidimos probar si la eficiencia del replegamiento de las proteínas por separado mejoraba en presencia de riboflavina. En el caso de BLS-OMP31, el rendimiento luego del replegamiento utilizando el mismo protocolo pero en presencia de riboflavina era de un 80 %, la más alta obtenida hasta el momento. En el caso de W22A, el rendimiento bajo hasta un 43 %. El W mutagenizado se encuentra en el sitio activo de la proteína y está involucrado en la unión a riboflavina. Esta mutante no une riboflavina. El agregado de riboflavina no era útil en el proceso de formación de proteínas mixtas, ya que perjudicaba el replegamiento de la mutante de BLS y esto se vería reflejado en la formación de las proteínas mixtas que queríamos obtener. Quizás, la ausencia de este aminoácido podría estar desestabilizando la proteína en estas condiciones.

BLS-OMP31:Hemina.

Por otro lado, en el laboratorio se había observado que el agregado de hemina en el buffer de incubación de BLS aumentaba su estabilidad (Zylberman, V. 2006). Decidimos estudiar si el proceso de replegamiento de BLS-OMP31 se veía favorecido con el agregado de hemina.

Se denomina hemina a la forma oxidada, férrica o Fe (III) de la molécula de hierro.

Los espectros de absorción de las proteínas que unen hemina son muy característicos. En el caso de la proteína SeShp (Shp de *Streptococcus equi*), el espectro de absorción de la proteína que no tiene unida hemina tiene un sólo pico a 280 nm mientras que el espectro de la proteína tratada con hemina presenta un pico a 280 nm y otro a 418 nm que corresponde al pico de absorción o banda de Soret de la hemina unida (figura 15) (Nygaard, T. K. *et al.* 2006).

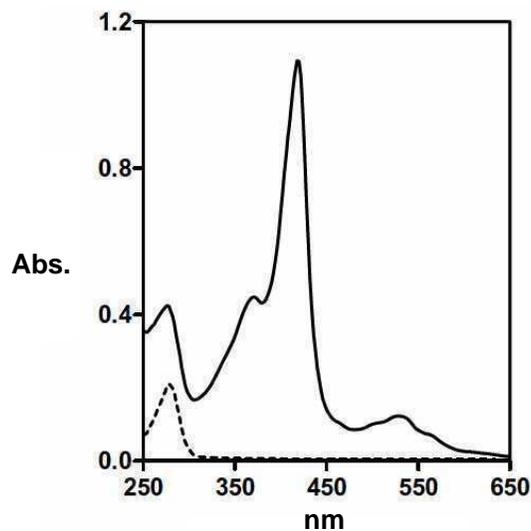


Figura 15. Espectro de absorción de la proteína SeShp sin estar unida a hemina (línea punteada) y de SeShp unida a hemina (línea continua) (figura extraída de(Nygaard, T. K. *et al.* 2006)).

BLS une hemina con una K_d de 0,3 nM y esto se evidencia por la presencia de la Banda de Soret a 412nm en el espectro de absorción (datos no publicados).

Para seguir la formación del complejo, se mide absorbancia en un rango de 250 a 700 nm y se ve el corrimiento de la banda de Soret de la hemina libre, de 400 nm a 412nm cuando BLS se encuentra unida a hemina.

Para evaluar si la renaturalización de BLS-OMP31 se veía favorecida por la unión a hemina, planeamos utilizar un protocolo de desnaturalización-renaturalización sencillo con BLS-OMP31 unida a hemina.

Cuando la solución de hemina se mezcló con BLS-OMP31 se formó un precipitado. La muestra fue centrifugada y se le midió absorbancia al sobrenadante. En el espectro de absorción pudimos ver que no se produjo el corrimiento esperado en el pico de hemina, el pico de BLS-OMP31 desapareció y el pico de hemina libre a 400 nm disminuyó (figura 16). Por lo tanto, la unión de BLS-OMP31 a hemina produjo un precipitado insoluble que llevó a la pérdida total de la proteína y a una disminución notoria de hemina libre en solución que estaba en exceso.

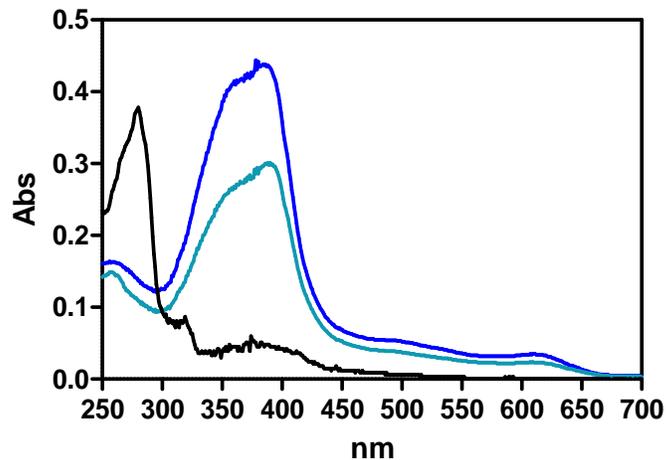


Figura 16. Espectros de absorción de la hemina en solución (azul), de BLS-OMP31 (negro) y del sobrenadante obtenido por centrifugación de la mezcla hemina-BLS-OMP31 (celeste).

Paralelamente a estos experimentos, el grupo del Dr. Pablo Baldi, encontró que la proteína de membrana de *Brucella* spp. OMP31 tiene homología con proteínas de unión a hemina de *Bartonella* spp. y que efectivamente se une a hemina (Delpino, M. V. *et al.* 2006). Para demostrar esto hicieron ensayos de inhibición en los cuales utilizaban un suero contra BLS-OMP31. En las muestras incubadas con este suero, la unión de la proteína OMP31 (en realidad de la bacteria lisada que expresa OMP31 en su superficie) se vio disminuida. Con estos resultados es claro que los 27 aa que forman el péptido OMP31 participan en la interacción con la hemina. Por lo tanto, podemos suponer que la interacción de BLS con hemina sumada a esta interacción del péptido OMP31 con hemina y además la tendencia propia de la hemina a formar dímeros, estaría formando una red compleja que hace que este complejo favorezca la precipitación y no se mantenga en un estado soluble.

De esta manera la utilización de hemina como aditivo para mejorar el rendimiento en la obtención de proteínas mixtas también fue descartada.

Obtención de proteínas mixtas por desnaturalización

El protocolo para la obtención de proteínas mixtas que utilizamos finalmente por ser el de mejor rendimiento es mostrado en la figura 17.

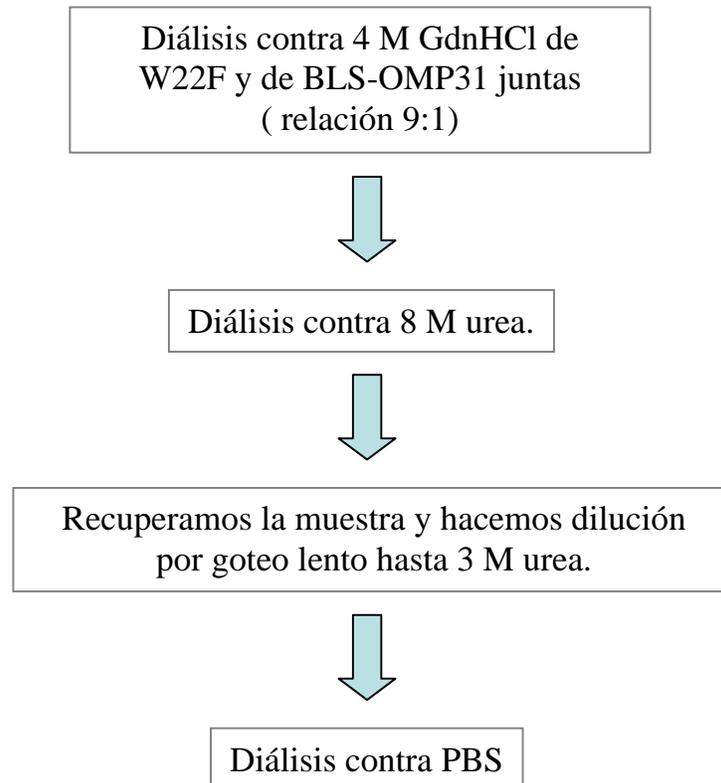
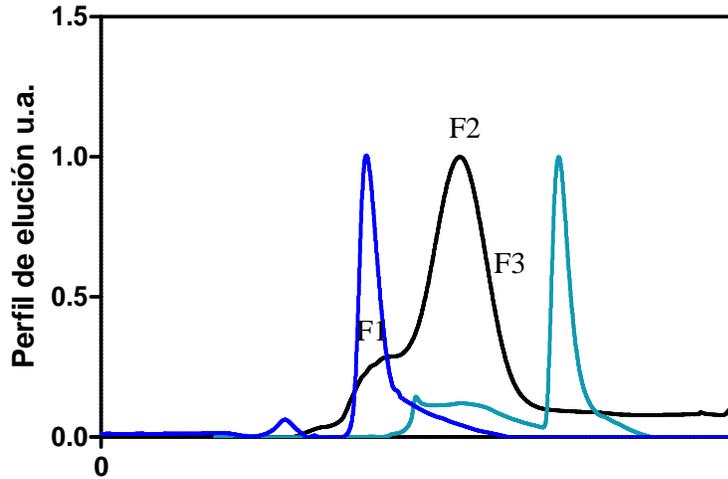


Figura 17. Esquema del protocolo de obtención de proteínas mixtas.

De esta manera, mezclando las dos proteínas en una proporción W22F: BLS-OMP31 9:1 y siguiendo el protocolo descrito en la figura 17, se obtiene una mezcla heterogénea de proteínas mixtas.

A.



B.

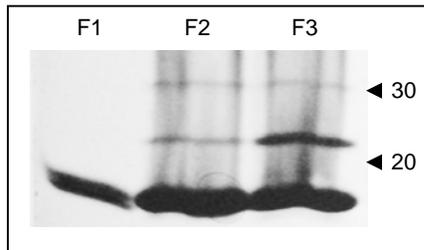


Figura 18. A. Perfiles de elución de las corridas de W22F (azul), BLS-OMP31 (celeste) y mezcla de proteína mixtas (negro). En el perfil de proteínas mixtas se colectaron las fracciones F1 (hombro izquierdo), F2 (pico) y F3 (ladera derecha) para ser analizadas posteriormente. B. gel desnaturalizante de poliacrilamida de las fracciones obtenidas en la purificación.

Como se ve claramente en la figura 18, en este tipo de proteína mixta la separación de las especies es menos eficiente, las proteínas eluyen como un solo pico con hombros y es necesario un análisis detallado de las fracciones para poder identificar las poblaciones con certeza.

Los rendimientos que finalmente obtuvimos en este proceso se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Rendimientos del proceso de obtención de proteínas mixtas por desnaturalización.

Refolding (Prot. Total)	Rendimientos	
	Proteína purificada (total)	Proteína mixta purificada
87%	39%	12%

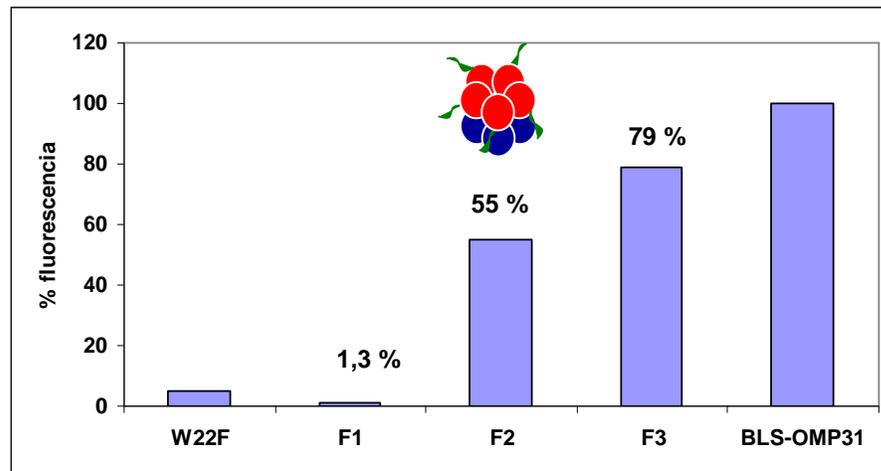
El rendimiento final de proteína mixta 9:1 obtenida fue del 12 %, que fue el mejor rendimiento que pudimos obtener después de estudiar en detalle distintos protocolos de replegamiento.

Las fracciones colectadas durante la purificación fueron analizadas por fluorescencia para terminar de identificar y caracterizar las distintas poblaciones.

4.2.3. Análisis de las distintas poblaciones.

Una vez colectadas las fracciones de las purificaciones de las proteínas mixtas por disociación y por desnaturalización, estas fueron analizadas por fluorescencia intrínseca del triptofano (figura 19).

A.



B.

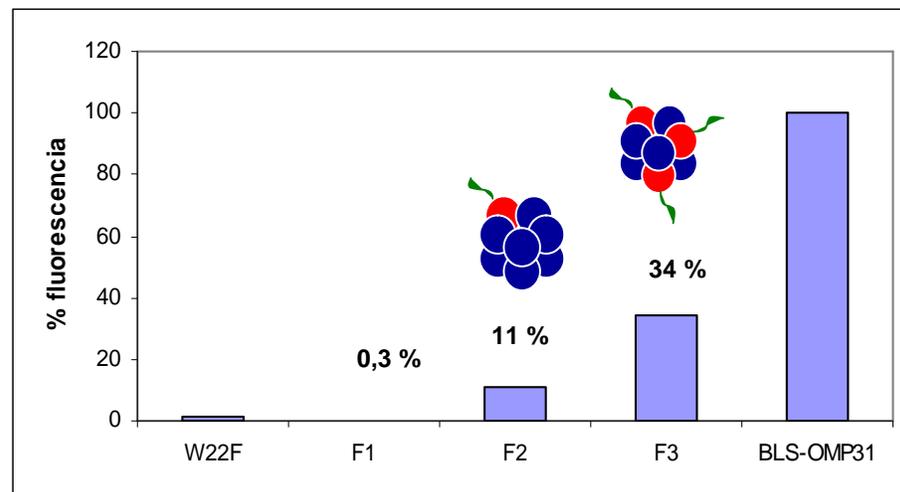


Figura 19. Porcentaje de fluorescencia de las proteínas originales, W22F y BLS-OMP31 y de las fracciones colectadas durante la separación de las proteínas mixtas obtenidas por disociación (A) o por desnaturalización (B).

Para el análisis de las fracciones colectadas durante la separación de las especies obtenidas en el protocolo de proteína mixtas por disociación nos basamos en la ausencia de fluorescencia de los monómeros que provienen de la mutante W22F.

Como mostramos en las figuras 13 y 14, en el perfil de elución hay un sólo pico que corresponde a proteína mixta, el análisis por fluorescencia muestra claramente que este pico tiene una intensidad de fluorescencia del 55 % con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida por BLS-OMP31 que tomamos como el 100 %. La fracción 1 tiene una intensidad de fluorescencia muy baja y correspondería a la proteína mayoritariamente W22F reasociada y la fracción 3 tiene un 79 % de fluorescencia y correspondería mayoritariamente a la proteína BLS-OMP31 reasociada. Como los picos 2 y 3 eluyen en concentraciones de NaCl muy parecidas, el pico 3 seguramente no está del todo puro y por eso no emite el 100 % de fluorescencia como esperábamos para esta fracción.

En el caso de las fracciones obtenidas para las proteínas mixtas por desnaturalización el análisis es más complejo porque las proteínas obtenidas eluyen como un sólo pico con hombros. La fracción 1 corresponde al hombro izquierdo del pico, tiene una intensidad de fluorescencia casi nula igual que W22F. La fracción 2 fue colectada en el máximo del pico, tiene un 11 % de fluorescencia y correspondería mayoritariamente a la proteína mixta W22F:BLS-OMP31 9:1 que queremos obtener. Y por último la fracción 3 fue colectada en la ladera derecha del pico, tiene una fluorescencia del 34 % y correspondería a la proteína mixta W22F:BLS-OMP31 7:3. Este es un análisis cualitativo para poder identificar las fracciones, pero dado que la separación en este caso no es tan buena podría haber una mezcla de poblaciones en la fracciones. El análisis de la fracción 2 corresponde a la proteína mixta 9:1 pero podría estar levemente contaminada con proteína mixta 8:2. De la misma manera la fracción 3, corresponde a la proteína mixta 7:3 pero podría estar contaminada por las proteínas mixtas de proporción 8:2 y en menor medida 6:4. A pesar de tener cierta heterogeneidad decidimos seguir adelante con la fracción 2 (proteína mixta 9:1), ya que consideramos que la contaminación es despreciable en esta fracción por haber sido colectada en el máximo del pico y no influiría en los resultados.

Luego de este análisis y de tener purificadas e identificadas las proteínas mixtas 5:5 y 9:1 hicimos ensayos de inmunización

4.2.4. Inmunizaciones.

Primer plan de inmunización.

En este experimento queremos estudiar varios aspectos. Por un lado, que efecto tiene en la respuesta inmune presentar el péptido en distintos números de copias por molécula transportadora, que es uno de los objetivos principales de esta parte de la tesis. Además queremos comparar que efecto produce la utilización o no de adyuvante en las respuestas humorales. Para alcanzar estos objetivos nos planteamos el siguiente esquema de inmunización.

El plan de inmunización fue de 4 inmunizaciones, que se administraron por vía intraperitoneal cada 20 días y sangramos los ratones 1 semana después de la tercera y cuarta inmunización. Se inmunizaron 6 ratones BALB/c hembras por grupo:

Con adyuvante {
Grupo I: BLS-OMP31.
Grupo II: BLS + Péptido OMP31.
Grupo III: W22F.
Grupo IV: W22F:BLS-OMP31 9:1.
Grupo V: W22F:BLS-OMP31 5:5.

Sin adyuvante {
Grupo VI: BLS-OMP31.
Grupo VII: BLS + Péptido OMP31.
Grupo VIII: W22F.
Grupo IX: W22F:BLS-OMP31 9:1.
Grupo X: W22F:BLS-OMP31 5:5.

Utilizamos un total de 10 grupos, ya que para cada proteína teníamos un grupo de 6 ratones inmunizados con proteína en PBS y otro grupo inmunizado con proteína en adyuvante incompleto de Freund.

Para poder comparar los resultados obtenidos entre los grupos, igualamos en todos la cantidad de péptido con la que inmunizamos (tabla 5).

Tabla 5. Cantidad de péptido y de quimera (en μgr) presentes en las preparaciones utilizadas en los grupos inmunizados.

Grupo	Péptido por molécula BLS	μgr quimera	μgr péptido
I (BLS-OMP31)	10	10	1.5
II (BLS + OMP31)	-	10	1.5
III (W22F)	-	10	-
IV (W22F-BLS-OMP31 9:1)	1	88	1.5
V (W22F-BLS-OMP31 5:5)	5	19	1.5

Los resultados obtenidos en los ELISAS de los sueros correspondientes al tercer y cuarto sangrado se muestran en la figura 20.

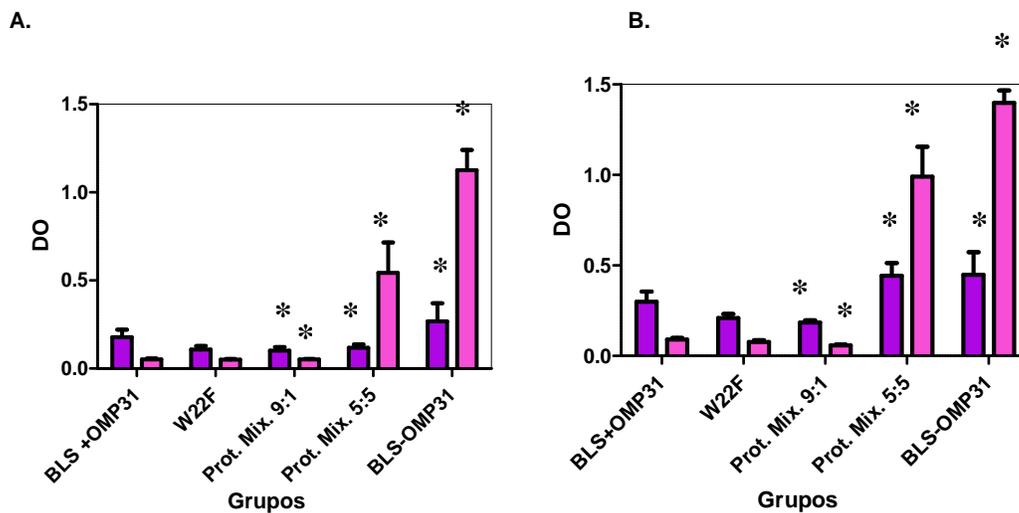


Figura 20. Respuesta humoral obtenida en ratones inmunizados con distintas preparaciones de proteínas según el grupo. Se muestra la densidad óptica a 490nm obtenida para cada grupo en los ensayos de ELISA, sensibilizando la placa con proteína OMP31 recombinante. Se muestran los grupos inmunizados con preparaciones en adyuvante incompleto de Freund (barras rosa) y en PBS (barras violetas). Los sueros correspondientes al tercer sangrado (A) y los correspondientes al cuarto sangrado (B) se utilizaron en una dilución 1/100. Tanto en la tercera como en la cuarta inmunización, sólo los grupos inmunizados con proteína mixta 5:5 y con BLS-OMP31 en adyuvante dieron diferencia significativa comparados con el control ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$ para BLS-OMP31 cuarta inmunización).

