



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA BENEMÉRITA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

## **TESIS**

Desarrollo de un sistema de expresión heterólogo para generación de  
un antígeno de la proteína TbpB de *Avibacterium paragallinarum*

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLÓGICAS) CON OPCIÓN DE EN BIOQUÍMICA Y  
GENÉTICA MICROBIANA

PRESENTA

**Q.F.B. ALFREDO ESTRADA RAMÍREZ**

DIRECTOR:

Dr. Candelario Vázquez Cruz.

COASESOR:

Dr. Erasmo Negrete Abascal

Puebla 2014

# ÍNDICE

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. RESUMEN.....</b>                                                                            | <b>05</b> |
| <b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>                                                                       | <b>06</b> |
| 2.1 Función de la proteína Fur en el control de la expresión de genes de captación de hierro..... | 08        |
| 2.2 Caja Fur.....                                                                                 | 08        |
| 2.3 Regulón Fur.....                                                                              | 09        |
| 2.4 TbpA y TbpB.....                                                                              | 09        |
| 2.5 Sistema exbB-exbD-TonB.....                                                                   | 11        |
| 2.6 Coriza infecciosa.....                                                                        | 12        |
| 2.7 <i>Avibacterium paragallinarum</i> .....                                                      | 13        |
| 2.8 Composición antigénica de <i>Av. paragallinarum</i> .....                                     | 14        |
| 2.9 Patogénesis.....                                                                              | 15        |
| 2.10 Síntomas de la enfermedad.....                                                               | 15        |
| 2.11 Tratamiento y vacunas.....                                                                   | 16        |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>                                                                      | <b>17</b> |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>                                                                          | <b>18</b> |
| <b>5. ESQUEMA DE TRABAJO.....</b>                                                                 | <b>19</b> |
| <b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>                                                                 | <b>20</b> |
| 6.1 Material biológico.....                                                                       | 20        |
| 6.2 Medios de cultivo.....                                                                        | 20        |
| 6.3 Cultivo de <i>Av. paragallinarum</i> .....                                                    | 20        |
| 6.4 Extracción de DNA genómico de <i>Av. paragallinarum</i> .....                                 | 20        |
| 6.5 Amplificación de un fragmento del gen <i>tbpB</i> mediante PCR.....                           | 21        |
| 6.6 Electroforesis en gel de agarosa.....                                                         | 21        |
| 6.7 Ligación al vector pBluscriptKs(-).....                                                       | 22        |
| 6.8 Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5α competentes.....                               | 22        |
| 6.9 Extracción de DNA plasmídico.....                                                             | 22        |
| 6.10 Verificación de presencia y orientación del inserto.....                                     | 23        |
| 6.11 Inducción del gen <i>TbpB</i> con IPTG.....                                                  | 23        |
| 6.12 Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE).....                                          | 24        |
| 6.13 Inducción de la proteína con 2,2-Dipiridil.....                                              | 24        |
| 6.14 Western blot.....                                                                            | 24        |
| <b>7. RESULTADOS.....</b>                                                                         | <b>25</b> |

|                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 7.1 Amplificación del gen TbpB mediante PCR.....                                                        | 25        |
| 7.2 Ligación de los productos amplificados al vector pBluescriptKs (-).....                             | 26        |
| 7.3 Verificación de la orientación del inserto de TbpB.....                                             | 27        |
| 7.4 Inducción con IPTG.....                                                                             | 28        |
| 7.5 Respuesta de las diferentes cepas E. coli DH5a pBluescript- tbpB a la adición de 2,2 dipiridyl..... | 29        |
| 7.6 Western blot.....                                                                                   | 30        |
| <b>8. DISCUSIÓN.....</b>                                                                                | <b>32</b> |
| <b>9. CONCLUSIONES.....</b>                                                                             | <b>34</b> |
| <b>10. ANEXOS.....</b>                                                                                  | <b>35</b> |
| <b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                              | <b>41</b> |

## Abreviaturas

|             |                                         |
|-------------|-----------------------------------------|
| BHI         | Caldo cerebro corazón                   |
| BSA         | Albúmina Sérica Bovina                  |
| CI          | Coriza infecciosa                       |
| D.O.        | Densidad óptica                         |
| HA          | Hemaglutinina                           |
| <i>Avpg</i> | <i>Avibacterium paragallinarum</i>      |
| kDa         | Kilo daltones                           |
| LB          | Luria Bertani medio                     |
| LB + AMP    | Luria Bertani medio con ampicilina      |
| NAD         | Nicotinamida Adenin Dinucleotido        |
| SDS         | Dodecil sulfato de sodio                |
| PAGE        | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PBS         | Buffer salino de fosfato                |
| SN          | Sobrenadante                            |

## 1. Resumen

La coriza infecciosa es una enfermedad de las vías respiratorias de los pollos que se caracteriza por flujo nasal y tumefacción de la cara. Esta enfermedad es provocada por *Avibacterium paragallinarum* y es causa de grandes pérdidas económicas. Para controlar la coriza infecciosa se han desarrollado diversas bacterinas, aunque no han logrado tener todo el éxito deseado. Además de las bacterinas, algunas vacunas a base de proteínas extracelulares han mostrado tener altas propiedades antigénicas. Entre estas, TbpB una proteína de unión a hierro, ha resultado ser muy inmunogénica.

En este trabajo se propuso clonar y expresar diferentes construcciones que contienen un fragmento o al gen *tbpB* completo más fragmentos adyacentes al gen *tbpB* de *Avpg* en un sistema heterólogo y de esa manera sentar las bases para el desarrollo de una vacuna que pudiera contribuir a solucionar los problemas que la coriza infecciosa representa para la industria avícola.

A partir de la cepa 0083 de *Avpg* se extrajo ADN genómico y se amplificó el gen *tbpB*. Los diferentes productos de amplificación de este gen, se ligaron al vector pBluescript KS(-) y se usaron para transformar a *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . A las células transformantes se les indujo la síntesis del péptido clonado utilizando IPTG y 2,2 dipiridil. Se hizo una extracción de proteínas totales y se separaron en geles desnaturalizantes del tipo SDS-PAGE para comparar el patrón de bandas de proteínas de las clonas transformantes con el control negativo (DH5 $\alpha$  KS(-) sin insertos).

En el patrón de proteínas se observó la aparición de una banda de aproximadamente 60KDa que corresponde al tamaño de TbpB. Para corroborar que estaba ocurriendo la expresión de la proteína TbpB recombinante se probaron inmunodetecciones tipo western blot con un suero policlonal de conejo anti TbpB de *Avpg*. En estos ensayos se detectó una banda de alrededor de 60 *kDa* lo que confirmó la expresión de una proteína semejante a TbpB. Con la proteína recombinante se podría iniciar un ensayo experimental de evaluación de inmunogenicidad de TbpB en aves de bioterio.

## 2. Introducción.

El hierro es el elemento más abundante de los metales de transición en los eucariotas y representa un factor esencial para la supervivencia de los microorganismos. En condiciones fisiológicas, con presencia de oxígeno y a pH neutro, el hierro disponible (libre en solución) es muy escaso e inferior a las concentraciones necesarias de 0.05-0.5  $\mu\text{M}$  para el crecimiento y la multiplicación de las bacterias. La baja concentración de hierro disponible para los microorganismos activa la producción de sistemas eficientes de captación de hierro. Los patógenos bacterianos usan distintos sistemas para adquirir este elemento esencial *in vivo*. Esto incluye la producción de agentes quelantes llamados sideróforos, así como componentes proteicos que les permitan remover el  $\text{Fe}^{+3}$  de complejos glicoproteicos para cedérselo a otras proteínas bacterianas (Gómez, 2003). *Haemophilus influenzae*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus suis* son algunas de las bacterias que son capaces de adquirir hierro a partir de transferrinas a través de proteínas de unión a transferrina (Cornelissen, 2003).

Los sistemas de adquisición de hierro están ampliamente distribuidos en procariotas; se basan en la producción de sideróforos, que son sistemas quelantes de hierro de alta afinidad. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular, que se sintetizan en condiciones deficitarias de hierro y son capaces de unir el  $\text{Fe}^{+3}$  desplazándolo de complejos insolubles o de compuestos del hospedador que tienen alta afinidad y especificidad por el hierro. Los sideróforos cargados con hierro son unidos específicamente por un receptor en la membrana externa de la célula y son transportados al interior de la bacteria, donde el hierro es liberado, ya sea por hidrólisis de los sideróforos o por reducción del  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ . En condiciones anaerobias, el ión  $\text{Fe}^{+2}$  es soluble y puede difundir a través de porinas localizadas en la membrana externa, siendo internalizado posteriormente por un sistema FeoABC dependiente de energía (Del Río y Cols, 2004).

Para captar el hierro en el hospedero, las bacterias patógenas precisan de la intervención de proteínas receptoras expresadas en su membrana externa y que presentan alta afinidad por moléculas del hospedero que contienen hierro, como las glicoproteínas transferrinas. La bacteria produce proteínas llamadas TbpA y TbpB, que se unen a varias transferrinas del hospedero, para retirarles el hierro y facilitar posteriormente la translocación de éste al espacio periplásmico. Desde aquí, el hierro será ligado por proteínas de unión periplasmáticas (proteína FbpA), para cederlo a los transportadores con dominios de unión de ATP que se localizan en la membrana citoplasmática (proteínas FbpBC), los cuales finalizan el proceso de internalización del hierro al citoplasma de la célula (Del Río y Cols, 2004).

Algunas observaciones experimentales han hecho la correlación de la aparición de infecciones con la disponibilidad de hierro en el organismo, sugiriendo que las dietas deficientes en hierro incrementan la resistencia a una infección, mientras que una hiperferremia incrementa la susceptibilidad del hospedero a la infección (Litwin y Calderwood, 1993).

En las bacterias existe un control de la expresión de los genes que codifican para los sistemas de captación de hierro, como el ejercido por la proteína Fur (por sus siglas en inglés, *ferric uptake regulator*), esta proteína se encarga de regular la transcripción de genes involucrados en el transporte y adquisición de este ion metálico (Hantke, 2001). Cuando la concentración de hierro es suficientemente alta para la bacteria, la proteína Fur unida a hierro funciona como represora del sistema de captación de hierro, mediante su unión al DNA e impedimento de acceso de la RNA polimerasa a los promotores de los genes involucrados en el proceso. Sin embargo, cuando la concentración de hierro es escasa, la proteína Fur libre de hierro pierde su capacidad de unirse al DNA, entonces la RNA polimerasa reconoce apropiadamente al promotor de los genes y se produce la transcripción de los genes que estaban reprimidos. Los genes putativos relacionados con la captación de hierro se han encontrado relacionados en diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae* tales como *P. multocida*, *A. suis*, *H. ducreyi*, *Ag. actinomycetemcomitans* y *A. pleuropneumoniae* (Hantke, 2001).