Si observamos las respuestas de los distintos grupos en las inmunizaciones en adyuvante incompleto de Freund (figura 20, barras color rosa) y en PBS (figura 20, barras color violeta), podemos ver que se obtiene una mejor respuesta en el caso de las inmunizaciones en adyuvante (como esperabamos). Pero lo más importante y lo que más nos interesa en este ensayo es que las diferencias entre grupos se hacen

más notorias en estas condiciones. Tanto en la tercera (figura 20 A) como en la cuarta inmunización (figura 20 B) la respuesta contra OMP31 cuando se inmuniza en PBS no es significativamente superior aun en el grupo BLS-OMP31 en el cual se están presentando 10 péptidos por molécula de BLS y no es posible ver diferencias significativas entre los grupos. Para poder evaluar si existen diferencias en las respuestas humorales de los grupos necesitamos un sistema lo suficientemente sensible.

En la inmunización con adyuvante se observan más claramente las diferencias obtenidas en la respuesta humoral en los grupos inmunizados con proteínas mixtas (9:1 y 5:5) y con BLS-OMP31. En el grupo inmunizado con proteína mixta 9:1 la respuesta humoral contra OMP31 no es significativamente diferente a la obtenida para los grupos control. En cambio en el grupo inmunizado con proteína mixta 5:5 se puede ver que hay una mayor respuesta humoral contra el péptido y que a su vez es menor que la obtenida en el grupo inmunizado con BLS-OMP31 que presenta 10 péptidos por molécula de BLS.

Debido a que todos los grupos de ratones fueron inmunizados con la misma cantidad de péptido OMP31, los resultados obtenidos demuestran que el sistema inmune responde en forma diferencial de acuerdo a la densidad de epitopes presentes en la molécula de BLS.

Cuando diseñamos este experimento decidimos igualar la cantidad de péptido en todas las preparaciones utilizadas para inmunizar los ratones para independizarnos de esta variable y poder comparar los resultados obtenidos en los ELISAS. Pero de esta manera, los grupos IV (proteína mixta 9:1) y V (proteína mixta 5:5), tenían nueve veces más y el doble, respectivamente, de μgr de BLS, y podíamos pensar que el efecto que estábamos viendo era una respuesta del sistema inmune del ratón a una inmunización con mayor cantidad de proteína total. Está muy discutido el efecto que los anticuerpos neutralizantes generados contra el *carrier* tienen sobre la respuesta específica contra los epitopes transportados. En particular el de los anticuerpos neutralizantes maternos que se sabe que interfieren con la vacunación en infantes. Este fenómeno es llamado “supresión del *carrier*” y sugiere que los anticuerpos generados contra el *carrier* inhiben el establecimiento de la respuesta inmune. Muchas de estas observaciones pueden ser atribuidas a la reducción de la replicación en vacunas de cepas atenuadas en presencia de anticuerpos neutralizantes maternos, que podría explicar la reducción de la eficacia en la vacunación (Albrecht, P. *et al.* 1977; Bangham, C. R. 1986; Perkins, F. T. *et al.* 1959). Bajo estas condiciones, la supresión del *carrier* puede simplemente reflejar la neutralización de la replicación de

virus competentes. Si bien, en este caso parece bastante claro el efecto de los anticuerpos neutralizantes, el concepto de supresión del carrier se ha extendido a otras áreas. De hecho, hay grupos que se dedicaron a estudiar si la respuesta inmune específica contra el *carrier* puede interferir con la inducción de respuesta específica de células T contra los epitopes conjugados al *carrier* (Da Silva, D. M. *et al.* 2001; Ruedl, C. *et al.* 2005b).

Por esta razón decidimos hacer un nuevo plan de inmunización en el cual además de igualar la cantidad de péptido, igualamos la cantidad de proteína transportadora en las preparaciones que se utilizaron para inmunizar cada grupo.

Segundo plan de inmunización.

En este plan de inmunización, utilizamos 5 ratones hembras BALB/c por grupo. Se hicieron cuatro inmunizaciones por vía intraperitoneal cada 20 días. Las muestras fueron preparadas en adyuvante incompleto de Freund. Como se detalla en la tabla 6, en todos los grupos utilizamos cantidades equimolares de péptido y de BLS.

Tabla 6. Cantidad de péptido, de quimera y de BLS agregada (en μgr) y en las preparaciones de los grupos inmunizados.

Grupo	Péptido por molécula BLS	μgr quimera	μgr péptido	μgr BLS wt agregada
I (BLS-OMP31)	10	10	1,5	78
II (BLS + OMP31)	-	10	1,5	78
III (W22F)	-	10		78
IV (W22F-BLS-OMP31 9:1)	1	88	1,5	
V (W22F-BLS-OMP31 5:5)	5	19	1,5	69

Una semana después de la tercera y cuarta inmunización, se sangraron los ratones y los sueros se analizaron por ELISA. La proteína OMP31 recombinante se utilizó para sensibilizar la placa de ELISA. Los sueros se utilizaron en una dilución 1/100.

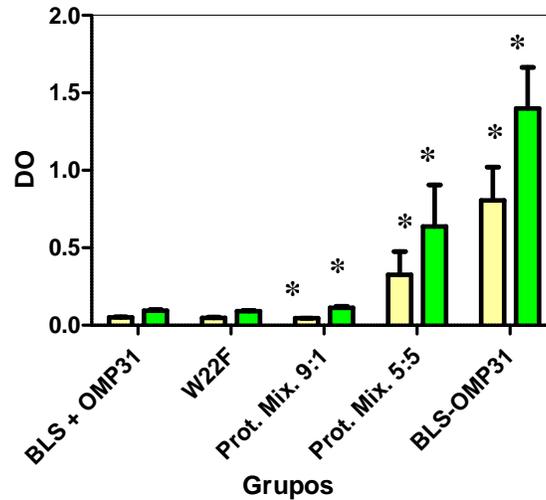
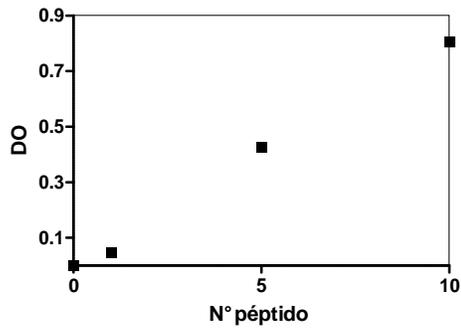


Figura 21. Densidad óptica a 490 nm obtenida en los ensayos de ELISA de los sueros correspondientes a la tercera (amarillo) y cuarta (verde) inmunización. La proteína recombinante OMP31 fue utilizada para sensibilizar la placa y los sueros se usaron en una dilución 1/100. En ambas inmunizaciones, los grupos inmunizados con proteína mixta 5:5 y con BLS-OMP31 muestran una diferencia significativa comparados con los grupos control ($p < 0,001$). El grupo inmunizado con proteína mixta 9:1, no muestra diferencia significativa con los controles.

Como podemos ver en la figura 21 la tendencia que veíamos en la inmunización anterior se repite. El grupo inmunizado con proteína mixta 9:1 desarrolló una respuesta humoral contra OMP31 baja, comparable a los controles. Por otro lado, el grupo V inmunizado con la proteína mixta 5:5 muestra un nivel intermedio de reactividad contra OMP31 si lo comparamos con los controles y BLS-OMP31. La densidad óptica obtenida en los grupos I y V muestra diferencias significativas con los controles.

Esta relación en la respuesta humoral entre BLS-OMP31 y las proteínas mixtas 5:5 y 9:1, se mantiene tanto en la tercera como en la cuarta inmunización y se ve más claramente cuando graficamos la densidad óptica obtenida en los ELISAS en función del número de péptidos transportado por molécula de BLS (figura 22).

A.



B.

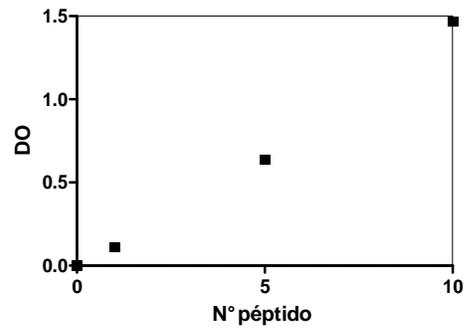


Figura 22. Relación entre respuesta humoral (densidad óptica a 490 nm) y número de epitopes transportados por molécula de BLS correspondiente a la tercera (A) y cuarta (B) inmunización.

Como observamos en las figuras 22 A y B, las respuestas humorales obtenidas en los tres grupos guardan una relación lineal con el número de epitopes transportados por BLS.

5. Conclusiones del capítulo I.

Los resultados obtenidos en este primer capítulo nos demuestran la enorme versatilidad de BLS en su uso como proteína transportadora de péptidos.

Hemos demostrado que BLS es capaz de transportar distintos péptidos sin que se altere su estructura secundaria y que es posible obtener respuesta humoral contra los péptidos transportados mediante esta tecnología. La intensidad de esta respuesta humoral va a estar dada principalmente por la naturaleza del péptido y por las condiciones de inmunización. Así, OMP31 fue, de los péptidos estudiados, con el que se obtuvo mejor respuesta humoral. Pero en todos los casos se obtuvo una mejor respuesta humoral que la obtenida en inmunizaciones con los péptidos solos según la bibliografía consultada.

Se pudo utilizar exitosamente a BLS para presentar dos péptidos en una misma molécula de proteína transportadora y en los ensayos de inmunización con ratones se obtuvo respuesta humoral contra ambos péptidos. Estos resultados abren una posibilidad muy interesante en el campo de las vacunas polivalentes o en terapias que requieran el uso simultáneo de varios péptidos.

Por otro lado y poniendo nuestro objetivo en un estudio de inmunogenicidad más detallado del modelo de BLS, estudiamos como la distribución y repetitividad de OMP31 en la estructura de BLS influye en la inmunogenicidad contra el péptido. Pudimos ver como, en semejanza con resultados obtenidos en otros modelos como las VLPs, el nivel de respuesta humoral obtenida contra el epítipo es directamente proporcional al grado de repetitividad del mismo en la molécula de BLS.

Estos resultados también nos muestran las limitaciones de este modelo. Cuando la proteína transportadora presenta sólo 5 péptidos (en una de sus caras), es necesario hacer varias inmunizaciones con adyuvante para obtener una buena respuesta.

Además, en principio y por lo observado en los ensayos con este péptido, este *carrier* es muy buen candidato para ser utilizado en vacunación de péptidos mixta pero no sería posible utilizar más de dos péptidos por molécula de BLS, ya que sería necesaria una densidad de epítopos de 5 péptidos para obtener una respuesta considerable. De todas maneras, esta afirmación es posible hacerla en el contexto de esta tesis, en la cual se estudio a BLS como transportadora de un péptido, pero es muy probable que si estudiamos lo mismo cuando BLS transporta a una proteína o dominio proteico los resultados podrían ser diferentes.

Es claro que BLS no produce un efecto adyuvante sobre los péptidos, dado que los grupos inmunizados con BLS más péptido OMP31 no fusionado no presentaron

una respuesta humoral significativamente mayor que los controles negativos. Pero si podemos afirmar de acuerdo a estos resultados que BLS produce un efecto *carrier* sobre los péptidos permitiendo aumentar en forma considerable la respuesta inmune que se obtiene cuando los péptidos se encuentran fusionados a BLS.

Capítulo II

En nuestro grupo se estudiaron en detalle los equilibrios de disociación y desnaturalización de BLS, y también se estudiaron extensamente diversos aspectos estructurales. Para realizar distintos experimentos y con el objetivo de estudiar la estructura y la estabilidad de BLS, se diseñaron un grupo de más de 20 mutantes puntuales. Con estas mutantes se pretendía estudiar como impactaba la sustitución de cada residuo en la estabilidad general de la proteína y en la interfaz entre pentámeros (Zylberman, V. 2006).

Entre estas mutantes puntuales se identificaron dos en las cuales la estabilidad general de la proteína se vio modificada por la sustitución de estos residuos.

Estas mutantes fueron:

- BLS-W22A-F127W
- BLS-L105A

La doble mutante mostró tener una estabilidad mayor a la que mostraba BLS, y BLS-L105A una estabilidad mucho menor. Este modelo nos pareció muy interesante para estudiar como impactaba la diferencia de estabilidad de BLS en su capacidad de presentar péptidos y aumentar la inmunogenicidad contra los mismos.

De este modo, decidimos obtener estas mismas mutaciones utilizando como molde a BLS-OMP31. Así podríamos estudiar como afectaban estas mutaciones a la estabilidad general y evaluar si en las mutantes que presentaban diferente estabilidad se podía observar alguna diferencia en la inmunogenicidad contra el péptido cuando se inmunizaban ratones con las mismas.

Por otro lado, en el laboratorio se estaban estudiando lumazinas sintasas de otros organismos desde el punto de vista estructural (Klinke, S. 2007). Resultó muy interesante el análisis de la estructura de la lumazina sintasa (o RibH2) de *Mesorhizobium loti*, ya que ésta proteína a pesar de tener una estructura similar a BLS, tiene diferencias notables en los contactos de la interfaz entre pentámeros, lo que hacía pensar que esta lumazina tendría una estabilidad reducida con respecto a BLS. Decidimos estudiar estas posibles diferencias de estabilidad y de encontrarlas, evaluar si influyen en la inmunogenicidad contra las proteínas.

De esta manera, los objetivos puntuales de esta parte de la tesis fueron:

- Obtener las mutantes de BLS-OMP31, expresarlas y purificarlas.
- Caracterizar y estudiar la estabilidad de las mutantes.
- Inmunizar ratones y evaluar la inmunogenicidad contra OMP31.
- Estudiar la estabilidad de la lumazina sintasa de *Mesorhizobium loti* y compararla con la de BLS.

- Inmunizar ratones con ambas proteínas y comparar la respuesta humoral contra las proteínas.

6. Mutantes de BLS OMP31.

6.1. Obtención de mutantes de BLS-OMP31.

Para obtener las mutantes de BLS-OMP31 utilizamos una estrategia de 3 reacciones de PCR consecutivas. En la PCR 1, se utilizó como molde BLS-OMP31 y los primers utilizados fueron el primer universal T7t y un primer conteniendo la mutación que queremos obtener. El producto de esta PCR es un megaprimer.

En la PCR 2 se utiliza como molde BLS-OMP31, y como primers, el megaprimer obtenido en la primera reacción y el primer universal T7. De esta manera, el producto obtenido es la mutante de BLS-OMP31 que deseamos.

La PCR 3 tiene como fin aumentar la masa de mutante obtenida en el paso anterior. El molde es el producto de la reacción anterior y los primers son T7 y T7t, figura 23.

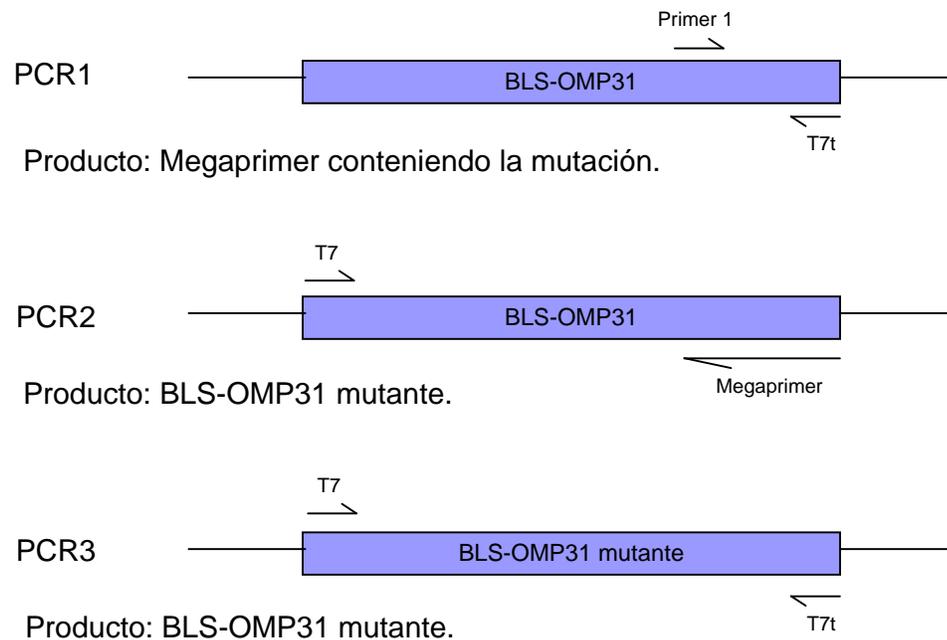


Figura 23. Esquema simplificado de las tres reacciones de PCR utilizadas para obtener la mutante.

Este producto final es purificado y secuenciado para verificar que la mutación este en el lugar correcto y no haya otro tipo de problemas de secuencia.

De esta manera obtenemos las mutantes:

BLS-OMP31-W22A-F127W

BLS-OMP31-L105A

En el caso de la doble mutante los tres pasos de PCR se repiten por cada mutación con los *primers* adecuados para obtener el *megaprimer* con la mutación deseada. La secuencia de estos *primers* y los detalles de las reacciones se explican en materiales y métodos.

Luego de verificar las secuencias de las mutantes, estas construcciones se utilizan para transformar bacterias y para expresar las proteínas.

6.2. Expresión y purificación.

Los pasos de expresión y purificación son iguales a los explicados para las quimeras de BLS en el capítulo I de resultados.

Luego de la lisis bacteriana, las mutantes fueron obtenidas del citoplasma de las bacterias y se obtuvo un buen rendimiento en las purificaciones (90 mgr/litro de cultivo) muy similar al obtenido para BLS-OMP31.

6.3. Mutantes de BLS y BLS-OMP31: análisis estructural.

Los residuos a mutagenizar elegidos para BLS se encuentran en posiciones claves que podrían afectar la estabilidad global de la proteína. En el caso de la mutante BLS-W22A-F127W la fenilalanina 127 esta comprometida en un alto número de contactos. Esta fenilalanina realiza contactos intramonoméricos con 3 residuos diferentes, contactos con el monómero contiguo y con un monómero del pentámero enfrentado (estos contactos se repiten para cada subunidad de BLS) (figura 24).

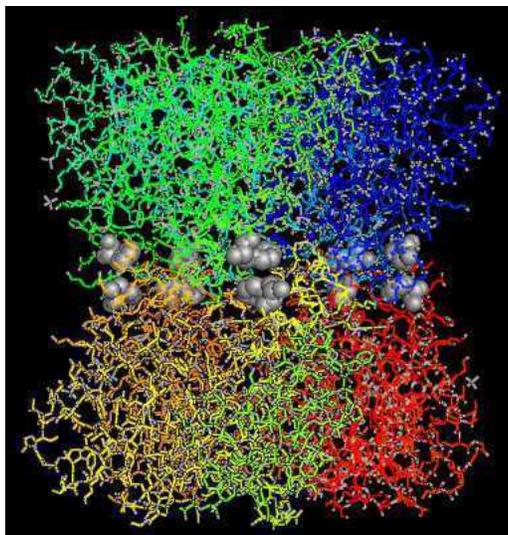


Figura 24. Ubicación de las fenilalaninas 127 en la estructura tridimensional de BLS-OMP31-W22A-F127W. Los monómeros se esquematizan en diferente color y los residuos de fenilalanina 127 en color gris.

Por la posición en la que se encuentra dentro de la proteína, la fenilalanina 127 podría quedar expuesta al solvente durante el desplegamiento de la proteína. Esta doble mutante se hizo con el fin de tener una mutante adecuada para poder sensar mediante fluorescencia la disociación de los pentámeros, que hasta ese momento sólo se había podido estudiar mediante la técnica de *static ight scattering* (Zylberman, V. *et al.* 2004). El triptofano natural de la proteína se mutagenizó con el fin de que no hubiera señales de interferencia cuando se monitoreara la disociación. De esta manera se obtuvo esta doble mutante y se monitoreo la señal de fluorescencia y de dicroísmo circular en el UV cercano en concentraciones crecientes de cloruro de guanidinio. Ambas curvas son prácticamente superponibles y permiten visualizar dos transiciones, la primera entre 1,5 y 2,2 M, que corresponde a la disociación del decámero en dos pentámeros plegados, y la segunda entre 2,2 y 2,5 M de GdnHCl, correspondiente a la disociación y desnaturalización concertadas del pentámero a monómeros desplegados. Por lo tanto, por primera vez se pudo sensar por primera vez la disociación de los pentámeros mediante estas técnicas figura 25 (Ainciart, N. *et al.* 2011)

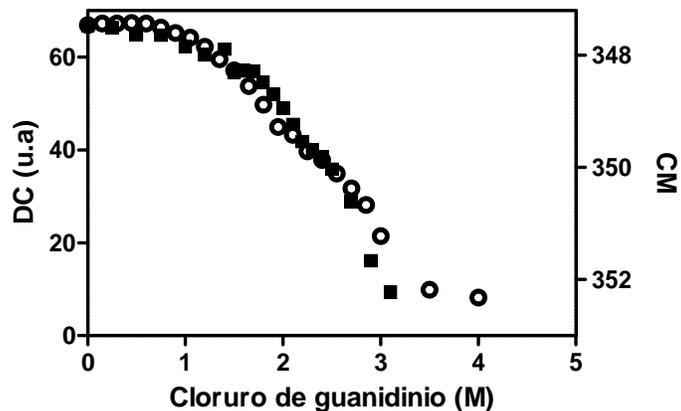


Figura 25. Disociación de BLS-W22A-F127W en GdnHCl monitoreada por fluorescencia y por dicroísmo circular en el UV cercano, en el gráfico se muestra el centro de masa, CM (○) y el dicroísmo circular, DC (■) en función del aumento de la concentración de cloruro de guanidinio. (Figura extraída de (Ainciart, N. *et al.* 2011))

Además de su utilidad en estudios estructurales, durante su caracterización esta mutante resultó tener una estabilidad mayor que BLS. Los valores de ΔG de desnaturalización y de T_m para BLS son de 320 ± 22 kJ/mol y 89 °C respectivamente, mientras que los valores calculados para esta mutante son, ΔG de desnaturalización de 343 ± 25 kJ/mol y T_m de 95 °C. Por este motivo decidimos generar estas mismas mutaciones en BLS-OMP31 y estudiar su estabilidad y como afecta esto la inmunogenicidad contra OMP31.

Por otro lado, el residuo L105 está implicado sólo en interacciones entre monómeros de un mismo pentámero y se diseñó con la idea de reducir el área de contacto entre monómeros, como mostramos en la figura 26.

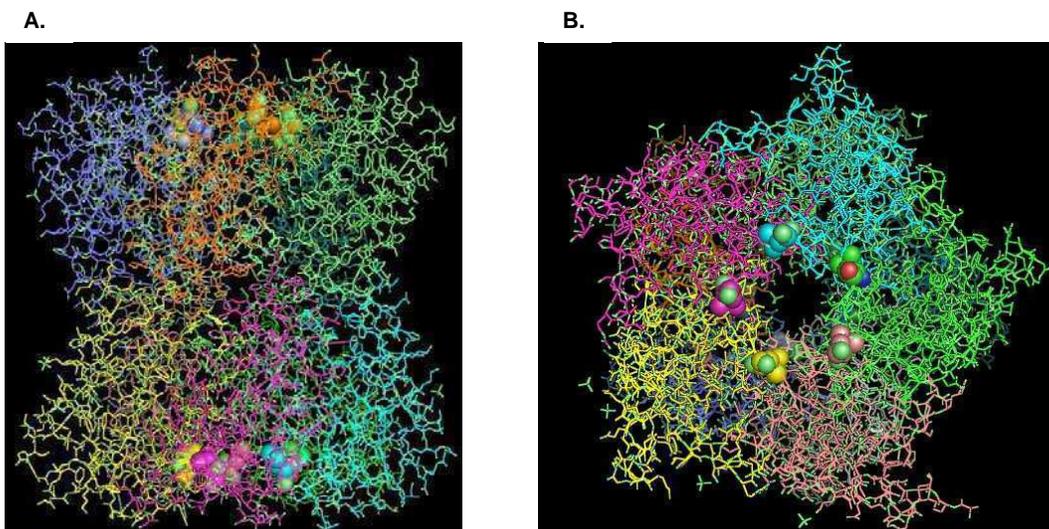


Figura 26. Ubicación de las leucinas 105 en la estructura tridimensional de BLS-OMP31-L105A. A. Vista lateral. B. Vista superior. Los monómeros están representados en distinto color y los residuos de leucina están representados como esferas.

La mutante BLS-L105A mostró una estabilidad muy reducida con respecto a BLS WT, con una T_m 13 °C menor y un valor de ΔG de desnaturalización de 200 ± 19 kJ/mol. Esta mutante mostró inclusive ser más sensible a degradación por tripsina que BLS (Zylberman, V. 2006). Decidimos, entonces, estudiar esta mutación también en BLS-OMP31 y estudiar su estabilidad y la inmunogenicidad contra el péptido.

6.4. Análisis de las mutantes de BLS-OMP31 en estado nativo.

Una vez obtenidas las mutantes de BLS-OMP31, decidimos estudiar su estructura secundaria a fin de analizar si las mutaciones introducidas alteran la estructura de las proteínas.

Mediante el análisis de los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de las proteínas evaluamos la estructura secundaria. Podemos ver en la figura 27 que los espectros de BLS-OMP31 y las mutantes prácticamente se superponen totalmente. Muestran un espectro característico de un plegamiento predominantemente de hélices alfa idéntico al que muestran los espectros de BLS, por lo tanto la estructura secundaria de las mutantes se encuentra intacta.

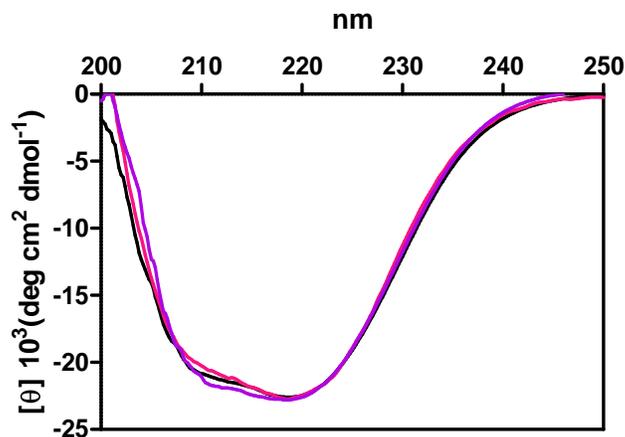


Figura 27. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de BLS-OMP31 (negro), BLS-OMP31-W22A-F127W (rosa) y BLS-OMP31-L105A (violeta). Las proteínas se utilizaron en una concentración 10 μ M de monómero en buffer PBS, pH 7.

6.5. Estabilidad termodinámica de las mutantes.

En trabajos anteriores del laboratorio (Zylberman, V. *et al.* 2004) se mostró que se puede monitorear, por medio de la señal de dicroísmo circular a 222 nm, la disociación y desnaturalización del dímero de pentámero de BLS a monómeros desplegados en un rango de 2,3–3 M de cloruro de guanidinio (GdnHCl). En el estudio detallado de BLS-OMP31 comprobamos que tiene un comportamiento similar (datos no publicados). Queremos evaluar si estas mutantes tienen diferente estabilidad con respecto a BLS-OMP31, como ocurre con las mutantes de estabilidad de BLS (Zylberman, V. 2006).

Para este fin medimos la señal de dicroísmo circular en el UV lejano de BLS-OMP31 y las mutantes incubadas en concentraciones crecientes de GdnHCl a fin de evaluar si existe diferencia en los equilibrios de desnaturalización de las proteínas.

En este análisis decidimos agregar la mutante BLS-OMP31-F127W que obtuvimos como primer producto en el proceso de mutagénesis de la doble mutante. Para esta mutante en BLS se obtuvieron resultados preliminares que indicaban que también tenía diferencias de estabilidad con respecto a BLS pero no fue caracterizada en detalle.

Las proteínas en una concentración de 10 μ M (de monómero) fueron incubadas en un buffer PBS en concentraciones crecientes de GdnHCl durante 2-3 h. a temperatura ambiente. A todas las soluciones utilizadas fue necesario agregarles inhibidores de proteasas ya que OMP31 es susceptible a degradación. Luego de la incubación, para todas las muestras medimos un espectro de dicroísmo circular en el

UV lejano (200-260 nm) y graficamos el porcentaje de la señal a 222 nm en función del incremento de la concentración de GdnHCl para poder monitorear el cambio de señal que refleja cambios que se producen en la estructura secundaria (figura 28).

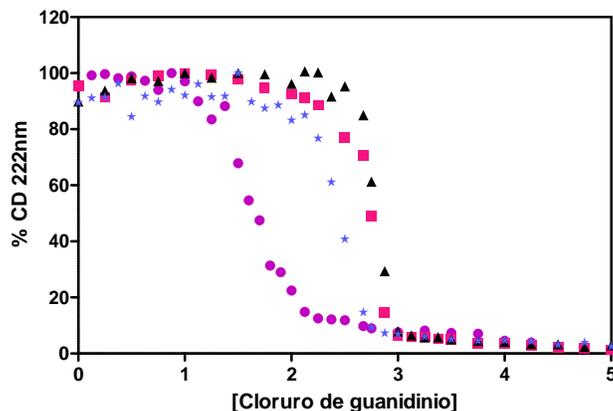


Figura 28. Porcentaje de señal de dicroísmo circular a 222 nm en función del incremento de la concentración molar de cloruro de guanidinio (GdnHCl) de BLS-OMP31 (triángulo negro), BLS-OMP31-W22A-F127W (cuadrado rosa) y BLS-OMP31-L105A (círculo violeta), BLS-OMP31-F127W (estrella celeste).

Podemos ver que para BLS-OMP31 la transición se produce en un rango de 2,20-3,00 M GdnHCl. En el caso de BLS-OMP31-W22A-F127W la transición ocurre en el mismo rango, para BLS-OMP31-F127W ocurre en un rango de 2,12-2,87 M GdnHCl y para BLS-OMP31-L105A el rango es 1,00-2,20 M GdnHCl. Esta última es la única mutante en la que se observa una diferencia de estabilidad notable con respecto a BLS-OMP31.

En todos los casos se observa una única transición en la que hay una pérdida total de la estructura secundaria que se evidencia por la pérdida de señal de dicroísmo circular. Esto se correlaciona con una transición cooperativa en la cual las proteínas se desnaturalizan completamente en los rangos mencionados.

Con el fin de evaluar otro parámetro de estabilidad, medimos la desnaturalización térmica de las proteínas. Para esto medimos la señal de dicroísmo circular de las proteínas a 222 nm incrementando la temperatura de la muestra en 4°C / min. Las muestras se utilizaron a una concentración de 10 µM de monómero en buffer PBS con agregado de inhibidor de proteasas. De esta manera, pudimos obtener las temperaturas de melting aparente (T_m) de las proteínas y analizarlas. Como vemos en la figura 29 se repite la misma tendencia que en las curvas de desnaturalización por cloruro de guanidinio (figura 28). Se observa un corrimiento hacia menores temperaturas en la curva de BLS-OMP31-L105A y se observa muy

poca diferencia o una diferencia despreciable en la curva correspondiente a BLS-OMP31-W22A-F127W y a BLS-OMP31-F127W.

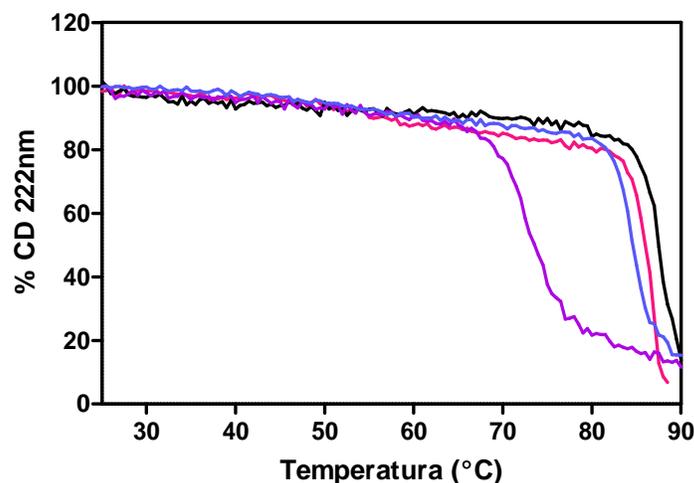


Figura 29. Desnaturalización térmica medida por dicroísmo circular a 222 nm de BLS-OMP31 (negro), BLS-OMP31-W22A-F127W (rosa), BLS-OMP31-L105A (violeta) y BLS-OMP31-F127W (celeste). Las muestras se utilizaron en una concentración 10 μ M de monómero y en buffer PBS con agregado de inhibidores de proteasas. Se graficó la señal de DC a 222 nm en función del incremento de temperatura. Se tomaron datos de 25 a 90 $^{\circ}$ C a una velocidad de 4 $^{\circ}$ C/minuto. Se tomaron datos cada 0,5 $^{\circ}$ C y l a Tm se calculo como el punto intermedio de la transición.

6.6. Análisis termodinámico de las mutantes.

A partir de las curvas de dicroísmo circular de las proteínas medidas a 222 nm en función del aumento de GdnHCl y de temperatura determinamos algunos valores termodinámicos (tabla 7).

Tabla 7. Parámetros termodinámicos asociados al desplegamiento de BLS-OMP31 y las mutantes, calculados a partir de las curvas de desnaturalización por GdnHCl según se detalla en materiales y métodos.

Proteína	ΔG (Kj/mol)	D50 (M)	Tm ($^{\circ}$ C)
BLS-OMP31	352 \pm 10	2,80	87,50
BLS-OMP31-W22A-F127W	341 \pm 06	2,70	86,50
BLS-OMP31-L105A	179 \pm 22	1,66	73,00
BLS-OMP31-F127W	250 \pm 29	2,45	84,10

El valor de D₅₀ es una medida de la concentración media de GdnHCl necesaria para desnaturalizar el 50 % de las moléculas de una muestra y se calculó según lo que se explica en materiales y métodos.

A modo de ejemplo, en la figura 30 mostramos las curvas de dicroísmo circular y los gráficos de ajustes de datos y determinación del ΔG de BLS-OMP31.

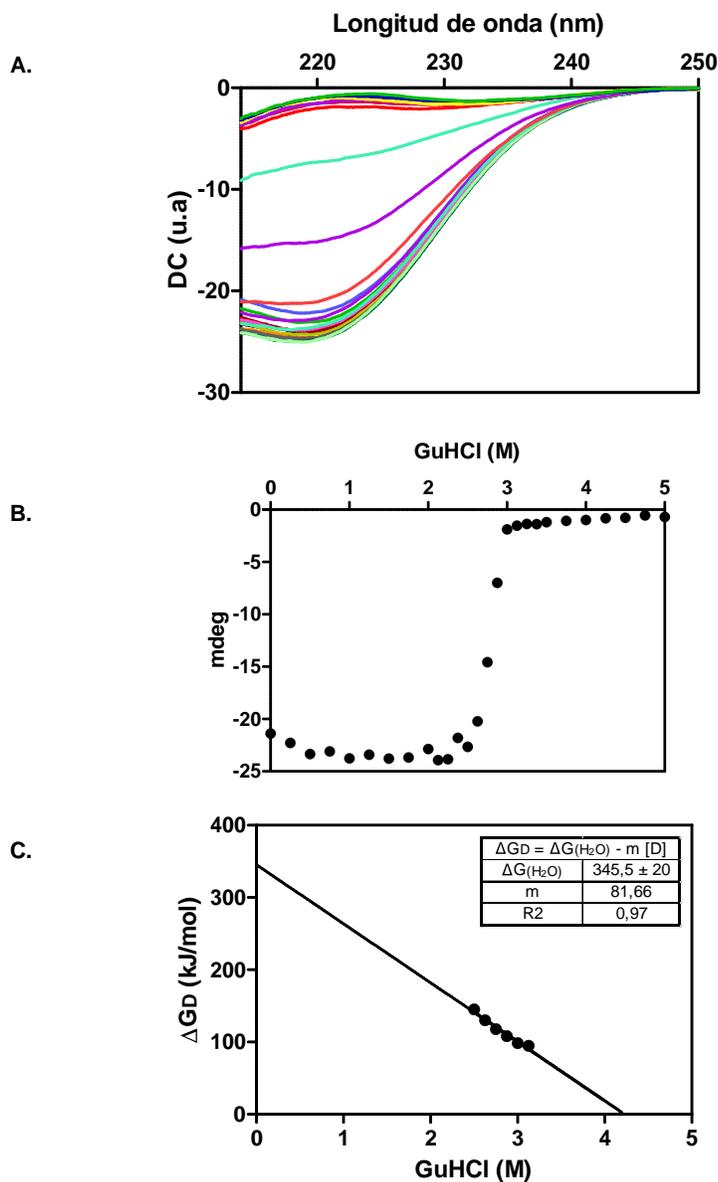


Figura 30. A. Espectros de dicroísmo circular de BLS-OMP31 a diferentes concentraciones de GdnHCl, cada color corresponde a una concentración de GdnHCl diferente en un rango de concentraciones de 0 a 5 M de GdnHCl. B. Curva de dicroísmo circular a 222 nm en función de la concentración de GdnHCl de BLS-OMP31. C. Curva de regresión para el cálculo de ΔG de la curva mostrada en B.

Analizando los parámetros termodinámicos calculados podemos arribar a algunas conclusiones en cuanto a las diferencias de estabilidad entre BLS-OMP31 y las mutantes. Obtuvimos una mutante con una estabilidad considerablemente menor, BLS-OMP31-L105A, que se evidencia claramente en los parámetros de ΔG , D50 y Tm

calculados. BLS-OMP31-F127W mostró tener una estabilidad levemente inferior que BLS-OMP31 aunque no hay una diferencia de estabilidad tan marcada como para la mutante BLS-OMP31-L105A. Por el contrario, BLS-OMP31-W22A-F127W no resultó ser más estable que BLS-OMP31 como esperábamos por el comportamiento observado para la doble mutante de BLS.

El próximo paso fue estudiar si las características encontradas en la estabilidad modificaban de alguna manera la respuesta humoral contra OMP31 cuando inmunizamos ratones con las distintas mutantes.

6.7. Inmunizaciones.

Inmunizamos ratones BALB/c hembras (5 por grupo) con 50 µgr de las proteínas por ratón en adyuvante incompleto de Freund. Se efectuaron un total de 4 inmunizaciones, cada 20 días y se sangraron los ratones 1 semana después de la cuarta inmunización.

Los grupos inmunizados fueron:

Grupo I: BLS-OMP31.

Grupo II: BLS-OMP31-L105A.

Grupo III: BLS-OMP31-W22A-F127W.

Grupo IV: BLS-OMP31-F127W.

Los sueros de los ratones se testearon por ELISA. En la placa de ELISA se inmovilizó la proteína recombinante OMP31 para ver reactividad de los sueros contra el péptido OMP31 (o BLS para ver reactividad contra la proteína transportadora como control).

Los títulos obtenidos contra OMP31r fueron semejantes en todos los grupos (no hubo diferencias significativas), de 30000 a 40000, figura 31. No observamos ningún efecto en los grupos inmunizados con quimeras de estabilidad reducida.

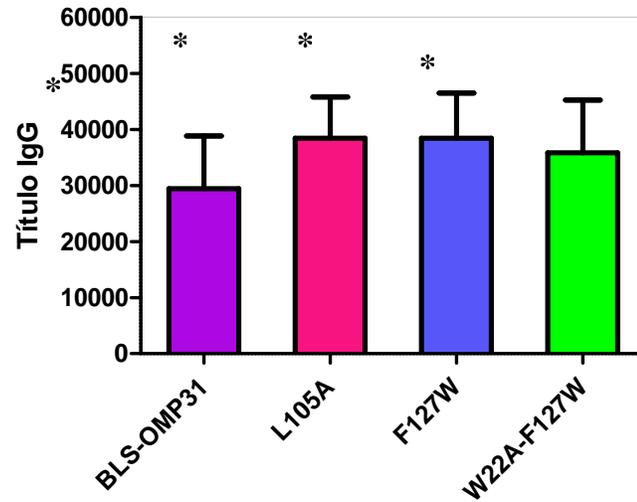


Figura 31. Títulos de los sueros de ratones inmunizados con BLS-OMP31 y las mutantes. Los ensayos de ELISA de los sueros correspondientes a la cuarta inmunización y se utilizó la proteína recombinante OMP31 para sensibilizar la placa. Los títulos de los cuatro grupos no dieron diferencias significativas ($p > 0,05$).

La respuesta humoral contra BLS fue similar en todos los grupos y los títulos obtenidos fueron de aproximadamente 1/75000. En el grupo inmunizado con BLS-OMP31 notamos una respuesta levemente inferior tanto para OMP31r como para BLS comparado con los otros grupos, pero estas diferencias no son significativas cuando comparamos los grupos con un ANOVA a una vía (GraphPad Prism).

7. Estudio de estabilidad – inmunogenicidad de las proteínas RibH2 de *Brucella* spp. y de *Mesorhizobium loti*.

7.1. Características de RibH2 de *Mesorhizobium loti*.

Mesorhizobium loti es una $\alpha 2$ -proteobacteria que está filogenéticamente relacionada con *Brucella*.