Los miembros de las familias *Pasteurellaceae* y *Neisseriaceae* obtienen hierro a partir de las transferrinas y contrariamente a lo que sucede con la captación de hierro mediada por sideróforos, el hierro se capta sin la internalización de la transferrina. Esta glucoproteína tiene un peso aproximado de 80 kDa y transporta hierro a los tejidos del hospedero; cada uno de los extremos amino y carboxilo se divide en dos dominios que flanquean un sitio de unión para un átomo de hierro y un anión bicarbonato, por tanto une dos iones hierro de forma reversible. El receptor de transferrina en bacterias está formado por dos proteínas localizadas en la membrana externa, denominadas Tbps (*transferrin binding proteins*) y que se identificaron por primera vez en *N. meningitidis*. La más grande de ellas posee un peso molecular aproximado de 100 kDa y se denomina TbpA (antes denominada Tbp1 o TfbB), mientras que la menor tiene un peso molecular de 60 a 85 kDa y se denomina TbpB (antes denominada Tbp2 o TfbA). La proteína TbpB, a diferencia de la TbpA, discrimina entre la forma cargada y no cargada de hierro de la transferrina, presentando una elevada especificidad por la holotransferrina (Hantke, 2001). En *A. pleuropneumoniae* se ha demostrado que para que tenga lugar la internalización del hierro desde la membrana externa al citoplasma se necesita que el sistema de transducción de energía TonB-ExbB-ExbD proporcione ATP. Con este fin, el ATP generado en la membrana citoplasmática, es transferido a los receptores TonB dependientes en la membrana externa a través del gradiente de protones proporcionado por las proteínas ExbB y ExbD. La caja TonB asimismo es necesaria para la adquisición de energía del receptor (Hantke, 2001).

## 2.1 Función de la proteína Fur en el control de la expresión de genes de captación de hierro.

La proteína Fur está compuesta por dos dominios, el amino-terminal y el carboxi-terminal. El primero posee un motivo de unión a ADN, mientras que el segundo posee dos motivos de unión a metales, uno para  $\text{Fe}^{+2}$  y otro para  $\text{Zn}^{+2}$ , los cuales son importantes para la dimerización (Hantke, 2001).

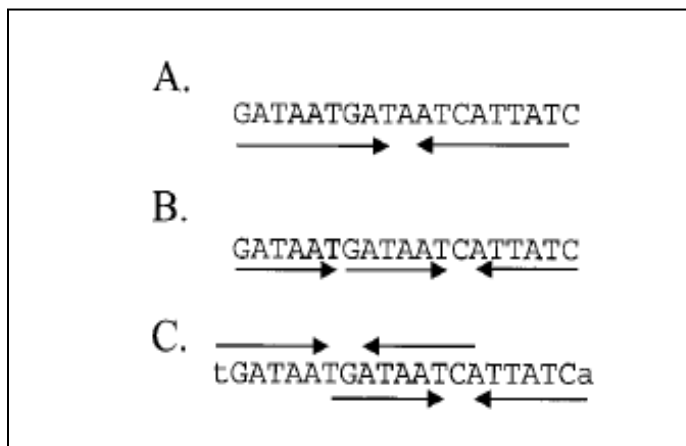
La proteína Fur se encarga de regular la expresión de los genes implicados en la captación y transporte de hierro. Este proceso lo realiza mediante la unión a una secuencia de ADN conocida como caja Fur. El reconocimiento de la caja Fur solo ocurre cuando en el medio hay presencia de  $\text{Fe (II)}$ , ya que la proteína Fur forma un complejo con este metal (Hantke, 2001), y por tanto, cuando la concentración de  $\text{Fe (II)}$  es baja, se produce la transcripción de los genes que están reprimidos. Sin embargo, esta proteína también se ha visto asociada a la proteína que funciona como represora catabólica, lo que nos da indicios de que su expresión está ligada al metabolismo general de la célula (Hantke, 2001).

Además, se ha encontrado que *fur* está regulado por el estrés oxidativo y que su función depende de la unión a metales, como  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ , los cuales son importantes para la dimerización y activación (Hantke, 2001). Lo que indica que la regulación de la expresión del gen *fur* es muy compleja y se necesita obtener más información acerca de ella.

## 2.2 Caja Fur.

Inicialmente la secuencia consenso propuesta para la caja Fur fue GATAATGATAATCATTATC (de Lorenzo y cols. 1988). Con la mejora de metodologías empleadas en el laboratorio, se demostró mediante la técnica hidroxil radical footprinting un patrón de interacción entre el ADN y Fur, en el que Fur es una repetición de aminoácidos de mínimo tres copias del hexámero NATA/TAT en cualquier orientación (Fig.1) (Escolar y cols. 1999). Sin embargo, estudios más recientes basados en la comparación de distintas regiones de ADN a las que se une la proteína Fur de *Bacillus subtilis*, han mostrado que la caja fur está formada por dos secuencias superpuestas de heptámeros repetidos e invertidos (Baichoo y Helmann, 2002).





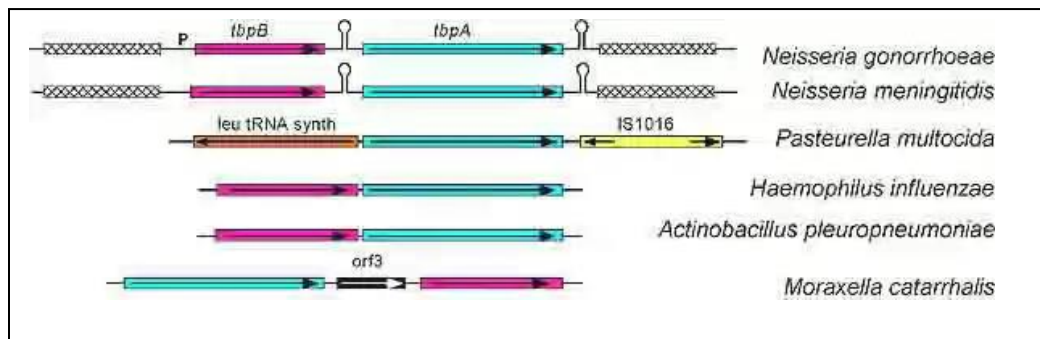
**Fig. 1. comparación de los diferentes modelos de caja Fur.** (A) La caja Fur definida como una secuencia repetida de 19 pb invertida. (B) Una forma alternativa propuesta en la que Fur se une a una secuencia de tres o más copias del hexámero GATAAT. (C) Modelo en donde la caja Fur resulta de un solapamiento de repetidos heptaméricos invertidos que juntos definen una secuencia de 21 pb (Baichoo y Helmann, 2002).

### 2.3 Regulón Fur.

El regulón Fur está constituido por los genes que son regulados por la proteína Fur. La mayoría de estos genes están relacionados con la captación de hierro, los de biosíntesis y transporte de sideróforos, proteínas de membrana externa receptoras de moléculas transportadoras de hierro y en el metabolismo del hierro, como las bacterioferrinas. También pertenecen a este regulón otras proteínas como las implicadas en el metabolismo celular, proteínas que participan en la respuesta al estrés oxidativo y algunos factores de virulencia. La proteína Fur también parece controlar genes cuyos productos están implicados en la movilidad, como el gen *flhD*, principal activador de la síntesis de flagelos en *E. coli*. La proteína Fur es un regulador pleiotrópico ya que regula la expresión de muchos genes implicados en la captación de hierro y de otros genes de importancia para la célula (Escobar y cols. 1999).

### 2.4 TbpA y TbpB.

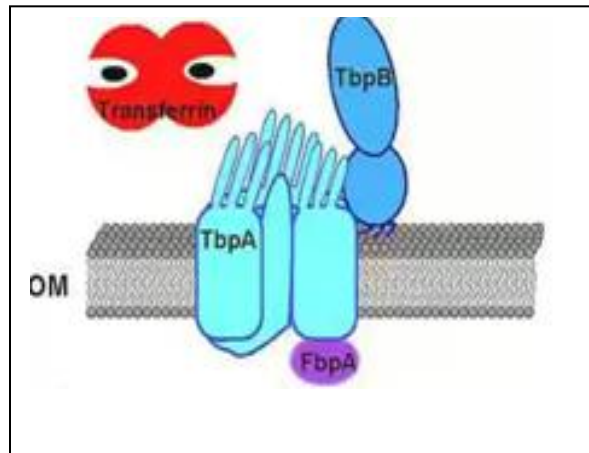
Son proteínas que funcionan como receptores de membrana, son regulados negativamente o reprimidos cuando hay exceso de hierro y se expresan por escasez de este elemento. En las familias *Pasteurellaceae* y *Neisseriaceae* están muy conservadas y reconocen únicamente a las transferrinas o lactoferrinas, nombrándose según lo que reconozcan, si reconocen transferrinas se denominan TbpA y TbpB (Fig.2), y si reconocen lactoferrinas se denominan LpbA y LpbB (Morton y Williams, 1989; Fuller y cols. 1998).



**Fig.2. Arreglo genético de los genes *tbp* de varias especies y géneros.** Los genes *tbpB* usualmente se encuentran antes de los *tbpA*, excepto en el caso de *M. catarrhalis* y *P. multocida*. En el caso de *M. catarrhalis* el orden de los genes se encuentra al revés y ambos están separados por un marco de lectura abierto (*orf3*) de función desconocida. En el caso de *P. multocida*, solo *tbpA* ha sido encontrado y caracterizado, y esta flanqueado por un gen que codifica para una leucina ARNt-sintetasa y un elemento IS (Cornelissen, 2003).

La proteína TbpA es una proteína integral de membrana, TonB es dependiente de TbpA y funciona como un canal a través del cual la transferrina internaliza el hierro. Una de las regiones que se extiende hacia la membrana externa, contiene diez residuos de aminoácidos altamente conservados, de secuencia GAINEIEYEN. Esta secuencia se encuentra en las proteínas TbpA de *A. pleuropneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, y en las LbpAs de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. Se ha propuesto que esta región conservada podría facilitar el paso de hierro libre a través del canal de la TbpA (Baltes y cols. 2002). TbpA presenta la misma afinidad por las proteínas cargadas con moléculas de hierro como por la apotransferrinas o moléculas carentes del ión (Schyvers y Stojiljkovic, 1999).