El género *Mesorhizobium* pertenece a la familia Phyllobacteriaceae dentro del orden Rhizobiales. Los miembros que lo conforman se destacan por ser bacterias de suelo que pueden hallarse en forma libre o bien como simbioses fijadores de nitrógeno atmosférico en la raíz de plantas leguminosas, donde se localizan en pequeños órganos llamados nódulos radiculares. Existe una gran cantidad de microorganismos que son capaces de llevar a cabo este proceso, los cuales se conocen con el nombre general de “rizobios”. Estos incluyen a diversos géneros, además del ya señalado, entre los que se destacan *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Gage, D. J. 2004).

La fijación de nitrógeno, que corresponde a la reducción del mismo de su forma diatómica gaseosa al ion amonio, se da en estas bacterias a través de un proceso simbiótico llevado a cabo con leguminosas, un conjunto de plantas con flores perteneciente a la familia Fabaceae. El trébol, la arveja y la alfalfa son ejemplos cotidianos de las mismas. Por otro lado, la simbiosis resulta en un beneficio mutuo ya que la planta asimila el amonio producido por el microorganismo para fabricar aminoácidos, mientras que la bacteria recibe a cambio compuestos orgánicos que le sirven como fuente de carbono y de energía.

La “comunicación” entre ambas especies para el establecimiento de una relación simbiótica exitosa ocurre por medio de compuestos químicos en la raíz de la planta. Brevemente, esta última secreta en forma continua flavonoides al exterior, que corresponden a compuestos fenólicos capaces de ser sensados por el rizobio. Ante su presencia, la bacteria libera un conjunto de oligosacáridos conocidos como factores Nod que originan en la planta una alteración del pelo radicular y la formación de un tubo de infección. Eventualmente, la bacteria es internalizada en este último donde se diferencia a bacteroide fijador de nitrógeno molecular (Perret, X. *et al.* 2000; Schultze, M. and Kondrosi, A. 1998; Spaink, H. P. 2002).

Por lo general se observa una cierta especificidad entre el rizobio y el tipo de planta asociados. En este sentido *M. loti*, una de las especies más importantes del

género *Mesorhizobium*, se relaciona simbióticamente con leguminosas del género *Lotus* entre las que se destacan *L. japonicus* y *L. corniculatus* (Perret, X. *et al.* 2000).

El genoma de la cepa MAFF303099 de *M. loti* que se encuentra secuenciado (Kaneko, 2000) codifica para una lumazina tipo 2 que es una proteína homóloga a la lumazina de *Brucella* spp. estudiada en nuestro grupo. Por lo tanto se estudiaron y compararon ciertas características de ambas proteínas, más aún teniendo en cuenta las grandes diferencias funcionales que existen entre estos dos géneros.

El alineamiento de secuencia de las RibH2 de *M. loti* y *Brucella* muestra un 61 % de identidad (figura 32, (Klinke, S. *et al.* 2007))

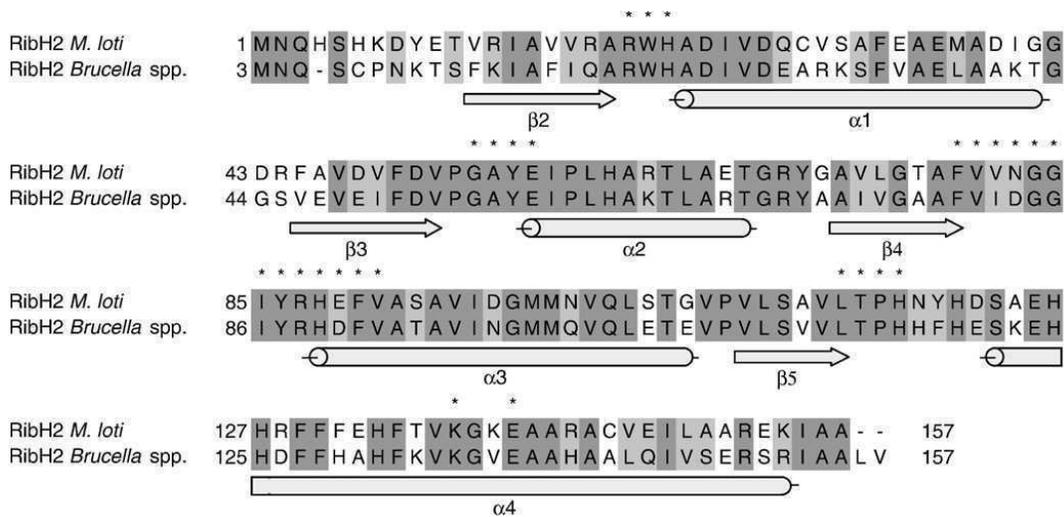


Figura 32. Alineamiento de secuencia de las RibH2 tipo II de *Brucella* spp. y *M. loti*. La estructura cristalográfica resuelta de RibH2 esta disponible en Protein Data Bank accesión codes 1D10, 1T13 and 1XN1. (Figura extraída de (Klinke, S. 2007)).

En el laboratorio se pudieron obtener cristales de RibH2 de *M. loti* unida al análogo del inhibidor de sustrato NRP. Estos cristales difractaron a una resolución de 2,5 Å y se pudo resolver la estructura. Los estudios previos realizados por “static light scattering” anticiparon que esta proteína tiene una estructura decamérica, luego con la resolución de los cristales se confirmó que tiene una estructura de dímero de pentámero (Klinke, S. *et al.* 2007). Por lo tanto RibH2 de *Brucella* es la primer lumazina sintasa que tiene esta inusual estructura y RibH2 de *M. loti* es la segunda.

RibH2 de *Brucella* (o BLS) tiene una serie de contactos tipo stacking aromáticos entre los residuos pertenecientes a diferentes pentámeros en la interfaz de la proteína y creemos que esta es una de las razones por las que BLS es tan estable. En el análisis de la estructura se ven un total de 15 contactos: His 119-His 120' (5), His 120-His 119' (5) e His 121a-His121a' (5) (analizado en (Klinke, S. *et al.* 2005)). Por el contrario, RibH2 de *M. loti* presenta un residuo de asparagina en la posición 119

(posición 120 en *Brucella*), entonces se pierden 10 de las 15 interacciones. Sin embargo, esta proteína ha evolucionado para desarrollar una nueva solución estructural para aumentar su estabilidad: dos nuevos puentes salinos intrapentaméricos entre Arg 128 – Glu 132' y Glu 132 – Arg 128', en cuatro de las 5 cadenas, dando lugar a 8 contactos nuevos que conectan ambos pentámeros (figura 33).

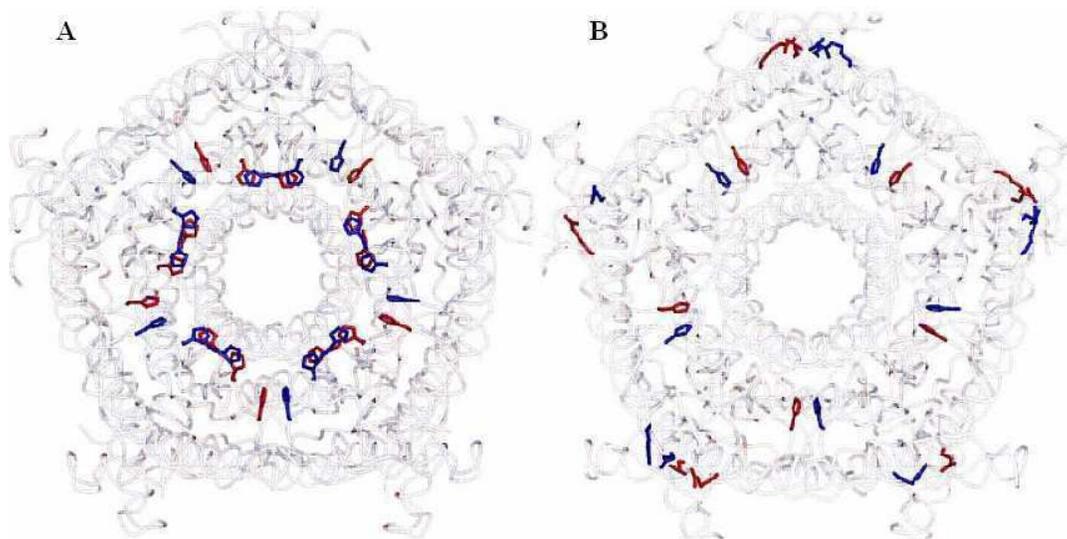


Figura 33. Contactos en las interfaces pentámero-pentámero de RibH2 de *Brucella* spp. (o BLS) (A) y de RibH2 de *M. loti* (B). Se representan los residuos de cada pentámero con colores diferentes. (Figura extraída de (Klinke, S. 2007)).

Estas diferencias estructurales encontradas en ambas proteínas nos hacen suponer que existe una diferencia de estabilidad en los dímeros de pentámero (Klinke, S. 2007), por lo tanto RibH2 de *M. loti* es una buena candidata para estudiar su estabilidad, inmunogenicidad y compararla con RibH2 de *Brucella* spp.

7.2. Clonado y expresión de RibH2 de *Mesorhizobium loti*.

El gen de RibH2 de *M. loti* fue clonado en el laboratorio en el vector de expresión que utilizamos en todos los clonados, pET11a. El vector se transformó en la cepa de bacterias BL21 de *Escherichia coli* y la proteína fue expresada en las mismas condiciones que el resto de las proteínas expresadas en esta tesis. El peso molecular del monómero es de 17,2 kDa.

7.3. Purificación.

Se utilizó el mismo protocolo de purificación que para el resto de las proteínas. Luego de la expresión la proteína se encontró tanto en la fracción citoplasmática como en cuerpos de inclusión. Se continuó con los dos pasos de purificación (Q-Sepharosa y superdex 200) a partir de la fracción citoplasmática y se obtuvieron aproximadamente 70 mgr de proteína pura por litro de cultivo.

7.4 Análisis de estructura secundaria.

Mediante dicroísmo circular en el UV lejano, estudiamos la estructura secundaria de ambas proteínas. Como mostramos en la figura 34 los espectros son prácticamente superponibles. Esto nos indica nuevamente que la estructura secundaria de ambas proteínas es la misma y que además están bien plegadas luego de la purificación.

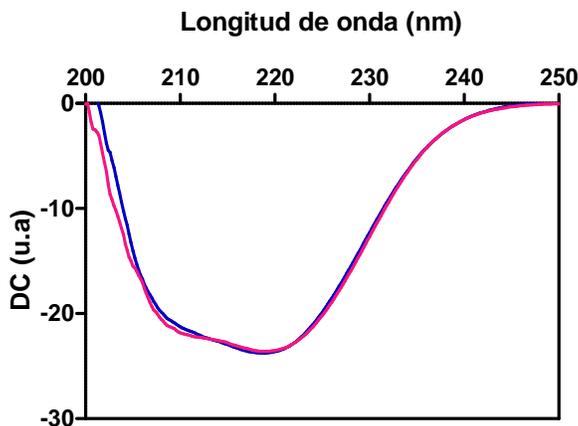


Figura 34. Espectro de DC en el UV lejano de RibH2 de *M. loti* (línea rosa) y de *Brucella* spp. (línea azul). Se grafican unidades arbitrarias de DC en función de la longitud de onda. Las proteínas se utilizaron iodoacetiladas y en buffer PBS en una concentración 10 μ M de monómero.

7.5. Análisis de estabilidad.

Queríamos comprobar si existía una diferencia de estabilidad real entre ambas RibH2, de acuerdo a las características observadas en el análisis estructural. Para estudiar esta característica decidimos medir la estabilidad térmica de las proteínas y compararlas, ya que éste es un parámetro que podemos medir en forma sencilla y rápida y nos da una prueba directa de la estabilidad de ambas proteínas. De acuerdo a

lo que mostramos en la figura 35, RibH2 de *M. loti* tiene una temperatura de melting aparente bastante más baja que RibH2 de *Brucella* spp., en la curva de desplegamiento se puede ver el proceso de desnaturalización aunque también se ve agregación debido probablemente a los dos residuos de cisteína por monómero presentes en la secuencia. Entonces, como se pudo deducir a partir del análisis estructural hecho en el laboratorio (Klinke, S. *et al.* 2007), pudimos probar que RibH2 de *M. loti* tiene una estabilidad marcadamente inferior comparada con la proteína de *Brucella*, ya que la transición comienza aproximadamente 20 °C antes.

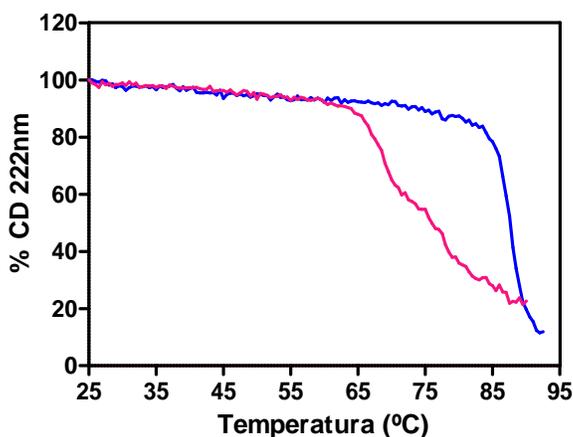


Figura 35. Curvas de desnaturalización térmica por DC a 222 nm de RibH2 de *Brucella* spp. (línea azul) y de RibH2 de *M. loti* (línea rosa). Se graficó el porcentaje de cambio de elipticidad molar a 222 nm en función del aumento de temperatura. Las muestras se utilizaron iodoacetiladas y en buffer PBS.

7.6. Inmunización.

Decidimos inmunizar ratones con ambas proteínas y evaluar si estas diferencias de estabilidad se ven reflejadas en la inmunogenicidad contra las proteínas, para evaluar si RibH2 de *M. loti* también es una buena candidata a ser utilizada como modelo de estudio de proteína transportadora o como plataforma para vacunas.

Dos grupos de 10 ratones Balb/c fueron inmunizados con 10 µgrs de proteína en buffer PBS por única vez y fueron sangrados cada 15 días para evaluar la reactividad de los sueros. Se utilizaron estas condiciones de inmunización porque sabíamos que eran las adecuadas para poder medir respuesta contra RibH2 de *Brucella* spp.

Grupo I: RibH2 de *Brucella* spp. sin adyuvante.

Grupo II: RibH2 de *M. loti* sin adyuvante.

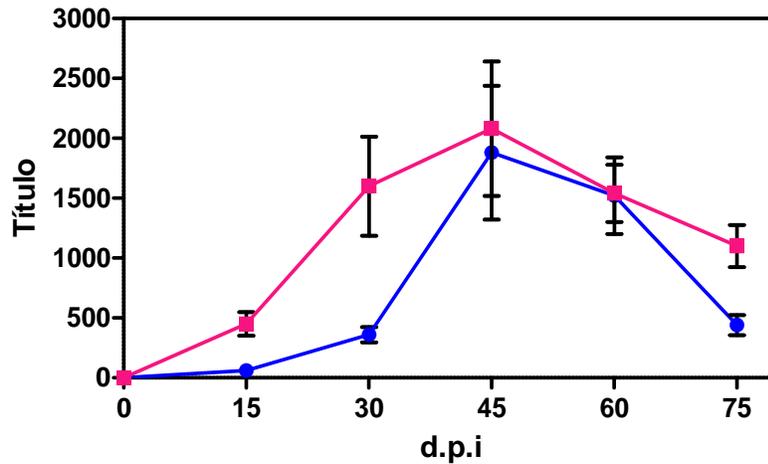


Figura 36. Cinética de la respuesta de IgG de los sueros obtenidos de los sangrados de 15, 30, 45, 60 y 75 días post inmunización con RibH2 de *M. loti* (círculos azules) y de *Brucella* (cuadrado rosa) Diez ratones de cada grupo fueron inmunizados con 10 µgr en buffer PBS en una sola dosis y los sueros fueron obtenidos por sangrado retroorbital. El tiempo cero corresponde al día de la inmunización. Cada símbolo corresponde a la media ± en error medio estándar (SEM, en inglés)

Como vemos en la figura 36, a los 30 días luego de la inmunización es cuando se observa la mayor diferencia entre los títulos de ambas proteínas, 1/360 para RibH2 de *M. loti* y 1/ 1600 para RibH2 de *Brucella*. Pero luego de los 60 días la respuesta contra RibH2 de *M. loti* alcanza los mismos títulos que los obtenidos para RibH2 de *Brucella*, alcanzando valores levemente mayores a 1/1500. Ambas proteínas muestran una respuesta persistente en el tiempo, ya que luego de 75 días luego de la inmunización conservan títulos de 1/ 440 para RibH2 de *M. loti* y de 1/ 1100 para RibH2 de *Brucella*.

8. Conclusiones del capítulo II.

Las mutantes de BLS-OMP31 nos permitieron estudiar su estabilidad por desnaturalización con GdnHCl y temperatura midiendo la señal de dicroísmo circular de las mismas, y evaluar la inmunogenicidad de OMP31 transportado por BLS cuando la proteína transportadora tiene la estabilidad disminuida.

BLS-OMP31-L105A es la mutante de estabilidad más baja encontrada, pero aún tiene una estabilidad suficiente para que BLS siga siendo una proteína transportadora eficiente. Se podrían diseñar mutantes múltiples con el fin de encontrar una proteína de estabilidad aún menor pero en ese caso habría que verificar que estas mutaciones no modifiquen la estructura general y la identidad de la proteína.

Mediante las inmunizaciones realizadas en ratones llegamos a la conclusión de que en el rango de estabilidades estudiadas no se ven diferencias en la inmunogenicidad contra el péptido OMP31.

Por otro lado, evaluamos la estabilidad e inmunogenicidad de una lumazina sintasa de otro organismo con características estructurales muy similares a BLS. Pudimos comprobar que tal como habíamos sugerido luego del estudio estructural de la proteína, esta tiene una estabilidad térmica menor que BLS. Esta diferencia en las estabilidades de las proteínas no se refleja claramente en la inmunogenicidad contra las mismas a largo plazo. Sin embargo, treinta días postinmunización se observa una diferencia notable en los títulos contra las RibH2.

Nuevamente nos encontramos con la evidencia de que una estabilidad térmica de 20 °C menor que la de BLS sigue dando a la proteína una notable estabilidad que nos hace pensar que RibH2 de *M. loti* sería una buena candidata para ser utilizada como proteína transportadora.

Discusión

La inducción eficiente de células B y la generación de células B de memoria requieren dos señales, una primera señal mediada por los receptores B unidos al antígeno y una segunda señal que normalmente proveen las células T. Se ha postulado que el *crosslinking* de receptores de células B en ausencia de otras señales de células T, es suficiente para inducir la producción de anticuerpos. Los antígenos repetitivos pueden inducir este tipo de *crosslinking*, y así amplificar la señal y producir una fuerte respuesta inmune. Se sabe (como se explicó en Introducción) que muchas cápsidas virales tienen un ordenamiento de epitopes repetitivo típico que produce este efecto y genera una rápida respuesta inmune. El sistema inmune de los mamíferos reacciona generando respuestas humorales elevadas contra epitopes que se encuentren altamente organizados. Se podría decir que el sistema inmune ha desarrollado la capacidad de reconocer este tipo de patrones y reaccionar contra los mismos a fin de defenderse contra una posible infección (Bachmann, M. F. *et al.* 1995; Bachmann, M. F. and Zinkernagel, R. M. 1996; Thyagarajan, R. *et al.* 2003).

Existen trabajos en los que se ha evaluado la influencia de la densidad de epitopes en la respuesta de las células B, tanto en un sistema sintético de haptenos acoplados a polímeros (Dintzis, H. M. *et al.* 1976; Feldmann, M. and Easten, A. 1971; Feldmann, M. *et al.* 1975) como en un sistema natural que utiliza proteínas de superficie viral como las VLPs (Bachmann, M. F. *et al.* 1994a; Bachmann, M. F. *et al.* 1993; Bachmann, M. F. *et al.* 1994b; Jegerlehner, A. *et al.* 2002; Zinkernagel, R. M. *et al.* 1997). Estos estudios determinaron que la densidad de un epitope en la molécula transportadora estaría jugando un rol esencial en la activación de células B.

BLS tiene una estructura de homodecámero y es extremadamente estable. Utilizamos a BLS como proteína transportadora, generando fusiones en las que obtenemos una presentación repetitiva, de 10 péptidos por molécula de BLS. Esto genera un ordenamiento y una densidad local alta del epitope y permite una presentación ordenada similar a la observada en estos sistemas ya estudiados.

La definición tradicional de proteína *carrier* o transportadora, es la de una proteína encargada de transportar iones, péptidos o moléculas más grandes a algún compartimiento celular, ya sea atravesando membranas facilitando la difusión (transporte pasivo) o por medio de un transporte activo. En el caso del uso de proteínas transportadoras como BLS, se adapta mejor una definición del tipo de *carrier* o transportador inmunológico, ya que la función principal de este tipo de proteínas no es transportar a una localización determinada sino aprovechar sus características de buen inmunógeno para generar respuesta inmune contra la molécula que transporta.

BLS es un potente inductor de la respuesta humoral generada no sólo contra si misma sino también contra los péptidos o dominios proteicos foráneos que transporta.