La proteína TbpB presenta un tamaño más variable, incluso dentro de la misma especie, aunque en todas las variantes de TbpB poseen un menor tamaño que la TbpA, de aproximadamente 70 kDa. Es una lipoproteína que posee una secuencia señal delimitada por un sitio de reconocimiento para la peptidasa II, cerca del extremo N-terminal. Se localiza expuesta en la superficie de la bacteria, siendo posible la presencia de dominios transmembranales que le permitirían extenderse hacia la membrana externa (Baltes y cols. 2002). Se ha propuesto un mecanismo de acción que consiste en que inicialmente la proteína TbpB reconoce a las transferrinas cargadas de moléculas de hierro, se une a ellas y las presenta a un dímero formado por dos proteínas TbpA ancladas en la membrana externa. La unión de la transferrina a estas dos proteínas podría inducir un cambio conformacional de TbpB y en las propias transferrinas, liberando los átomos de hierro que pasan al periplasma a través de los poros formados por las proteínas de membrana (Fig.3) (Schyvers y Stojiljkovic, 1999).



**Fig.3. Representación esquemática de TbpA y TbpB.** La glicoproteína transferrina esta formada por dos lóbulos similares, cada uno de los cuales es capaz de unirse a un átomo de hierro. Las proteínas de unión a transferrina TbpA y TbpB se encuentran localizadas en la membrana externa (OM) (Cornelissen, 2003).

Se ha hecho el análisis de mutantes deficientes de los genes que codifican las proteínas TbpA y TbpB y se demostró que son factores de virulencia en varias especies bacterianas pertenecientes a las familias *Pasteurellaceae* y *Neisseriaceae* (Cornelissen, 2003).

## 2.5 Sistema exbB-exbD-TonB

Para que tenga lugar la internalización del hierro desde la membrana externa hacia el interior del citoplasma se necesita que el sistema de transducción de energía TonB-ExbB-ExbD proporcione ATP. Con este fin, el ATP generado en la membrana citoplasmática, es transferido a los receptores TonB dependientes de la membrana externa a través del gradiente de protones proporcionado por las proteínas ExbB y ExbD (Charland y cols. 1995). La caja TonB asimismo es necesaria para la adquisición de energía del receptor.

Debido a que se han encontrado proteínas homólogas a la proteína TonB de *E. coli* en una gran variedad de bacterias gram negativas (Higgs y cols. 1998), se sugiere que este sistema está ampliamente distribuido y conservado a lo largo del proceso evolutivo.

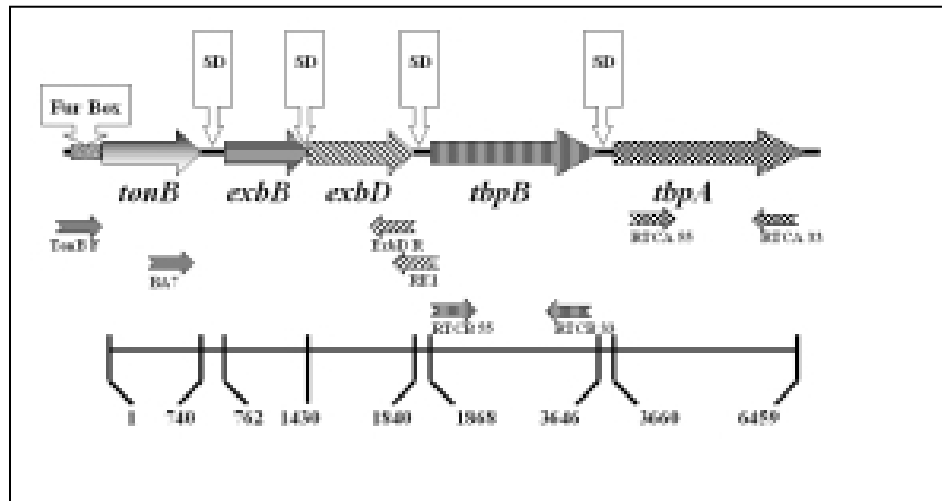


Fig.4. Disposición de la región *tonB-exbB-exbD-tbpB-tbpA* en algunos organismos con el tamaño de cada uno de los genes, caja Fur y secuencias Shine-Dalgarno (Del Río, 2004).

En algunos organismos se ha demostrado que en primer lugar se localiza el gen *tonB*, seguido en este orden, por los genes *exbB*, *exbD*, *tbpB* y *tbpA* (Fig.4), tal es el caso de *H. parasuis* y *A. pleuropneumoniae*. Sin embargo, en *P. multocida*, *M. Haemolytica* y *H. influenzae*, la disposición de los genes es diferente, puesto que el gen que se localiza en primer lugar es el *exbB*, seguido por los genes *exbD* y *tonB*. La localización de los genes *tbpB* y *tbpA* a continuación del gen *exbD* como se encuentran en *H. parasuis*, solamente se ha observado en el caso de *A. pleuropneumoniae* y *Actinobacillus suis*. Los cinco genes están ubicados en una región de 7 kb, con un posible promotor localizado, únicamente, antes del inicio de transcripción del gen *tonB* y no entre los genes *tonB-exbB*, *exbB-exbD*, *exbD-tbpB* y *tbpB-tbpA*, y coincide con lo descrito en *A. pleuropneumoniae* y en *A. suis* (Del Río, 2004).

## 2.6 Coriza infecciosa

La coriza infecciosa (CI) es una enfermedad del tracto respiratorio superior causada por la bacteria de nombre *Avibacterium paragallinarum*, se caracteriza por producir conjuntivitis, lagrimeo, estornudos, descarga nasal e incluso inflamación facial. Cuando la CI no se encuentra asociada a ningún otro microorganismo, se caracteriza por ser una enfermedad de corto tiempo y de curación espontánea. Sin embargo, la mayoría de las veces, es común verla asociada a otros agentes bacterianos o virales. Si ocurre una asociación microbiana, es común ver que la duración y el curso de la enfermedad se prolongue generando así el cuadro clínico que lleva por nombre: "coriza infecciosa

complicada” (Terzolo, 2009). Las aves que cursan con este cuadro clínico no se curan de manera fácil e incluso suelen quedar diversas secuelas siendo común la muerte de un gran número de ellas.