En esta tesis estudiamos a BLS como proteína transportadora modelo y evaluamos como impactan en la inmunogenicidad del péptido transportado la densidad de epitopes en la molécula y la estabilidad de la proteína transportadora.

La obtención de proteínas mixtas a partir de distintos tipos de quimeras nos permitió hacer ensayos de inmunogenicidad. La respuesta humoral obtenida para los grupos de ratones inmunizados con los distintos tipos de proteínas mixtas nos permitió explorar el efecto que tiene la exposición de diferentes densidades de epitopes en la inmunogenicidad contra el péptido OMP31. Estos experimentos dieron como resultado que en los grupos inmunizados con BLS transportando 5 péptidos OMP31 se observó una disminución del 50 % del valor densidad óptica (obtenida al medir anticuerpos IgG anti-OMP31) con respecto a los grupos inmunizados con BLS transportando 10 péptidos. Comparando los tres grupos de proteínas mixtas vemos que existe una relación lineal en la respuesta obtenida en ratones inmunizados con 1, 5 o 10 péptidos OMP31 por molécula de BLS (Figura 22 capítulo I de resultados, página 83).

Esta es una conclusión similar a la que arribó hace algunos años el grupo de Martin Bachmann mediante sus estudios con VLPs (Nieba, L. and Bachmann, M. F. 2000), en los cuales pudo establecer que la respuesta de células B aumenta en relación lineal con la organización molecular de los epitopes (figura I-12, introducción página 38).

En los diferentes experimentos de inmunización con proteínas mixtas, demostramos que las diferencias en la respuesta humoral contra el péptido OMP31 se deben exclusivamente a la densidad de epitopes expuestos en la estructura tridimensional de BLS. Es claro que BLS no genera un efecto adyuvante contra el péptido ya que los grupos inmunizados con BLS mezclado con OMP31 (sin estar fusionado) desarrollan una respuesta humoral muy baja, que no fue significativamente mayor que los controles.

Por otro lado (como comentamos en resultados) un concepto bastante frecuente en el área de desarrollo de vacunas es el de “supresión del *carrier*”. Este concepto se define como la inhibición en el establecimiento de la respuesta inmune contra el epitope acoplado a un *carrier*, debido a la presencia de anticuerpos contra el mismo *carrier*. Este concepto, si bien parece explicar el caso de inhibición en la vacunación con cepas de virus atenuados en infantes, que cuentan con los anticuerpos neutralizantes maternos, no es tan claro en el uso de proteínas transportadoras como las VLPs. Si bien el concepto de supresión del *carrier* no alcanza a todas las proteínas utilizadas como *carrier* o transportadoras, a muchas de las cuales no han sido expuestos los individuos vacunados, es un concepto que se ha extendido en el campo de la investigación de vacunas. Siguiendo esta línea de trabajo, Ruedl y colaboradores

estudiaron cómo afectan los anticuerpos producidos por un *carrier* basado en el *core* antigénico del virus de la hepatitis B (HBcAg) fusionado a distinto número de epitopes de LCMV (*lymphocytic chorio-meningitis virus*, en inglés). Como este *carrier* no está involucrado en las interacciones virus – receptor y no es un *target* de los anticuerpos neutralizantes, era una buena estrategia para estudiar la influencia de los anticuerpos específicos anti VLPs sin la interferencia de las interacciones virus – hospedador. Este grupo estudió a estas VLPs fusionadas a péptidos asociados a presentación en MHC de clase I o de clase II. Para ambos tipos de péptidos la respuesta humoral contra los mismos no se vio afectada por la presencia de anticuerpos específicos contra el *carrier*, y la presentación antigénica en células dendríticas no se modificó por la presencia de anticuerpos anti VLPs (Ruedl, C. *et al.* 2005a).

En el caso de nuestro modelo de proteína transportadora demostramos que no existe un efecto de “supresión del *carrier*”, ya que en el segundo diseño de experimentos de inmunización igualamos la cantidad de BLS utilizada en todos los grupos y la tendencia de las respuestas humorales no se modificó y sigue manteniéndose una relación lineal entre densidad de epitopes y respuesta humoral.

Por lo tanto, esta es una de las características que hace de BLS una buena opción para ser utilizada como proteína transportadora en una plataforma para el desarrollo de vacunas. BLS es una excelente proteína transportadora que permite un ordenamiento y concentración local de los péptidos que favorece la respuesta humoral contra los mismos, es decir que induce un efecto *carrier* que aumenta la inmunogenicidad contra los péptidos transportados. Este trabajo extiende entonces, las conclusiones aportadas por el grupo de Martin Bachmann (que utilizó estructuras proteicas naturales de virus) a un sistema de diseño e ingeniería de vacunas con antígenos foráneos como es la plataforma de BLS. Este concepto es de gran importancia para el desarrollo de vacunas.

Sin duda, como hemos expuesto hasta aquí, una de las claves de la eficiencia de BLS como proteína transportadora y como inductora de la respuesta humoral contra los péptidos que transporta es su alta inmunogenicidad intrínseca y su estructura repetitiva que posibilita la presentación ordenada de epitopes.

En este trabajo de tesis también hemos explorado e intentado establecer cuál es la importancia de que BLS tenga una alta estabilidad estructural para su función como *carrier* de péptidos foráneos. Desde hace tiempo se discute si la persistencia de la respuesta inmune contra antígenos se debe exclusivamente a la presencia de células de memoria o si existen reservorios de antígeno en algún compartimento sub-celular o en la superficie celular (Bachmann, M. F. *et al.* 1997; Storni, T. *et al.* 2003;

Zinkernagel, R. M. *et al.* 1997). Nos preguntamos si la elevada y persistente respuesta humoral intrínseca de BLS está relacionada con su inusual alta estabilidad, y si, por otro lado, esta característica permite que haya un reservorio de proteína y que persista por más tiempo en circulación y esto favorezca una respuesta humoral alta y prolongada en el tiempo. Aún hoy, a pesar de los numerosos estudios sobre el tema, no está claro cuáles son las características que hacen a una proteína un buen inmunógeno y que cumpla con los requisitos para generar una respuesta inmune robusta y protectora.

Se sabe que mientras los anticuerpos reconocen antígenos intactos, los linfocitos T reconocen péptidos cortos presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad para inducir respuestas antígeno específicas a proteínas extrañas y tolerancia a proteínas propias. Los péptidos generados por proteólisis lisosomal se unen a moléculas del MHC de clase II, que están disponibles en la superficie de células presentadoras de antígenos como los macrófagos, las células dendríticas y las células B. Delamarre y colaboradores estudiaron el contenido de proteasas lisosomales en distintos preparados de macrófagos y células dendríticas. En todos los casos pudieron observar que el contenido de estas proteasas en macrófagos siempre es mayor que en células dendríticas. Además, mediante diferentes vías de inmunización y utilizando distintas proteínas observaron que la vida media de las proteínas siempre es mayor en células dendríticas que en macrófagos. En células dendríticas aún a las 28 horas post inmunización se encontraba proteína, mientras que en macrófagos la misma había sido totalmente degradada. Este grupo concluye que independientemente de la vía de inmunización, o de la habilidad de otras células presentadoras para internalizar el antígeno, hay una supervivencia selectiva a largo plazo de los antígenos en las células dendríticas que podría ser responsable de la permanencia de los antígenos en órganos linfoides secundarios. El limitado potencial proteolítico de las células dendríticas podría mejorar su habilidad para diseminar antígenos a través del sistema inmune minimizando la destrucción de los antígenos internalizados (Delamarre, L. *et al.* 2005).

La capacidad de las células presentadoras de antígeno de generar complejos péptido-MHC es esencial para iniciar la respuesta inmune (Banchereau, J. and Steinman, R. M. 1998; Germain, R. N. 1994). Aunque la interacción entre péptidos y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y la capacidad del repertorio de células T de generar receptores antigénicos específicos han sido extensamente estudiados, continúa siendo difícil predecir los determinantes antigénicos de una proteína (Garcia, K. C. and Adams, E. J. 2005; Lovitch, S. B. and Unanue, E. R. 2005). Como consecuencia, se sabe muy poco sobre las diferencias en

la inmunogenicidad de distintos antígenos proteicos y por lo tanto, los enfoques que se abordan para inducir inmunidad antígeno específica son sólo empíricos (Benjamin, D. C. *et al.* 1984; Sela, M. and Pecht, I. 1996).

En nuestro grupo hemos demostrado que BLS activa células dendríticas a través de TLR4 (*toll-like receptor 4*, en inglés) (Berguer, P. M. *et al.* 2006). Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos especializadas, cuya función es esencial para el inicio y la regulación de la respuesta inmune. Seguramente la capacidad de BLS de activar células dendríticas es una de las razones de que esta proteína genere una alta y persistente respuesta inmune. En este contexto, creemos que la elevada estabilidad y resistencia a proteasas de BLS (figura 37) contribuye a que la proteína permanezca por más tiempo en ganglios linfoides y en circulación. La mutante de BLS, L105A, mostró tener una estabilidad térmica reducida (una T_m 13 °C menor que BLS) y también mostró ser más sensible a proteasas.

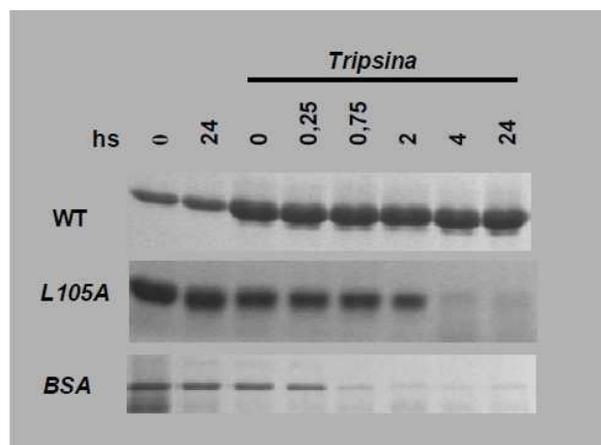


Figura 37. Proteólisis limitada de WT (BLS) y L105A (mutante de BLS). Una muestra de BLS, BLS-L105A ó BSA fue incubada con tripsina a 37 °C durante el tiempo indicado. Pasado dicho lapso, se tomó una fracción, incubó con buffer de corrida, calentó y se sembró en un gel de poliacrilamida al 15 % (SDSPAGE). Una muestra de cada una de las proteínas utilizadas, fue incubada a 37 °C durante 24 h sin el agregado de tripsina a modo de descartar un evento de degradación no enzimática (ó bien por enzimas presentes en la muestra proteica). En todos los casos, la relación sustrato enzima utilizada fue de 50:1 (Zylberman, V. 2006)

En el laboratorio se realizaron recientemente ensayos de cultivo de macrófagos incubados con BSA o BLS marcadas. Se estudió permanencia de las proteínas por microscopía confocal. Estos experimentos mostraron que luego de 4 horas la proteína BSA (utilizada como control) se encuentra totalmente degradada, mientras que BLS está intacta. Por otro lado, se comenzó a estudiar la permanencia de BLS en estado nativo *in vivo* en ratones inmunizados con la proteína recombinante. Para este fin, se marcó a BLS con fluoresceína (BLS-5IAF), se inmunizaron ratones por vía subcutánea

en la almohadilla plantar y luego de 18 hs se extrajeron los ganglios drenantes del bazo y se procesaron para citometría de flujo marcándose con anticuerpos anti-CD11c y anti-CD19 acoplados a fluorocromos. Los resultados obtenidos muestran que BLS se encuentra asociada a CDs y a linfocitos B a las 18 hs post-inmunización en dichos órganos. Se planifica verificar la resistencia de BLS y mutantes de baja estabilidad como BLS-L105A a proteasas lisosomales en cultivo y por otro lado realizar ensayos in vivo para ver localización y permanencia de las proteínas en distintos órganos linfoides secundarios.

Creemos que la elevada estabilidad de BLS estaría jugando un rol esencial en la permanencia de la proteína por largos períodos de tiempo en animales inmunizados, y como consecuencia en la persistencia de altos títulos de anticuerpos anti-BLS.

Los resultados obtenidos en los estudios comparativos de inmunogenicidad de BLS y la proteína RibH2 de *M. loti* nos dan una pista de que la alta estabilidad de BLS estaría jugando un rol importante en la inmunogenicidad. En los primeros 30 días post inmunización se observa una diferencia de respuesta notable entre ambas proteínas, mostrando títulos promedio de 1/360 para RibH2 de *M. loti* y 1/1600 para RibH2 de *Brucella* (BLS). Estas diferencias observadas en los títulos de anticuerpos de los ratones inmunizados podrían deberse a las diferencias de estabilidad encontradas. Sin embargo también es posible atribuir estas diferencias a que son proteínas distintas y tienen epitopes diferentes, ya que comparten un 61 % de homología de secuencia.

Por otro lado, con el objetivo de ver si la inmunogenicidad contra L105A (mutante de baja estabilidad de BLS) se veía modificada por la diferencia de estabilidad con BLS, en el laboratorio se hicieron experimentos de inmunización en ratones con esta mutante. No se observaron diferencias en las respuestas humorales de BLS y L105A (datos no publicados). BLS y L105A generan respuestas humorales altas aun en bajas dosis y sin adyuvante. BLS-OMP31, sin embargo, es un sistema de estudio mucho más sensible que BLS, ya que la respuesta humoral contra el péptido es menor. Por esta razón creímos que era un buen modelo para estudiar el efecto de la estabilidad en la inmunogenicidad. Pero en este caso tampoco se obtuvieron diferencias significativas en las respuestas humorales de los grupos, a pesar de que la mutante BLS-OMP31-L105A tiene una T_m casi 15 °C menor que BLS-OMP31. Una T_m de 73 °C como es el caso de esta mutante, es un valor de T_m alto que indica que es una proteína que tiene una estabilidad muy alta si la comparamos con la estabilidad de las proteínas en general. Creemos entonces que es probable que en nuestro sistema experimental la estabilidad de la mutante BLS-OMP31-L105A sea aun lo suficientemente alta como para no ver diferencias en la respuesta inmune inducida.

Hay pocos grupos que hayan estudiado este aspecto y hayan podido establecer una relación entre estabilidad de una proteína e inmunogenicidad. Pina y colaboradores demostraron que las diferencias de estabilidad encontradas en mutantes puntuales de la subunidad B de la toxina Shiga no se traducían en diferencias en la eficiencia de presentación de una proteína antigénica modelo. La subunidad B no tóxica de la toxina Shiga es un homopentámero muy estable con una T_m de 79 °C y está involucrada en el *binding* y tráfico intracelular de las holotoxinas. En este trabajo lograron obtener un grupo de mutantes puntuales en las cuales los sitios mutagenizados estaban situados en regiones de interacción entre monómeros. Dos de las mutantes obtenidas fueron menos estables que la WT, con una T_m 11 °C menor. Posteriormente fusionaron un péptido de ovoalbumina (OVA₂₅₇₋₂₆₄) al extremo C-terminal de estas proteínas y observaron que la internalización de las proteínas con péptido fusionado en células HeLa y en células dendríticas no estaba modificada con respecto a la WT. Además midieron la eficiencia de estas proteínas de introducir al péptido OVA en la ruta de MHC de clase I de células dendríticas y observaron que no había diferencias significativas entre la WT y las mutantes de estabilidad. Por lo tanto concluyeron que el procesamiento del antígeno no se vio modificado por la diferencia de estabilidad de la molécula transportadora (Pina, D. G. *et al.* 2008).

Por los resultados obtenidos, podemos concluir que en el rango de estabilidad en el que estamos trabajando la estabilidad no estaría jugando un rol esencial en la inmunogenicidad contra el péptido transportado. La proteína RibH2 de *M. loti* resulta una opción interesante para estudiar qué pasaría con la inmunogenicidad contra un péptido fusionado a la misma. También se podría generar mutaciones múltiples en BLS a fin de encontrar una mutante en la que la estabilidad se vea aún más disminuida y utilizarla para seguir estudiando el efecto sobre la inmunogenicidad. En este sentido, se tendría que corroborar que la proteína no pierda identidad y que su estructura no se vea afectada.

Conclusiones generales

Las conclusiones más importantes de este trabajo son:

Capítulo I:

- BLS se utilizó exitosamente en el transporte de distintos péptidos y se obtuvo respuesta humoral contra los mismos.
- Se utilizó a BLS como modelo para estudiar como influye la repetitividad de epitopes en la inmunogenicidad contra los mismos. Se demostró que inmunizando ratones con la construcción que presenta 5 péptidos por molécula de BLS se obtiene una disminución del 50 % de densidad óptica que la obtenida a partir de las inmunizaciones realizadas con la construcción con 10 péptidos. Esto significa que la cantidad de epitopes presentada por BLS afecta la respuesta humoral, y que existe una relación lineal entre ambas.
- La proteína mixta que transporta un sólo péptido no genera respuesta humoral apreciable en los ratones inmunizados. Esto pone de manifiesto la importancia de la repetitividad en la respuesta generada por los epitopes presentados por BLS.
- Esta última conclusión podría no ser aplicable para el caso del transporte de dominios proteicos o proteínas enteras, ya que en ese caso particular habría que estudiar la inmunogenicidad contra estos y ver si esta relación lineal se mantiene o se ve modificada por tener estructura secundaria y un peso molecular mayor que el de un péptido.
- Este trabajo refuerza y extiende las conclusiones a las que arribo el grupo de Bachmann (con el modelo de estructuras proteicas naturales de virus) a un sistema de ingeniería de vacunas con antígenos foráneos como es el modelo de BLS. Este es un concepto muy importante para el desarrollo de vacunas y en particular para la plataforma de BLS.

Capítulo II:

- Se generaron mutaciones puntuales sobre BLS-OMP31 que afectaron su estabilidad sin generar disturbios en su estructura secundaria.
- Se estudió la inmunogenicidad de las mutantes y se pudo concluir que las diferencias de estabilidad encontradas no se veían reflejadas en la inmunogenicidad contra OMP31.
- Se hizo un estudio comparativo de BLS con otra lumazina, RibH2 de *M. loti* y se vio que la estabilidad de esta proteína fue menor que la de BLS, presentando una T_m 20°C menor.
- Hicimos un estudio comparativo de la respuesta humoral generada en ratones inmunizados con estas proteínas y pudimos ver que luego de 30 días de la

inmunización hay una diferencia notable en los títulos. Esta diferencia se hace menos importante luego de los 60 días.

Conclusión general:

BLS es una proteína con características estructurales, de estabilidad y de inmunogenicidad intrínseca que la hacen muy interesante para su utilización como transportadora de péptidos y otras moléculas.

Su capacidad de aumentar la inmunogenicidad de la molécula que transporta, la posibilidad de obtener en forma sencilla, una proteína de fusión con una densidad local de epítopes alta y una estabilidad elevada que permite que la proteína permanezca más tiempo en circulación o en reservorios cuando es administrada en animales, hace de BLS una plataforma muy útil para el desarrollo de vacunas.

En este trabajo de tesis pudimos establecer la importancia de la densidad local de epítopes. Mostramos que se observa un incremento lineal en la respuesta humoral cuando exponemos 1, 5 o 10 péptidos OMP31 en la molécula de BLS. Comprobamos que se necesita exponer al menos 5 péptidos en una cara de la molécula para obtener una respuesta humoral apreciable. En el caso de su utilización biotecnológica no sería conveniente entonces construir proteínas mixtas de más de dos péptidos desde el punto de vista inmunológico y también porque los costos de obtener proteínas mixtas con más de dos péptidos harían inviable su escalado industrial.

Por los resultados obtenidos, podemos concluir que en el rango de estabilidad en el que trabajamos esta no estaría jugando un rol esencial en la inmunogenicidad contra el péptido transportado. Futuros estudios en este y otros sistemas permitirán dilucidar el rol de la estabilidad en la inmunogenicidad de las proteínas.

Materiales y Métodos

1. Construcción de quimeras de BLS

La secuencia del gen que codifica para BLS, obtenida previamente por el Dr. F. Goldbaum (Goldbaum, F. A. *et al.* 1999) a partir del genoma de *Brucella abortus*, estaba clonada en el plásmido de expresión pET11a (Novagen) (figura I). La secuencia de BLS fue subclonada en el plásmido pALTER-Ex1 (Promega) (figura II) para generar por mutagénesis los sitios de digestión Nsi I y Afl II. Luego esta construcción es subclonada nuevamente al plásmido pET11a. Esta mutante de BLS en el plásmido pET11a es la plataforma que utilizamos para la construcción de quimeras que contienen distintos péptidos (Laplagne, D. A. 2003).

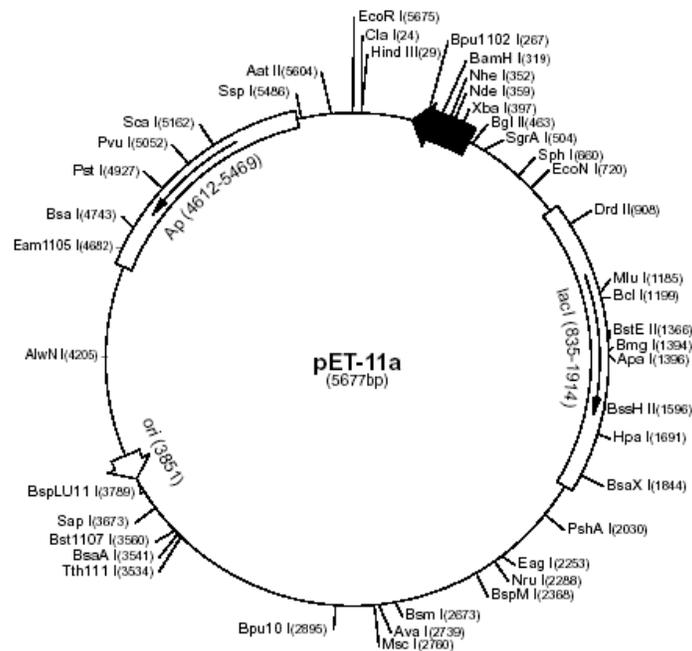


Figura I. Mapa del plásmido pET 11a

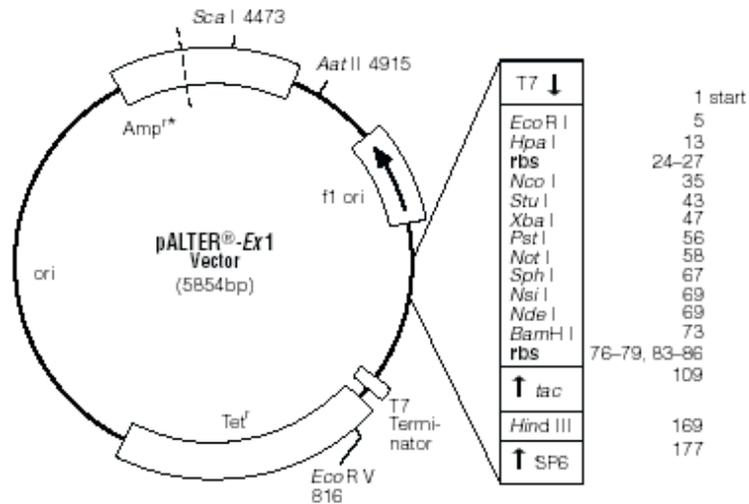


Figura II. Mapa del plásmido pALTER.

1.1. Protocolos de construcción de las proteínas quiméricas

Para la construcción de un gen quimérico, un inserto sintético doble cadena, conteniendo la secuencia del péptido de interés se liga a un vector previamente digerido con las enzimas de restricción Nsi I (New England Biolabs) y Afl II (NEB). El vector utilizado fue pET11a-"quimera", donde "quimera" representa alguna de las construcciones realizadas (ej: BLS-OMP31, BLS-KETc1, etc).

1.1.1. Inserto sintético

Se diseñan dos oligonucleótidos de manera que al aparearse formen un ADN doble cadena conteniendo la secuencia que codifica para el péptido que se desea insertar, flanqueada por los extremos cohesivos propios de las enzimas de restricción Nsi I y Afl II.

La secuencia "linker" (los aminoácidos glicina y serina) se agregó a la secuencia de los péptidos más cortos. Los oligonucleótidos se obtienen por síntesis química (IDTDNA, fosforilación 5', purificación por electroforesis en gel de poliacrilamida, escala 250 nanomolar). Los mismos se resuspenden en agua milliQ a una concentración 100 pmol/μl. Se prepara luego la "mezcla de apareado" como sigue,

- 10 μl oligo. "for"
- 10 μl oligo. "back"
- 10 μl buffer STE 10X
- 70 μl agua milliQ

La muestra se calienta a 100°C y se deja enfriar en baño térmico lentamente (usualmente toda la noche), de manera de maximizar la eficiencia del apareado.

En la tabla I se muestran las secuencias de los péptidos utilizados en esta tesis.

Tabla I. Secuencias de los péptidos utilizamos en las quimeras con BLS.

OMP31	5' TAACGCCGGTTACGCAGGCGGCAAGTTCAAGCATC CATTTTCTAGCTTTGACAAGGAAGACAACGAACAGGTTT CCGGTTCGC 3'
KETc1	5' TGCCCCGATGAGCACGCCGAGCGCCACGAGCGTCC GCGGTAGCC 3'
AMY	5' TGATGCCGAATTCGTCACGATTCTGGTTACGAAGT CCACCACCAGAAAGGTAGCC 3'

1.1.2. Digestión del vector

Se obtiene masa suficiente del vector a digerir por miniprep. Se prepara la "mezcla de digestión" como sigue,

- 30 µl vector
- 2,5 µl Nsi I
- 2,5 µl Afl II
- 5 µl buffer Nsi I 10X (NEB)
- 0,5 µl BSA (NEB)
- 9,5 µl agua milli

Se prepara en paralelo una mezcla sin inserto como control negativo de la reacción de ligación. Las mezclas se ubican en baño a temperatura ambiente en recipiente aislante, el cual se deja enfriar lentamente a 4°C.

1.1.3. Screening de la ligación por colony-PCR

Las mezclas de ligación se utilizan para transformar bacterias *E. coli* DH5α o JM109 por el método de shock térmico o de electroporación, alternativamente. Las transformaciones se aplican en cajas de petri de medio LB-agar/Ampicilina y se incuban a 37°C por 16 horas. Un número de colonias se somete a colony-PCR. Para esto, la colonia se suspende en 50 µl de agua y se incuba a 100°C por 10'.

Se prepara la "mezcla de PCR" como sigue,

5 µl suspensión colonia

1 µl oligo. "for". (5 pmol/µl)

2,5 µl oligo. T7-terminator (2 pmol/µl)

5 µl buffer Termopol 10X (NEB)

5 µl dNTPs (2,5 mM) (Promega)

0,5 µl Taq-polimerasa (Fundación Instituto Leloir)

31 µl agua milliQ

El oligonucleótido "for" a utilizar es el correspondiente al gen quimérico que se está obteniendo, el mismo que sirvió para la obtención del inserto sintético.

La mezcla de PCR se somete al ciclo térmico que se muestra en la tabla II.

Tabla II. Programa de PCR en los *screening* por PCR de las colonias.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
94	5
94	0,5
60	1
72	1
72	10

} 25 ciclos

Las reacciones de PCR se siembran en gel de agarosa 1,3%. Se identifican como clones positivos aquellos para los que se observa un producto de PCR del tamaño esperado, el cual varía según el largo del oligonucleótido "for" utilizado. Al menos un clon positivo de cada *screening* se confirma por secuenciación del marco de lectura completo del gen utilizando los primers T7-promoter y T7-terminator.

2. Expresión recombinante de BLS y quimeras de BLS.

El plásmido pET11a conteniendo el gen quimérico se introduce a bacterias *E. coli* BI21(DE3) por transformación por shock térmico, tras lo cual se siembran las bacterias en placa de LB-agar/Ampicilina. Para las pruebas de expresión en escala pequeña, 2 ml de medio LB/Ampicilina se inoculan con una colonia de la placa y se incuban a 37°C con agitación. El cultivo en fase estacionaria se induce con 2 µl de IPTG (1M, IBN). Tres horas más tarde se toman 100 µl de cultivo, se centrifugan y se

resuspende el pellet en 25 µl de buffer muestra 1X para su análisis por SDS-PAGE 15% (Laemmli, U. K. 1970). Para la expresión con fines preparativos se crece un precultivo de 5 ml hasta fase estacionaria, el cual se utiliza para inocular 500 ml de LB/Ampicilina. El cultivo se incuba con agitación a 37°C y se induce con 0,5 ml de IPTG (1M) al alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6-0,8. El cultivo se retira a las tres horas o al día siguiente, alternativamente, y se centrifuga a 4000 g por 20'. El pellet se suspende en 15 ml de solución de suspensión: 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 1% Tritón X-100, pH 8.

La suspensión se somete a 5' de sonicado neto con intervalos de 1' por cada 1' de sonicado y se centrifuga 30' a 20.000 g. El pellet se resuspende en 15 ml de solución de suspensión sin Tritón X-100 y se repite el sonicado. El proceso se repite luego una tercera vez. Los tres sobrenadantes de sonicado contienen la fracción de la quimera expresada en citoplasma, mientras que el pellet final contiene la fracción de cuerpos de inclusión. Los experimentos incluidos en el presente seminario se realizaron con la proteína obtenida a partir de la fracción de cuerpos de inclusión.

3. Purificación de las proteínas.

Los cuerpos de inclusión se resuspenden en buffer PBS con 8 M urea. La resuspensión se dializa contra PBS dos días con un cambio de buffer. La muestra se centrifuga y el sobrenadante se dializa contra buffer A (50mM Tris/HCl, pH 8,5). El primer paso de purificación se realiza por cromatografía en columna de intercambio aniónico MonoQ o Q-Sepharose (Farmacia) en equipo de FPLC (Farmacia). La muestra se inyecta en la columna equilibrada en buffer A y se eluye por gradiente lineal hasta 50% de buffer B (buffer A + 1 M NaCl).

El segundo paso de purificación se realiza por cromatografía en columna de exclusión molecular Superdex 200 (Farmacia). Para esto el pico de la quimera se concentra en tubo Centriprep (Millipore) e inyecta en la columna de la cual se eluye con PBS. La presencia de la proteína quimérica en los picos se evalúa por SDS-PAGE.

4. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

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

5. Obtención de proteínas mixtas.

Las proteínas mixtas se obtuvieron a partir de dos quimeras de BLS transportando distintos péptidos o a partir de la quimera BLS-OMP31 y de la mutante de triptofano de BLS, W22F.

Utilizando las condiciones ya conocidas de los equilibrios de disociación (en 2 M GdnHCl) y desnaturalización (a partir de 4 M GdnHCl) de BLS, obtuvimos dos tipos de proteínas mixtas. Se llevaron a cabo distintos tratamientos explicados a continuación para obtener proteínas mixtas de calidad y con el mejor rendimiento posible.

5.1. Tratamientos para la obtención de las proteínas mixtas.

Proteínas mixtas por disociación: mezclamos las proteínas puras en PBS en una concentración final 1 mg/ml de cada proteína. La mezcla de proteínas se dializa durante 2-3 horas a temperatura ambiente contra un buffer 2 M GdnHCl / PBS (para la proteína mixta BLS-OMP31-KETc1) o 2,3 M GdnHCl / PBS (para W22F:BLS-OMP31 5:5), para lograr la disociación de los pentámeros. Luego la mezcla se dializa contra PBS durante 2-3 hs. Todos los buffers tienen agregado de PMSF 1mM final como inhibidor de proteasas.

Proteínas mixtas por desnaturalización: para este tipo de proteínas mixtas se utilizaron varios protocolos para buscar el que nos daba el mejor rendimiento. Las proteínas siempre se mezclan en una concentración de 1 mg / ml final de cada proteína. Los tratamientos utilizados son los siguientes.

Protocolo 1: las proteínas se mezclan y se dializan contra un buffer 6M GdnHCl / PBS por 2-3 hs a temperatura ambiente. Luego las muestras se dializan contra PBS.

Protocolo 2: mezclamos las proteínas y las dializamos contra 6 M GdnHCl / PBS durante 2-3 hs a temperatura ambiente, luego la mezcla se dializa contra 8 M

urea / PBS. Se recupera la muestra y hacemos una dilución lenta (gota a gota) con PBS en agitación hasta 3 M urea. Luego se dializa la muestra contra PBS.

Protocolo 3: este tratamiento es idéntico al anterior pero se parte de una diálisis en 4 M GdnHCl en lugar de 6 M GdnHCl. El resto de los pasos de diálisis y dilución es igual.

5.2. Tratamientos de renaturalización de BLS-OMP31.

Para mejorar los rendimientos de desnaturalización – renaturalización de BLS-OMP31 se probaron dos tratamientos, uno con el agregado de riboflavina y otro con el agregado de hemina.

5.2.1 Tratamiento con riboflavina.

Preparación de la solución de riboflavina:

1. Disolver una punta de espátula de riboflavina en 30 ml de PBS.
2. Se agita la solución y se ve saturación.
3. Se centrifuga durante 10 minutos a 20000 rpm.
4. Se mide DO a 445 nm.

Esta solución de Riboflavina en una concentración final de 10 μ M se utiliza en las soluciones utilizadas para dializar las muestras de proteínas.

5.2.2. Tratamiento con hemina.

Preparación de la solución de hemina:

1. Se lleva 15 – 20 ml de buffer PBS a pH 10-12 con el agregado de NaOH 1M gota a gota.
2. Agregar 1 a 4 μ l de CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) para evitar la formación de dímeros de hemina (solución preparada agregando una punta de espátula en 20 – 500 μ l de agua milliQ).
3. Agregar una punta de espátula de hemina.
4. Agitar en oscuridad durante 10 minutos hasta que la hemina se disuelva completamente.
5. Llevar a pH 7-9 con HCl.

El color de la solución debe ser marrón oscuro y al verlo a través de la luz es colorado. Un exceso de CTAB da un color verde oscuro.

La solución de stock debe ser aproximadamente de 300 μM .

Para calcular la concentración se mide DO a 385 de una dilución 1/40 de la solución de hemina y se calcula como sigue,

$$[\mu\text{M}] = (\text{Abs } 385 * 1000 / 58,4) * \text{factor de dilución}$$

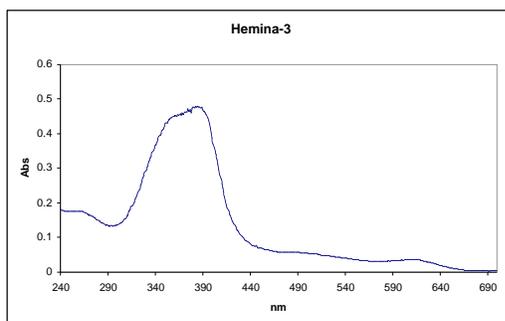


Figura III. Espectro de absorción de la solución de hemina.

Esta solución se mezcla en una proporción 2-5 x hemina:proteína y se incuba 1 h a temperatura ambiente.

Luego se pasa la mezcla de hemina proteína por una columna G25 y se eluye con PBS. De esta manera se elimina el exceso de hemina.

6. Purificación y caracterización de proteínas mixtas por fluorescencia.

6.1. Purificación de las proteínas mixtas.

Luego de elegir el mejor tratamiento y obtener las mezclas de proteínas mixtas estas son dializadas contra un buffer A (Tris 50 mM, pH 8,5) y las distintas especies presentes en la mezcla son separadas en una columna de intercambio aniónico, MonoQ (Amersham Pharmacia) en el mismo buffer A y utilizando un gradiente de NaCl hasta 1M. Luego las fracciones colectadas durante la corrida son visualizadas en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

6.2. Análisis de las poblaciones purificadas.

Se midió fluorescencia intrínseca del triptofano de las fracciones purificadas. Se tomaron espectros de emisión en un espectrofluorímetro Jasco FP-770 a 25 °C. Se fijó la luz de excitación de las muestras en 295 nm y se tomaron los espectros de emisión en un rango de 300 a 500 nm.

Se utiliza el máximo de emisión a 360 nm para comparar las distintas fracciones y relacionar con el número de triptofanos de la molécula mayoritaria de la muestra. Los valores de las fracciones se expresan en porcentajes, tomando como el 100 % la fluorescencia emitida por BLS-OMP31 que tiene un triptofano por monómero, es decir, el máximo de 10 triptofanos por moléculas.

7. Mutagénesis sitio dirigida de BLS-OMP31.

El método de mutagénesis sitio dirigida de BLS-OMP31 implementado, fue descrito por Kamman *et. al.* (Kamman, M. *et al.* 1989). Se utilizaron tres reacciones de amplificación en cadena (PCR). En todas las PCR se utilizó la enzima pFu (purificada en la Fundación Instituto Leloir), los buffers apropiados (Promega) y el termociclador (TECHNE). En la primera PCR (PCR1) se utilizó como templado al plásmido pET11a-BLS-OMP31 y como cebadores al oligonucleótido universal T7 terminator, cuya secuencia se encuentra río abajo del sitio de clonado (figura I) y a alguno de los oligonucleótidos que aparecen en la Tabla 12, según la variante de BLS-OMP31 que se quería obtener (sintetizados por IDT Integrated DNA Technologies). Este último contiene una secuencia de 25-35 nucleótidos los cuales son complementarios a una región del gen de BLS salvo en un determinado codón (ubicado en el centro de dicha secuencia) que codifica para el aminoácido que se desea que reemplace al aminoácido salvaje. El producto de ésta PCR fue purificado y utilizado como “mega-primer o mega-cebador” para la segunda reacción de amplificación (PCR2). En esta PCR2 se utilizó al plásmido pET11a-BLS-OMP31 como templado y como segundo cebador al oligonucleótido universal T7 promoter. El producto purificado de esta reacción fue utilizado como templado de la última PCR (PCR3), realizada solamente con la finalidad de aumentar la masa del producto de PCR2. En la misma se utilizaron los dos cebadores universales T7t y T7. Se realizaron 30 ciclos de amplificación: 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, y 72 °C durante 1 min, concluido el último ciclo se mantuvo la reacción durante 10 min a 72 °C. Como paso final, se purificó al producto de la PCR3, se lo digirió con las enzimas de

restricción XbaI y BamHI (Promega) y ligó al vector pET11a, al cual se trató previamente con las mismas enzimas de restricción.

La mezcla de ligación se utilizó para transformar bacteria *E. coli* DH5α. Se seleccionaron las bacterias transformadas por placa LB-Ampicilina y se tomó una colonia para inocular 5 ml de medio LB-Ampicilina. Se procesó el cultivo ON a fin de obtener una preparación de DNA plasmídico. Ésta preparación se utilizó para una secuenciación (realizada en la Fundación Instituto Leloir). Una vez confirmada la mutación introducida, se transformaron bacterias *E. coli* DE3 con el mismo plásmido secuenciado y se procedió con la expresión y purificación de la proteína como lo indica en los puntos 2 y 3. En el caso de la obtención de las mutantes dobles BLS-OMP31-W22A-F130W, se realizó el mismo procedimiento que el reportado arriba, con la diferencia que en las PCR, se utilizó el templado pET11a-BLS-OMP31-W22A, el cual ya presentaba la mutación W22A. La masa de proteína para cada una de las mutantes se estimó mediante la técnica de Bradford.

Tabla III. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR1.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
P18-W22A	5´ ATTCAGCCCCGCGCCCACGCCGACATC
P18-F127W	5´-AAGGAGCATCACGACTGGTTCCATGCTCAT
P18-L105A	5´-ATGCAGGTGCAGGCTGAAACGGAAGTG

8. Análisis estructural de las mutantes: representación gráfica.

Las representaciones gráficas de las mutantes de BLS se hicieron utilizando el programa PyMol.

9. Estudios de las proteínas en estado nativo – Dicroísmo circular y fluorescencia.

Las proteínas se estudiaron en estado nativo mediante las técnicas de dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca del triptofano.

9.1 Mediciones de dicroísmo circular.

Las mediciones de DC se realizaron en un espectropolarímetro (JASCO J-810) y utilizamos cubetas de cuarzo de 0,1-0,5 cm de ancho. Las muestras se utilizaron en una concentración de 10 μ M de monómero en buffer PBS y se midieron en el UV-lejano en un rango de 200 a 260 nm. Los datos se colectaron a una velocidad de lectura 100 nm/min.

El valor de elipticidad molar se calcula según,

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

Donde s representa el valor de elipticidad en mdg, M es la concentración molar de proteína utilizada, r el paso de luz expresada en cm y p es el número de enlaces peptídicos de la proteína (número de aminoácidos menos uno).

9.2 Fluorescencia intrínseca del triptofano.

Los espectros de emisión fueron tomados en un espectrofluorímetro Jasco FP-770 a 25 °C. Se fijó la luz de excitación de las muestras a 295 nm y se tomaron los espectros de emisión en un rango de 300 a 500 nm. Las proteínas se utilizaron en una concentración 10 μ M de monómero en buffer PBS. El centro de masa (CM) de cada espectro se calculó según la ecuación 2,

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

Donde λ_i representa la longitud de onda i (en nm), y I_i la intensidad de fluorescencia intrínseca en la longitud de onda i. En todos los casos se realizaron mediciones “blanco” con el buffer correspondiente y sin el agregado de proteína. Los resultados informados corresponden a tres mediciones independientes.

10. Curvas de desnaturalización.

Las proteínas en una concentración 10 μ M final de monómero en buffer PBS pH 7 se incubaron durante 2 hs en concentraciones finales crecientes de cloruro de guanidinio partiendo de una solución stock de 6M cloruro de guanidinio. Medimos estas muestras en las condiciones explicadas en el punto anterior y se toma la señal a 222 nm para graficarla en función de la concentración de GdnHCl.

Los ensayos de desnaturalización térmica de las proteínas se llevaron a cabo incubando las muestras en PBS, pH 7,0 y midiendo la variación de la señal de elipticidad molar a 222 nm en función del incremento de temperatura (de 25 a 100 °C a una velocidad de 3 °C/min). Se tomaron medidas de DC cada intervalo de 0,5 °C. Se utilizó un Peltier (Jasco) acoplado al equipo de DC. La T_m se calculó como el punto medio de la transición. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se graficó una curva representativa.