Esta enfermedad ocurre a nivel mundial y su impacto económico, radica en las pérdidas que ocasiona a la avicultura, por muerte, sustitución del stock y una disminución del 10-40% en la producción de huevo (Fernández y Berngueria, 2000). La CI afecta tanto a gallinas de engorda como gallinas ponedoras, ocasionando retraso en el crecimiento del organismo, pérdida de peso, incremento del número de aves que mueren y a la predisposición a la enfermedad crónica complicada en gallinas de postura (Blackall, 1999).

En nuestro país, la industria avícola es de gran importancia, ocupando el primer lugar a nivel mundial en consumo de huevo por persona (Avicultores, 2009). Por esta razón, es de suma importancia tener una manera de evitar los brotes de CI. En la actualidad se han empleado distintos tipos de vacunas, sin embargo, ninguna de estas ha logrado conferir una protección heteróloga y por tanto, la enfermedad aún existe y genera grandes pérdidas económicas a nuestro país, es por esa razón, que se necesitan buscar nuevos métodos para tratar de fabricar una vacuna que combata eficientemente a la CI.

## **2.7 *Avibacterium paragallinarum***

*Av. paragallinarum* es una bacteria gram negativa, pleomórfica e inmóvil perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*. Es una bacteria anaerobia facultativa, catalasa y oxidasa negativa e indol negativo. El microorganismo aislado de las fosas nasales de las aves infectadas y de un medio de cultivo, poseen características de coloración bipolar, tiene un tamaño de 0.4 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho y de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de largo. En cultivos jóvenes se presenta como cocobacilos cortos y en cultivos de 24 a 48 h. existe en formas más alargadas (Holt et al. 1994).

*Av. paragallinarum* es comúnmente cultivado bajo una atmosfera de  $\text{CO}_2$ , aunque esto no es un requerimiento esencial. La temperatura de crecimiento para este microorganismo se encuentra entre los 25 y 45 °C, aunque es incubado comúnmente a 37 o 38 °C (Blackall et al. 1997).

Las colonias de *Av. paragallinarum* crecen cerca de los bordes de una cepa nodriza que puede ser *Staphylococcus aureus* o *S. epidermidis*, debido a que estas especies proporcionan NAD para el crecimiento de *Av. paragallinarum* (Hofstad, 1964).

El microorganismo se caracteriza por formar colonias lisas, con bordes regulares, de aspecto semiopaco y convexo. El diámetro de las colonias varía de 0.5 a 1 mm. Este microorganismo se caracteriza por no presentar hemólisis y sus colonias pueden presentarse de manera puntiforme (Gilson, 1998).

Se ha demostrado que existe una relación entre las propiedades serológicas, morfológicas y la virulencia de *Av. paragallinarum*. Los microorganismos capsulados presentan colonias lisas, tienen antígenos serovar-específicos (antígenos L y HA-L), forman colonias fuertemente iridiscentes y son altamente virulentos *in vivo*. Los microorganismos ligeramente capsulados que tienen antígenos serovar-específicos forman colonias poco iridiscentes y son moderadamente virulentos. Los no capsulados o ligeramente capsulados, con o sin antígenos serovar-específicos forman colonias no iridiscentes o ligeramente iridiscentes son avirulentos (Sawata et al. 1983).

## **2.8 Composición antigénica de *Av. paragallinarum*.**

*Av. paragallinarum*, cuenta con la cápsula, que es una estructura protectora que rodea la pared celular. Su función principal es proteger a las bacterias contra los mecanismos de defensa del huésped (Sawata et al. 1984). Además de la hemaglutinina (HA) y la cápsula, se han descrito otros antígenos de *Av. paragallinarum*, entre ellos el lipopolisacárido y algunas proteínas de membrana externa (Blackall et al. 1990; Bragg et al. 1997).

Kume y Sawata observaron que cuando la HA es inoculada en pollos, estos, son capaces de producir anticuerpos que inhiben la hemaglutinación mediada por la HA (Iritani, et al. 1976).

Sawata mostró que las cepas capsuladas que forman colonias iridiscentes de los serotipos 1 y 2, tenían al menos tres antígenos: L, que es sensible a tripsina, termolábil y es considerado como antígeno capsular, pues la pérdida de la cápsula se acompaña de la pérdida del antígeno L (Sawata et al. 1979; Sawata et al. 1984); HL, es resistente a tripsina, termolábil (Rosenshine et al. 1996); y HS, que es un antígeno resistente a tripsina y termoestable (Rosenshine et al. 1996). Posteriormente se denominaron HA-L, HA-HL y HA-HS, esto debido a que se demostró que estos antígenos son hemaglutininas pertenecientes a diferentes serotipos de *Av. paragallinarum* (Kume et al. 1980).