11. Obtención de los parámetros termodinámicos calculados a partir de la curva de desnaturalización con GdnHCl.

En trabajos anteriores del laboratorio la evaluación termodinámica del desplegamiento de BLS inducido por GdnHCl fue ajustado a un modelo de dos equilibrios: $N_{10} \leftrightarrow (2)N_5 \leftrightarrow 5U$. El primer paso ($N_{10} \leftrightarrow (2)N_5$) representa la disociación del decámero (N₁₀) en dos pentámeros plegados (N₅) y el segundo paso ($N_5 \leftrightarrow 5U$), representa la concomitante disociación y desplegamiento de la estructura pentamérica en 5 monómeros desplegados (U).

Para los cálculos efectuados en esta tesis y a fines prácticos se consideró un equilibrio de dos estados, nativo \leftrightarrow desnaturalizado. Esto es debido a que en trabajos anteriores los parámetros correspondientes a los equilibrios de disociación y desnaturalización fueron calculados empleando distintas técnicas, para los equilibrios de disociación se utilizó la técnica de “static light scattering” (SLS) y para los de desnaturalización, dicroísmo circular y fluorescencia (Zylberman, V. *et al.* 2004) pero en esta tesis sólo se mide desnaturalización por dicroísmo circular.

A partir de las curvas de desnaturalización por GdnHCl calculadas para BLS y las mutantes calculamos los parámetros de desnaturalización mediante el método de extrapolación lineal (Ecuación 3) asumiendo que se trata de una transición de dos estados.

$$\Delta G_U = \Delta G_{H_2O} - m * [D] \text{ (Ecuación 3)}$$

En donde ΔG_U es el cambio de energía libre de desplegamiento de la proteína a una determinada concentración de desnaturalizante, ΔG_{H_2O} es el cambio de energía libre de desplegamiento en ausencia de desnaturalizante, m representa la dependencia del parámetro de energía libre con la concentración de desnaturalizante ($[D]$).

La constante al equilibrio k_u y el cambio de energía libre asociado a ésta transición ΔG_u se definieron según las ecuaciones 10 y 11.

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

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

Las fracciones de moléculas en el estado nativo pentamérico (F_{n5}) o desplegado monomérico (F_u) fueron calculadas según las ecuaciones 12 y 13.

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

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

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

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

El valor de D_{50} se obtuvo según la ecuación 15, la cual surge de la condición en que $F_n = F_u$.

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

12. Ensayos de inmunización.

Las proteínas utilizadas para inmunizar ratones machos Balb/c de 6 semanas se usaron en una concentración 10 o 50 μ M en PBS o adyuvante incompleto de Freund según corresponda en cada ensayo. Para el ensayo comparativo de inmunización de RibH2 de *Brucella* y *M. loti* se hizo una única inmunización con 10 μ gr de proteína en PBS. Para las inmunizaciones con quimeras de BLS se hicieron 4 inmunizaciones cada 20 días con 50 μ gr de proteína con o sin adyuvante dependiendo del ensayo.

Para las inmunizaciones de proteínas mixtas las proteínas se utilizaron en las concentraciones que se detallan en las tablas 5 y 6 de resultados.

Se realizaron ensayos de ELISA para medir reactividad de los sueros obtenidos en los sangrados.

13. Ensayos de ELISA.

Se utilizaron placas de alto pegado de poliestireno (Maxisorp, NUNC, Dinamarca).

Los volúmenes utilizados fueron de 50 μ l, excepto el bloqueo que se realizó con 200 μ l. Como bloqueante y diluyente de sueros y conjugados se empleó leche descremada en polvo al 3% y 1% respectivamente en PBS. Entre cada incubación se realizaron 3 lavados con PBS.

La placa se sensibilizó con 0,2 μ g de proteína recombinante en PBS purificada por well o 100 ng del péptido correspondiente por well en buffer carbonato de Na 63,5 mM pH 9,6 ON a temperatura ambiente.

El resto de las incubaciones se realizaron durante 1 h a temperatura ambiente.

Los sueros se utilizaron en una dilución 1/100 salvo en los casos en que se calcularon los títulos. Los mismos se calcularon partiendo de diluciones 1/100 y haciendo diluciones seriadas al medio hasta 1/12800. Se tomó como valor de título la última dilución que resultó ser mayor que el doble del valor del suero negativo.

Se utilizaron anticuerpos anti inmunoglobulinas G de ratón o conejo (según corresponda) conjugados con HRP y se revelaron con con 2 μ g/ μ l de ortho-phenilendiamina y 0.03% H₂O₂ en 0.1 M de buffer fosfato citrato. La reacción se detuvo con 50 μ l de H₂SO₄ 4N. El color desarrollado se leyó a 492 nm en un lector de microplacas.

14. Análisis estadístico.

Las diferencias en las respuestas humorales entre grupos se analizaron mediante test t de Student y ANOVA de 1 vía del programa estadístico GraphPad Prism (versión 2.0, GraphPad, San Diego, CA)

Referencias

Referencias

Adotevi, O., B. Vingert, L. Freyburger, P. Shrikant, Y. C. Lone, F. Quintin-Colonna, N. Haicheur, M. Amessou, A. Herbelin, P. Langlade-Demoyen, W. H. Fridman, F. Lemonnier, L. Johannes and E. Tartour (2007). "B subunit of Shiga toxin-based vaccines synergize with alpha-galactosylceramide to break tolerance against self antigen and elicit antiviral immunity." *J Immunol* 179(5): 3371-3379.

Ainciart, N., V. Zylberman, P. O. Craig, D. Nygaard, H. R. Bonomi, A. A. Cauverhff and F. A. Goldbaum (2011). "Sensing the dissociation of a polymeric enzyme by means of an engineered intrinsic probe." *Proteins* 79(4): 1079-1088.

Albrecht, P., F. A. Ennis, E. J. Saltzman and S. Krugman (1977). "Persistence of maternal antibody in infants beyond 12 months: mechanism of measles vaccine failure." *J Pediatr* 91(5): 715-718.

Alton G.G., J. L. M., Angus R.D. & Verger J.M., Ed. (1988). *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, France.

Arellano-Reynoso, B., N. Lapaque, S. Salcedo, G. Briones, A. E. Ciocchini, R. Ugalde, E. Moreno, I. Moriyon and J. P. Gorvel (2005). "Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival." *Nat Immunol* 6(6): 618-625.

Audic, S., M. Lescot, J. M. Claverie and H. C. Scholz (2009). "*Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen." *BMC Genomics* 10: 352.

Ausar, S. F., T. R. Foubert, M. H. Hudson, T. S. Vedvick and C. R. Middaugh (2006). "Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature." *J Biol Chem* 281(28): 19478-19488.

Bacher, A., M. Fischer, K. Kis, K. Kugelbrey, S. Mortl, J. Scheuring, S. Weinkauff, S. Eberhardt, K. Schmidt-Base, R. Huber, K. Ritsert, M. Cushman and R. Ladenstein (1996). "Biosynthesis of riboflavin: structure and mechanism of lumazine synthase." *Biochem Soc Trans* 24(1): 89-94.

Bachmann, M. F., H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (1995). "T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction?" *Eur J Immunol* 25(12): 3445-3451.

Bachmann, M. F., T. M. Kundig, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (1997). "Protection against immunopathological consequences of a viral infection by activated but not resting cytotoxic T cells: T cell memory without "memory T cells"?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2): 640-645.

Bachmann, M. F., T. M. Kundig, B. Odermatt, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (1994a). "Free recirculation of memory B cells versus antigen-dependent differentiation to antibody-forming cells." *J Immunol* 153(8): 3386-3397.

Bachmann, M. F., U. H. Rohrer, T. M. Kundig, K. Burki, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (1993). "The influence of antigen organization on B cell responsiveness." *Science* 262(5138): 1448-1451.

Bachmann, M. F., U. H. Rohrer, U. Steinhoff, K. Burki, S. Skuntz, H. Arnheiter, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (1994b). "T helper cell unresponsiveness: rapid induction in antigen-transgenic and reversion in non-transgenic mice." *Eur J Immunol* 24(12): 2966-2973.

Bachmann, M. F. and R. M. Zinkernagel (1996). "The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation." *Immunol Today* 17(12): 553-558.

Baldi, P. C., G. H. Giambartolomei, F. A. Goldbaum, L. F. Abdon, C. A. Velikovsky, R. Kittelberger and C. A. Fossati (1996). "Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with B. abortus S19 or experimentally infected with *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9." *Clin Diagn Lab Immunol* 3(4): 472-476.

Baldi, P. C., C. A. Velikovsky, B. C. Braden, G. H. Giambartolomei, C. A. Fossati and F. A. Goldbaum (2000). "Structural, functional and immunological studies on a polymeric bacterial protein." *Braz J Med Biol Res* 33(7): 741-747.

Baldi, P. C., M. M. Wanke, M. E. Loza, N. Monachesi and C. A. Fossati (1997). "Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp." *Vet Microbiol* 57(2-3): 273-281.

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* 392(6673): 245-252.

Bangham, C. R. (1986). "Passively acquired antibodies to respiratory syncytial virus impair the secondary cytotoxic T-cell response in the neonatal mouse." *Immunology* 59(1): 37-41.

Barrios, C., C. Georgopoulos, P. H. Lambert and G. Del Giudice (1994). "Heat shock proteins as carrier molecules: in vivo helper effect mediated by *Escherichia coli* GroEL and DnaK proteins requires cross-linking with antigen." *Clin Exp Immunol* 98(2): 229-233.

Baumert, T. F., S. Ito, D. T. Wong and T. J. Liang (1998). "Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells." *J Virol* 72(5): 3827-3836.

Bellido, D., P. O. Craig, M. V. Mozgovoij, D. D. Gonzalez, A. Wigdorovitz, F. A. Goldbaum and M. J. Dus Santos (2009). "*Brucella* spp. lumazine synthase as a bovine rotavirus antigen delivery system." *Vaccine* 27(1): 136-145.

Belliot, G., J. S. Noel, J. F. Li, Y. Seto, C. D. Humphrey, T. Ando, R. I. Glass and S. S. Monroe (2001). "Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of "Norwalk-like viruses". " *J Clin Microbiol* 39(12): 4288-4295.

Belliot, G. M., R. L. Fankhauser and S. S. Monroe (2001). "Characterization of "Norwalk-like viruses" and astroviruses by liquid hybridization assay." *J Virol Methods* 91(2): 119-130.

Benjamin, D. C., J. A. Berzofsky, I. J. East, F. R. Gurd, C. Hannum, S. J. Leach, E. Margoliash, J. G. Michael, A. Miller, E. M. Prager and et al. (1984). "The antigenic structure of proteins: a reappraisal." *Annu Rev Immunol* 2: 67-101.

Berguer, P. M. (2009). "Estudio de la respuesta inmunológica inducida por la Lumazina Sintasa de *Brucella abortus*." FIL, UBA.

Berguer, P. M., J. Mundinano, I. Piazzon and F. A. Goldbaum (2006). "A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4." *J Immunol* 176(4): 2366-2372.

Betenbaugh, M., M. Yu, K. Kuehl, J. White, D. Pennock, K. Spik and C. Schmaljohn (1995). "Nucleocapsid- and virus-like particles assemble in cells infected with recombinant baculoviruses or vaccinia viruses expressing the M and the S segments of Hantaan virus." *Virus Res* 38(2-3): 111-124.

Blasco, J. M. (1997). "A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats." *Prev Vet Med* 31(3-4): 275-283.

Bosseray, N. (1991). "*Brucella melitensis* Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice." *Biologicals* 19(4): 355-363.

- Braden, B. C., C. A. Velikovskiy, A. A. Cauerhff, I. Polikarpov and F. A. Goldbaum (2000). "Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from *Brucella abortus*." *J Mol Biol* 297(5): 1031-1036.
- Brautigam, S., E. Snezhkov and D. H. Bishop (1993). "Formation of poliovirus-like particles by recombinant baculoviruses expressing the individual VP0, VP3, and VP1 proteins by comparison to particles derived from the expressed poliovirus polyprotein." *Virology* 192(2): 512-524.
- Brown, C. S., J. W. Van Lent, J. M. Vlak and W. J. Spaan (1991). "Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins." *J Virol* 65(5): 2702-2706.
- Caldeira, J. C. and D. S. Peabody (2007). "Stability and assembly in vitro of bacteriophage PP7 virus-like particles." *J Nanobiotechnology* 5: 10.
- Cassataro, J. (2003). "Estudio comparativo de la inmunogenicidad de proteínas recombinantes y plásmidos codificantes para proteínas de *Brucella*." Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.
- Cassataro, J., K. A. Pasquevich, S. M. Estein, D. A. Laplagne, C. A. Velikovskiy, S. de la Barrera, R. Bowden, C. A. Fossati, G. H. Giambartolomei and F. A. Goldbaum (2007a). "A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination." *Vaccine* 25(22): 4437-4446.
- Cassataro, J., K. A. Pasquevich, S. M. Estein, D. A. Laplagne, A. Zwerdling, S. de la Barrera, R. Bowden, C. A. Fossati, G. H. Giambartolomei and F. A. Goldbaum (2007b). "A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination." *Vaccine* 25(32): 5958-5967.
- Castaneda-Roldan, E. I., F. Avelino-Flores, M. Dall'Agnol, E. Freer, L. Cedillo, J. Dornand and J. A. Giron (2004). "Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues." *Cell Microbiol* 6(5): 435-445.
- Celli, J. (2006). "Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*." *Res Microbiol* 157(2): 93-98.
- Celli, J., C. de Chastellier, D. M. Franchini, J. Pizarro-Cerda, E. Moreno and J. P. Gorvel (2003). "Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum." *J Exp Med* 198(4): 545-556.
- Corbel, M. J., Ed. (1990). *Brucella*, M. T. Parker and L. H. Collier (ed.).
- Corbel, M. J. (1997). "Brucellosis: an overview." *Emerg Infect Dis* 3(2): 213-221.
- Craig, P. O., P. M. Berguer, N. Ainciart, V. Zylberman, M. G. Thomas, L. J. Tosar, A. Bulloj, G. L. Boccaccio and F. A. Goldbaum (2005). "Multiple display of a protein domain on a bacterial polymeric scaffold." *Proteins*.
- Crasta, O. R., O. Folkerts, Z. Fei, S. P. Mane, C. Evans, S. Martino-Catt, B. Bricker, G. Yu, L. Du and B. W. Sobral (2008). "Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes." *PLoS One* 3(5): e2193.
- Crawford, S. E., M. Labbe, J. Cohen, M. H. Burroughs, Y. J. Zhou and M. K. Estes (1994). "Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells." *J Virol* 68(9): 5945-5952.
- Cribbs, D. H. (2010). "Abeta DNA vaccination for Alzheimer's disease: focus on disease prevention." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9(2): 207-216.

- Chackerian, B. (2010). "Virus-like particle based vaccines for Alzheimer disease." *Hum Vaccin* 6(11): 926-930.
- Chain, P. S., D. J. Comerci, M. E. Tolmasky, F. W. Larimer, S. A. Malfatti, L. M. Vergez, F. Agüero, M. L. Land, R. A. Ugalde and E. Garcia (2005). "Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*." *Infect Immun* 73(12): 8353-8361.
- Chang, D., C. Y. Fung, W. C. Ou, P. C. Chao, S. Y. Li, M. Wang, Y. L. Huang, T. Y. Tzeng and R. T. Tsai (1997). "Self-assembly of the JC virus major capsid protein, VP1, expressed in insect cells." *J Gen Virol* 78 (Pt 6): 1435-1439.
- Check, E. (2002). "Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug." *Nature* 415(6871): 462.
- Christensen, J., S. Alexandersen, B. Bloch, B. Aasted and A. Uttenthal (1994). "Production of mink enteritis parvovirus empty capsids by expression in a baculovirus vector system: a recombinant vaccine for mink enteritis parvovirus in mink." *J Gen Virol* 75 (Pt 1): 149-155.
- Da Silva, D. M., D. V. Pastrana, J. T. Schiller and W. M. Kast (2001). "Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particle vaccines." *Virology* 290(2): 350-360.
- Delamarre, L., M. Pack, H. Chang, I. Mellman and E. S. Trombetta (2005). "Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate." *Science* 307(5715): 1630-1634.
- Delchambre, M., D. Gheysen, D. Thines, C. Thiriart, E. Jacobs, E. Verdin, M. Horth, A. Burny and F. Bex (1989). "The GAG precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles." *EMBO J* 8(9): 2653-2660.
- Delpino, M. V., J. Cassataro, C. A. Fossati, F. A. Goldbaum and P. C. Baldi (2006). "Brucella outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein." *Microbes Infect* 8(5): 1203-1208.
- DelVecchio, V. G., V. Kapatral, P. Elzer, G. Patra and C. V. Mújer (2002). "The genome of *Brucella melitensis*." *Vet Microbiol* 90(1-4): 587-592.
- Dintzis, H. M., R. Z. Dintzis and B. Vogelstein (1976). "Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response." *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(10): 3671-3675.
- Dintzis, R. Z., B. Vogelstein and H. M. Dintzis (1982). "Specific cellular stimulation in the primary immune response: experimental test of a quantized model." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(3): 884-888.
- Domingo, G. J., S. Orru and R. N. Perham (2001). "Multiple display of peptides and proteins on a macromolecular scaffold derived from a multienzyme complex." *J Mol Biol* 305(2): 259-267.
- Estein, S. M., M. A. Fiorentino, F. A. Paolicchi, M. Clause, J. Manazza, J. Cassataro, G. H. Giambartolomei, L. M. Coria, V. Zylberman, C. A. Fossati, R. Kjekén and F. A. Goldbaum (2009). "The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams." *Vaccine* 27(48): 6704-6711.
- Feldmann, M. and A. Easten (1971). "The relationship between antigenic structure and the requirement for thymus-derived cells in the immune response." *J Exp Med* 134(1): 103-119.
- Feldmann, M., J. G. Howard and C. Desaymard (1975). "Role of antigen structure in the discrimination between tolerance and immunity by b cells." *Transplant Rev* 23: 78-97.
- Fernandez-Arias, A., C. Risco, S. Martínez, J. P. Albar and J. F. Rodríguez (1998). "Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles." *J Gen Virol* 79 (Pt 5): 1047-1054.

- Ficht, T. A. (2003). "Intracellular survival of Brucella: defining the link with persistence." *Vet Microbiol* 92(3): 213-223.
- Fischer, M. and A. Bacher (2005). "Biosynthesis of flavocoenzymes." *Nat Prod Rep* 22(3): 324-350.
- Fischer, M. and A. Bacher (2006). "Biosynthesis of Vitamin B2 in Plants." *Phys. Plant.* 126(3): 304-318.
- French, T. J., J. J. Marshall and P. Roy (1990). "Assembly of double-shelled, viruslike particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins." *J Virol* 64(12): 5695-5700.
- French, T. J. and P. Roy (1990). "Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV." *J Virol* 64(4): 1530-1536.
- Gage, D. J. (2004). "Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 280-300.
- Garcia, K. C. and E. J. Adams (2005). "How the T cell receptor sees antigen--a structural view." *Cell* 122(3): 333-336.
- Gerhardt, S., I. Haase, S. Steinbacher, J. T. Kaiser, M. Cushman, A. Bacher, R. Huber and M. Fischer (2002). "The structural basis of riboflavin binding to Schizosaccharomyces pombe 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase." *J Mol Biol* 318(5): 1317-1329.
- Germain, R. N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." *Cell* 76(2): 287-299.
- Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines and M. De Wilde (1989). "Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells." *Cell* 59(1): 103-112.
- Godfroid, J., A. Cloeckeaert, J. P. Liutard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravens, B. Garin-Bastuji and J. J. Letesson (2005). "From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis." *Vet Res* 36(3): 313-326.
- Goldbaum, F. A., J. Leoni, J. C. Wallach and C. A. Fossati (1993). "Characterization of an 18-kilodalton Brucella cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis." *J Clin Microbiol* 31(8): 2141-2145.
- Goldbaum, F. A., C. P. Rubbi, J. C. Wallach, S. E. Miguel, P. C. Baldi and C. A. Fossati (1992). "Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring antiprotein humoral immune responses." *J Clin Microbiol* 30(3): 604-607.
- Goldbaum, F. A., C. A. Velikovskiy, P. C. Baldi, S. Mortl, A. Bacher and C. A. Fossati (1999). "The 18-kDa cytoplasmic protein of Brucella species --an antigen useful for diagnosis--is a lumazine synthase." *J Med Microbiol* 48(9): 833-839.
- Gorvel, J. P. (2008). "Brucella: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll." *Microbes Infect* 10(9): 1010-1013.
- Gorvel, J. P. and E. Moreno (2002). "Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication." *Vet Microbiol* 90(1-4): 281-297.
- Haicheur, N., F. Benchetrit, M. Amessou, C. Leclerc, T. Falguieres, C. Fayolle, E. Bismuth, W. H. Fridman, L. Johannes and E. Tartour (2003). "The B subunit of Shiga toxin coupled to full-

size antigenic protein elicits humoral and cell-mediated immune responses associated with a Th1-dominant polarization." *Int Immunol* 15(10): 1161-1171.

Haicheur, N., E. Bismuth, S. Bosset, O. Adotevi, G. Warnier, V. Lacabanne, A. Regnault, C. Desaymard, S. Amigorena, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Goud, W. H. Fridman, L. Johannes and E. Tartour (2000). "The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens." *J Immunol* 165(6): 3301-3308.

Hale, A. D., S. E. Crawford, M. Ciarlet, J. Green, C. Gallimore, D. W. Brown, X. Jiang and M. K. Estes (1999). "Expression and self-assembly of Grimsby virus: antigenic distinction from Norwalk and Mexico viruses." *Clin Diagn Lab Immunol* 6(1): 142-145.

Halling, S. M., B. D. Peterson-Burch, B. J. Bricker, R. L. Zuerner, Z. Qing, L. L. Li, V. Kapur, D. P. Alt and S. C. Olsen (2005). "Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*." *J Bacteriol* 187(8): 2715-2726.

Hemmen, F., V. Weynants, T. Scarcez, J. J. Letesson and E. Saman (1995). "Cloning and sequence analysis of a newly identified *Brucella abortus* gene and serological evaluation of the 17-kilodalton antigen that it encodes." *Clin Diagn Lab Immunol* 2(3): 263-267.

Hoque, M., N. Shimizu, K. Ishizu, H. Yajima, F. Arisaka, K. Suzuki, H. Watanabe and H. Handa (1999). "Chimeric virus-like particle formation of adeno-associated virus." *Biochem Biophys Res Commun* 266(2): 371-376.

Jahans, K. L., G. Foster and E. S. Broughton (1997). "The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals." *Vet Microbiol* 57(4): 373-382.

Jegerlehner, A., T. Storni, G. Lipowsky, M. Schmid, P. Pumpens and M. F. Bachmann (2002). "Regulation of IgG antibody responses by epitope density and CD21-mediated costimulation." *Eur J Immunol* 32(11): 3305-3314.

Jimenez de Bagues, M. P., C. M. Marin, M. Barberan and J. M. Blasco (1989). "Responses of ewes to *B. melitensis* Rev1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy." *Ann Rech Vet* 20(2): 205-213.

Johnson, J. E. and W. Chiu (2000). "Structures of virus and virus-like particles." *Curr Opin Struct Biol* 10(2): 229-235.

Justewicz, D. M., P. C. Doherty and R. G. Webster (1995). "The B-cell response in lymphoid tissue of mice immunized with various antigenic forms of the influenza virus hemagglutinin." *J Virol* 69(9): 5414-5421.

Kammann, M., J. Laufs, J. Schell and B. Gronenborn (1989). "Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR)." *Nucleic Acids Res* 17(13): 5404.

Kibenge, F. S., B. Qian, E. Nagy, J. R. Cleghorn and D. Wadowska (1999). "Formation of virus-like particles when the polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease virus is expressed in insect cells." *Can J Vet Res* 63(1): 49-55.

Kirnbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy and J. T. Schiller (1992). "Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(24): 12180-12184.

Kirnbauer, R., J. Taub, H. Greenstone, R. Roden, M. Durst, L. Gissmann, D. R. Lowy and J. T. Schiller (1993). "Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles." *J Virol* 67(12): 6929-6936.

- Klinke, S. (2007). "Estudio cristalográfico y catalítico de la enzima Lumazina sintetasa en *Brucella* y otros miembros del orden Rhizobiales." FIL, UBA.
- Klinke, S., V. Zylberman, H. R. Bonomi, I. Haase, B. G. Guimaraes, B. C. Braden, A. Bacher, M. Fischer and F. A. Goldbaum (2007). "Structural and kinetic properties of lumazine synthase isoenzymes in the order Rhizobiales." *J Mol Biol* 373(3): 664-680.
- Klinke, S., V. Zylberman, D. R. Vega, B. G. Guimaraes, B. C. Braden and F. A. Goldbaum (2005). "Crystallographic studies on decameric *Brucella* spp. Lumazine synthase: a novel quaternary arrangement evolved for a new function?" *J Mol Biol* 353(1): 124-137.
- Ko, J. and G. A. Splitter (2003). "Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans." *Clin Microbiol Rev* 16(1): 65-78.
- Kosukegawa, A., F. Arisaka, M. Takayama, H. Yajima, A. Kaidow and H. Handa (1996). "Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced by the expression of SV40 capsid proteins in insect cells." *Biochim Biophys Acta* 1290(1): 37-45.
- Kunke, D., J. Broucek, L. Kutinova, S. Nemeckova, V. Ludvikova, I. Strnad, J. Kramosil, J. Nemcova, J. Schramlova, V. Simonova and et al. (1993). "Vaccinia virus recombinants co-expressing hepatitis B virus surface and core antigens." *Virology* 195(1): 132-139.
- Ladenstein, R., M. Schneider, R. Huber, H. D. Bartunik, K. Wilson, K. Schott and A. Bacher (1988). "Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Crystal structure analysis of the icosahedral beta 60 capsid at 3.3 Å resolution." *J Mol Biol* 203(4): 1045-1070.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Laplagne, D. A. (2003). "Desarrollo de un nuevo carrier antigénico por ingeniería de proteínas para su uso en vacunas acelulares." FIL, uba.
- Laplagne, D. A., V. Zylberman, N. Ainciart, M. W. Steward, E. Sciutto, C. A. Fossati and F. A. Goldbaum (2004). "Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides." *Proteins* 57(4): 820-828.
- Latham, T. and J. M. Galarza (2001). "Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins." *J Virol* 75(13): 6154-6165.
- Laurent, S., J. F. Vautherot, M. F. Madelaine, G. Le Gall and D. Rasschaert (1994). "Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection." *J Virol* 68(10): 6794-6798.
- Leclerc, C. (2003). "New approaches in vaccine development." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26(5-6): 329-341.
- Lee, R. S., E. Tartour, P. van der Bruggen, V. Vantomme, I. Joyeux, B. Goud, W. H. Fridman and L. Johannes (1998). "Major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble tumor antigen fused to the B-fragment of Shiga toxin." *Eur J Immunol* 28(9): 2726-2737.
- Li, T. C., Y. Yamakawa, K. Suzuki, M. Tatsumi, M. A. Razak, T. Uchida, N. Takeda and T. Miyamura (1997). "Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus." *J Virol* 71(10): 7207-7213.
- Lopez de Turiso, J. A., E. Cortes, C. Martinez, R. Ruiz de Ybanez, I. Simarro, C. Vela and I. Casal (1992). "Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs." *J Virol* 66(5): 2748-2753.

- Lovitch, S. B. and E. R. Unanue (2005). "Conformational isomers of a peptide-class II major histocompatibility complex." *Immunol Rev* 207: 293-313.
- Martinez, C., K. Dalsgaard, J. A. Lopez de Turiso, E. Cortes, C. Vela and J. I. Casal (1992). "Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity." *Vaccine* 10(10): 684-690.
- Massey, V. (2000). "The chemical and biological versatility of riboflavin." *Biochem Soc Trans* 28(4): 283-296.
- McAleer, W. J., E. B. Buynak, R. Z. Maigetter, D. E. Wampler, W. J. Miller and M. R. Hilleman (1984). "Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast." *Nature* 307(5947): 178-180.
- Meining, W., S. Mortl, M. Fischer, M. Cushman, A. Bacher and R. Ladenstein (2000). "The atomic structure of pentameric lumazine synthase from *Saccharomyces cerevisiae* at 1.85 Å resolution reveals the binding mode of a phosphonate intermediate analogue." *J Mol Biol* 299(1): 181-197.
- Miyanochara, A., T. Imamura, M. Araki, K. Sugawara, N. Ohtomo and K. Matsubara (1986). "Expression of hepatitis B virus core antigen gene in *Saccharomyces cerevisiae*: synthesis of two polypeptides translated from different initiation codons." *J Virol* 59(1): 176-180.
- Moreno, E., A. Cloeckert and I. Moriyon (2002). "Brucella evolution and taxonomy." *Vet Microbiol* 90(1-4): 209-227.
- Morgunova, E., W. Meining, B. Illarionov, I. Haase, G. Jin, A. Bacher, M. Cushman, M. Fischer and R. Ladenstein (2005). "Crystal structure of lumazine synthase from *Mycobacterium tuberculosis* as a target for rational drug design: binding mode of a new class of purinetrione inhibitors." *Biochemistry* 44(8): 2746-2758.
- Morgunova, E., S. Saller, I. Haase, M. Cushman, A. Bacher, M. Fischer and R. Ladenstein (2007). "Lumazine synthase from *Candida albicans* as an anti-fungal target enzyme: structural and biochemical basis for drug design." *J Biol Chem* 282(23): 17231-17241.
- Murata, K., M. Lechmann, M. Qiao, T. Gunji, H. J. Alter and T. J. Liang (2003). "Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6753-6758.
- Nagy, E., P. Huber, P. J. Krell and J. B. Derbyshire (1991). "Synthesis of Newcastle disease virus (NDV)-like envelopes in insect cells infected with a recombinant baculovirus expressing the haemagglutinin-neuraminidase of NDV." *J Gen Virol* 72 (Pt 3): 753-756.
- Nawagitgul, P., I. Morozov, S. R. Bolin, P. A. Harms, S. D. Sorden and P. S. Paul (2000). "Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein." *J Gen Virol* 81(Pt 9): 2281-2287.
- Nieba, L. and M. F. Bachmann (2000). "A new generation of vaccines." *Mod. Asp. Immunobiol.* 1: 36-39.
- Noad, R. and P. Roy (2003). "Virus-like particles as immunogens." *Trends Microbiol* 11(9): 438-444.
- Noteborn, M. H., C. A. Verschueren, G. Koch and A. J. Van der Eb (1998). "Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope." *J Gen Virol* 79 (Pt 12): 3073-3077.
- Nygaard, T. K., M. Liu, M. J. McClure and B. Lei (2006). "Identification and characterization of the heme-binding proteins SeShp and SeHtsA of *Streptococcus equi* subspecies equi." *BMC Microbiol* 6: 82.

Paliard, X., Y. Liu, R. Wagner, H. Wolf, J. Baenziger and C. M. Walker (2000). "Priming of strong, broad, and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8+ cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques." *AIDS Res Hum Retroviruses* 16(3): 273-282.

Pappas, G., N. Akritidis, M. Bosilkovski and E. Tsianos (2005). "Brucellosis." *N Engl J Med* 352(22): 2325-2336.

Parker, T. and L. H. Collier., Eds. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology. Virology and Immunity*, 8th edn. Vol. 3, Edward Arnold, London, pp. 529-542.

Paulsen, I. T., R. Seshadri, K. E. Nelson, J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, T. D. Read, R. J. Dodson, L. Umayam, L. M. Brinkac, M. J. Beanan, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, W. C. Nelson, B. Ayodeji, M. Kraul, J. Shetty, J. Malek, S. E. Van Aken, S. Riedmuller, H. Tettelin, S. R. Gill, O. White, S. L. Salzberg, D. L. Hoover, L. E. Lindler, S. M. Halling, S. M. Boyle and C. M. Fraser (2002). "The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20): 13148-13153.

Perkins, F. T., R. Yetts and W. Gaisford (1959). "A comparison of the responses of 100 infants to primary poliomyelitis immunization with two and with three doses of vaccine." *Br Med J* 1(5129): 1083-1086.

Perret, X., C. Staehelin and W. J. Broughton (2000). "Molecular basis of symbiotic promiscuity." *Microbiol Mol Biol Rev* 64(1): 180-201.

Persson, K., G. Schneider, D. B. Jordan, P. V. Viitanen and T. Sandalova (1999). "Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly." *Protein Sci* 8(11): 2355-2365.

Petrushina, I., A. Ghochikyan, M. Mktrichyan, G. Mamikonyan, N. Movsesyan, H. Davtyan, A. Patel, E. Head, D. H. Cribbs and M. G. Agadjanyan (2007). "Alzheimer's disease peptide epitope vaccine reduces insoluble but not soluble/oligomeric A β species in amyloid precursor protein transgenic mice." *J Neurosci* 27(46): 12721-12731.

Pina, D. G., B. Stechmann, V. L. Shnyrov, L. Cabanie, N. Haicheur, E. Tartour and L. Johannes (2008). "Correlation between Shiga toxin B-subunit stability and antigen crosspresentation: a mutational analysis." *FEBS Lett* 582(2): 185-189.

Pletneva, M. A., S. V. Sosnovtsev, S. A. Sosnovtseva and K. Y. Green (1998). "Characterization of a recombinant human calicivirus capsid protein expressed in mammalian cells." *Virus Res* 55(2): 129-141.

Porte, F., J. P. Liautard and S. Kohler (1999). "Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages." *Infect Immun* 67(8): 4041-4047.

Porte, F., A. Naroeni, S. Ouahrani-Bettache and J. P. Liautard (2003). "Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages." *Infect Immun* 71(3): 1481-1490.

Prasad, B. V., M. E. Hardy, X. Jiang and M. K. Estes (1996). "Structure of Norwalk virus." *Arch Virol Suppl* 12: 237-242.

Pul, R., R. Dodel and M. Stangel (2011). "Antibody-based therapy in Alzheimer's disease." *Expert Opin Biol Ther* 11(3): 343-357.

- Qu, B. X., D. Lambracht-Washington, M. Fu, T. N. Eagar, O. Stuve and R. N. Rosenberg (2010). "Analysis of three plasmid systems for use in DNA A beta 42 immunization as therapy for Alzheimer's disease." *Vaccine* 28(32): 5280-5287.
- Ritsert, K., R. Huber, D. Turk, R. Ladenstein, K. Schmidt-Base and A. Bacher (1995). "Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*: crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 Å resolution." *J Mol Biol* 253(1): 151-167.
- Roop, R. M., 2nd, B. H. Bellaire, M. W. Valderas and J. A. Cardelli (2004). "Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche." *Mol Microbiol* 52(3): 621-630.
- Roop, R. M., 2nd, G. T. Robertson, G. P. Ferguson, L. E. Milford, M. E. Winkler and G. C. Walker (2002). "Seeking a niche: putative contributions of the *hfq* and *bacA* gene products to the successful adaptation of the *brucellae* to their intracellular home." *Vet Microbiol* 90(1-4): 349-363.
- Rosas, G., G. Fragoso, N. Ainciart, F. Esquivel-Guadarrama, A. Santana, R. J. Bobes, O. Ramirez-Pliego, A. Toledo, C. Cruz-Revilla, G. Meneses, P. Berguer, F. A. Goldbaum and E. Scitutto (2006). "*Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity." *Microbes Infect* 8(5): 1277-1286.
- Ruedl, C., S. K., J. A., S. T., V. Manolova and B. M. (2005a). "Virus-Like Particles as Carrier for T-Cell Epitopes: Limited Inhibition of T-Cell Priming by Carrier-Specific Antibodies." *Journal of Virology* 79(2): 717-724.
- Ruedl, C., K. Schwarz, A. Jegerlehner, T. Storni, V. Manolova and M. F. Bachmann (2005b). "Virus-like particles as carriers for T-cell epitopes: limited inhibition of T-cell priming by carrier-specific antibodies." *J Virol* 79(2): 717-724.
- Salleras, L. (2002a). "Tecnologías de producción de vacunas (II). Vacunas inactivadas." *Vacunas* 3, 2: 78-84.
- Salleras, L. (2002b). "Tecnologías de producción de vacunas I: vacunas vivas atenuadas" *Vacunas* 3, 1: 29-33.
- Scitutto, E., A. Toledo, C. Cruz, G. Rosas, G. Meneses, D. Laplagne, N. Ainciart, J. Cervantes, G. Fragoso and F. A. Goldbaum (2005). "*Brucella* spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system." *Vaccine* 23(21): 2784-2790.
- Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandeventer, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games and P. Seubert (1999). "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse." *Nature* 400(6740): 173-177.
- Schirmbeck, R., W. Bohm and J. Reimann (1996). "Virus-like particles induce MHC class I-restricted T-cell responses. Lessons learned from the hepatitis B small surface antigen." *Intervirology* 39(1-2): 111-119.
- Schodel, F., D. Peterson, J. Hughes and D. R. Milich (1993). "A virulent *Salmonella* expressing hybrid hepatitis B virus core/pre-S genes for oral vaccination." *Vaccine* 11(2): 143-148.
- Schultze, M. and A. Kondorosi (1998). "Regulation of symbiotic root nodule development." *Annu Rev Genet* 32: 33-57.
- Sela, M. and I. Pecht (1996). "The nature of the antigen." *Adv Protein Chem* 49: 289-328.
- Songjiang, Z. and W. Lixiang (2009). "Amyloid-beta associated with chitosan nano-carrier has favorable immunogenicity and permeates the BBB." *AAPS PharmSciTech* 10(3): 900-905.

- Spaink, H. P. (2002). "Plant-microbe interactions: a receptor in symbiotic dialogue." *Nature* 417(6892): 910-911.
- Starr, T., T. W. Ng, T. D. Wehrly, L. A. Knodler and J. Celli (2008). "Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment." *Traffic* 9(5): 678-694.
- Storni, T., C. Ruedl, W. A. Renner and M. F. Bachmann (2003). "Innate immunity together with duration of antigen persistence regulate effector T cell induction." *J Immunol* 171(2): 795-801.
- Thyagarajan, R., N. Arunkumar and W. Song (2003). "Polyvalent antigens stabilize B cell antigen receptor surface signaling microdomains." *J Immunol* 170(12): 6099-6106.
- Town, T. (2009). "Alternative Abeta immunotherapy approaches for Alzheimer's disease." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8(2): 114-127.
- Ugalde, R. A. (1999). "Intracellular lifestyle of Brucella spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts." *Microbes Infect* 1(14): 1211-1219.
- Velikovsky, C. A., J. Cassataro, G. H. Giambartolomei, F. A. Goldbaum, S. Estein, R. A. Bowden, L. Bruno, C. A. Fossati and M. Spitz (2002). "A DNA vaccine encoding lumazine synthase from Brucella abortus induces protective immunity in BALB/c mice." *Infect Immun* 70(5): 2507-2511.
- Velikovsky, C. A., F. A. Goldbaum, J. Cassataro, S. Estein, R. A. Bowden, L. Bruno, C. A. Fossati and G. H. Giambartolomei (2003). "Brucella lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with Brucella abortus 544 independently of the adjuvant formulation used." *Infect Immun* 71(10): 5750-5755.
- Vingert, B., O. Adotevi, D. Patin, S. Jung, P. Shrikant, L. Freyburger, C. Eppolito, A. Sapozhnikov, M. Amessou, F. Quintin-Colonna, W. H. Fridman, L. Johannes and E. Tartour (2006). "The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity." *Eur J Immunol* 36(5): 1124-1135.
- Vogel, F. R. (2000). "Improving vaccine performance with adjuvants." *Clin Infect Dis* 30 Suppl 3: S266-270.
- Watarai, M., S. Makino, Y. Fujii, K. Okamoto and T. Shirahata (2002). "Modulation of Brucella-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication." *Cell Microbiol* 4(6): 341-355.
- Woodhouse, A., T. C. Dickson and J. C. Vickers (2007). "Vaccination strategies for Alzheimer's disease: A new hope?" *Drugs Aging* 24(2): 107-119.
- Yamshchikov, G. V., G. D. Ritter, M. Vey and R. W. Compans (1995). "Assembly of SIV virus-like particles containing envelope proteins using a baculovirus expression system." *Virology* 214(1): 50-58.
- Zhang, X., W. Meining, M. Fischer, A. Bacher and R. Ladenstein (2001). "X-ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile Aquifex aeolicus at 1.6 Å resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons." *J Mol Biol* 306(5): 1099-1114.
- Zhou, J., X. Y. Sun, D. J. Stenzel and I. H. Frazer (1991). "Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles." *Virology* 185(1): 251-257.
- Zinkernagel, R. M., S. Ehl, P. Aichele, S. Oehen, T. Kundig and H. Hengartner (1997). "Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity." *Immunol Rev* 156: 199-209.

Zylberman, V. (2006). "Estudios estructurales, funcionales y evolutivos de una proteína de *B. abortus* relacionada con la vía biosintética de la riboflavina." FIL, UBA.

Zylberman, V., P. O. Craig, S. Klinke, B. C. Braden, A. Cauerhff and F. A. Goldbaum (2004). "High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* sp. lumazine synthase." *J Biol Chem* 279(9): 8093-8101.

Zylberman, V., S. Klinke, I. Haase, A. Bacher, M. Fischer and F. A. Goldbaum (2006). "Evolution of vitamin b2 biosynthesis: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthases of *Brucella*." *J Bacteriol* 188(17): 6135-6142.

Firmas

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio Inmunología y Microbiología Molecular, en la Fundación Instituto Leloir, bajo la dirección del Dr. Fernando A. Goldbaum.

La misma fue finalizada en Agosto de 2011,

Natalia Ainciart
Becaria

Dr. Fernando A. Goldbaum
Director