## **2.9 Patogénesis.**

*Av. paragallinarum* infecta al ave por vía respiratoria y después de un periodo que varía entre 1 a 3 días, produce una enfermedad que se manifiesta con la inflamación de los senos paranasales. Cuando el ave cursa por la forma no complicada de la enfermedad, las lesiones generalmente quedan confinadas al tracto respiratorio superior. La sinusitis puede estar asociada a la inflamación de los barbillones, conjuntivitis o queratitis. Los cambios patológicos que se producen a partir de las 20 horas post-infección (PI) alcanzan su máxima severidad a los 10 días PI y la reparación subsecuente finaliza a los 14-21 días PI (Blackall et al. 1997). La duración de la enfermedad varía dependiendo del inóculo y de la virulencia del microorganismo. Los casos de neumonía y aerosaculitis son menos frecuentes aunque también suelen ocurrir, cuando las cepas infectantes tienen la capacidad para producir septicemia. En muchos de estos casos se ha aislado de órganos internos, articulaciones y de globos oculares (Sandoval et al. 1994). En las gallinas ponedoras genera alta mortalidad y una importante pérdida en la producción de huevos. Cuando se producen casos de CI complicada con otros microorganismos, las lesiones respiratorias se agravan siendo comunes las neumonías y la aerosaculitis se puede complicar por la presencia de *E. coli*, prolongándose la duración de la enfermedad hasta por 50 días (Blackall et al. 1997).

## **2.10 Síntomas de la enfermedad.**

Los primeros síntomas de la enfermedad consisten de ruidos que delatan la presencia de mucosidad en las vías respiratorias altas, así como estornudos en algunos animales. Los signos clínicos más comunes son: descarga nasal, que al principio es clara y filamentosa y a medida que la enfermedad avanza la secreción nasal toma después un color amarillento y el animal exhala un olor fétido (Baltes et al. 2001; Glisson, 1998). También, el animal puede presentar conjuntivitis con tumefacción en los párpados, las secreciones se acumulan en los senos infraorbitarios, los párpados se pegan y se origina edema facial, también pueden presentarse lagrimeo, postración, disnea, anorexia y diarrea (Glisson, 1998; Hofstad, 1964; Yamamoto, 1980). En casos graves se produce inflamación aguda de las membranas mucosas, del pasaje nasal y los senos infraorbitarios, hay conjuntivitis frecuente y edema subcutáneo y puede haber también neumonía y aerosaculitis (Yamamoto, 1980). La enfermedad causa disminución en el consumo de agua y de alimentos provocando a su vez un retardo en el crecimiento de las aves, además de una reducción en la producción de huevo.

Las complicaciones en la enfermedad (CI) se deben a la presencia de otros microorganismos infecciosos, produciéndose distintas lesiones como: sinusitis, edema pulmonar, peritonitis, esplenomegalia, congestión hepática, ovaritis, congestión renal,

enteritis y edema craneal; estas lesiones se observan en la necropsia de las aves que mueren por dichas complicaciones (Sandoval et al. 1994).

### **2.11 Tratamiento y vacunas**

Se han utilizado diversos antibióticos para combatir la coriza infecciosa, entre ellos se encuentran la Eritromicina, Cloranfenicol y Oxytetraciclina, los cuales son los de mayor uso, sin embargo, se ha reportado resistencia a estos medicamentos, dicha resistencia se debe principalmente a un tratamiento discontinuo en el que la infección no se ha eliminado del todo (Blackall, 1988). Un estudio en México muestra que todos los microorganismos fueron sensibles a Penicilina, Ampicilina y Eritromicina, 95 % fueron sensibles a Tetraciclina, 80% a Neomicina y 62.5 % a Estreptomina (Zinsser, 1983).

La eliminación de las aves enfermas es la medida de control más eficiente que se tiene, sin embargo, esto no es práctico en granjas donde la enfermedad reaparece de manera continua, por lo que la vacunación es esencial para el control de CI. Se han elaborado vacunas mediante diferentes procesos: la propagación en embriones de pollo fue un método utilizado a principios de 1960. Sin embargo, estas vacunas no brindan una protección eficiente contra los signos clínicos de CI, sólo previenen el desarrollo de lesiones en sacos aéreos secundarios así como la disminución en la producción de huevo. Las vacunas elaboradas en caldos, principalmente infusión de corazón de pollo, dan una mejor protección. Existe un solo estudio reportado donde una dosis de  $1 \times 10^8$  UFC por vacuna, es el mínimo necesario para dar una buena protección contra *Av. paragallinarum* (Blackall, 1995).



### 3. Justificación

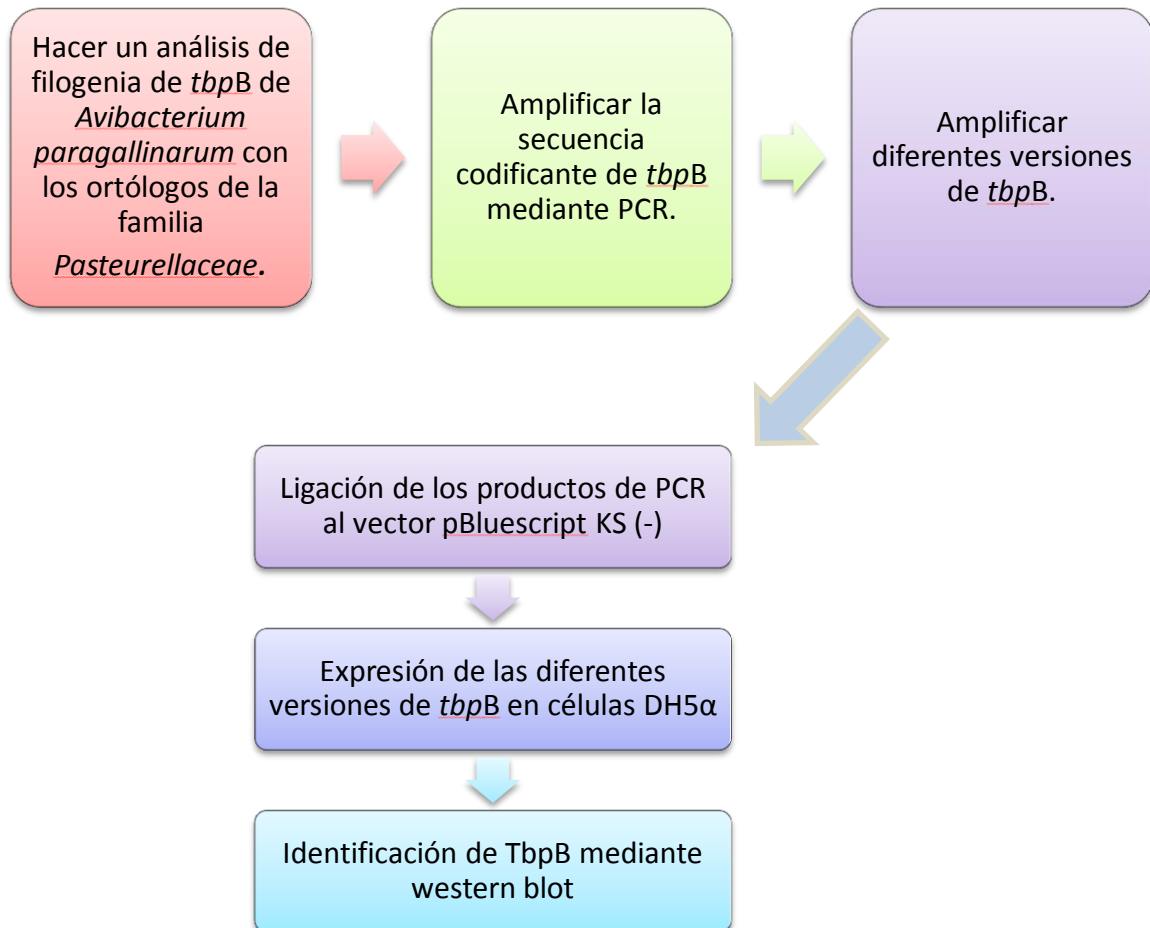
La industria avícola juega un papel de gran importancia en la nutrición de la población, pues sus productos son fuente de proteína completa, disponible a bajo precio. Nuestro país ocupa el primer lugar mundial en el consumo de huevo por persona. Las enfermedades como la coriza infecciosa, prevalecen en las granjas avícolas y en ocasiones se tornan complicadas, a menudo se asocian con infecciones secundarias por otros patógenos y se requiere cambiar el stock de aves debido a la baja postura que presentan las gallinas enfermas.

El desarrollo de vacunas que prevengan este tipo de enfermedades aun no es eficiente, sobre todo para cepas regionales. Debido a un control inadecuado, la pérdida económica aumenta, por lo que es necesario la búsqueda de nuevas formas para generar soluciones, aquí proponemos la utilización de la proteína de membrana externa TbpB de *Avibacterium paragallinarum* como un valioso antígeno.

#### 4. Objetivos

- Amplificar y clonar varias versiones del gen *tbpB* de *Av. paragallinarum*
- Evaluar la expresión de TbpB en un sistema heterólogo

## 5. Esquema de trabajo



## 6. Material y métodos

### 6.1 Material biológico.

| Cepa                           |
|--------------------------------|
| <i>Av. paragallinarum</i> 0083 |
| <i>E. coli</i> XL1 BLUE        |
| <i>E. coli</i> DH5a            |
| <i>S. aureus</i>               |

### 6.2 Medios de cultivo.

Los medios empleados en este trabajo fueron: Agar gelosa sangre de carnero para la resiembra y mantenimiento de *Av. paragallinarum*, este medio de cultivo fue suplementado con 0.01 % de NAD. Se utilizó LB para el mantenimiento de *E. coli* así como para el mantenimiento y crecimiento de las transformantes. Se utilizó el caldo infusión cerebro y corazón (BHI) para el crecimiento y extracción de DNA de *Av. paragallinarum*.

### 6.3 Cultivo de *Av. paragallinarum*

La cepa *Av. paragallinarum* 0083 se cultivó en agar gelosa sangre durante un tiempo de 48 horas a una temperatura de 37°C. Una vez obtenidas las colonias, se seleccionó una colonia, se inoculó en 3 ml de caldo BHI-NAD durante 12 horas a 37°C, como preinóculo para extraer DNA total.

### 6.4 Extracción de DNA genómico de *Av. Paragallinarum*

Un cultivo de 10 ml de BHI, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Una vez decantado el sobrenadante se agregó 1 ml de buffer de lisis alcalina para bacterias, se homogenizó y se hicieron alícuotas de 500 µl en 2 tubos Eppendorf. Se agregó 1 ug de lisozima y se incubó a 37°C durante 20 minutos. A continuación se agregó 40 µl de SDS al 20% y se mezcló, posteriormente se agregó un volumen de fenol-tris pH 8 y se mezcló por inversión. Se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó un volumen de fenol cloroformo isoamílico, se mezcló, se centrifugó y

nuevamente se transfirió a un tubo nuevo la fase acuosa y se agregó cloroformo. A continuación se centrifugó nuevamente durante 5 minutos y se tomó la fase acuosa para ser colocada en un tubo nuevo. Se le agregaron 2 volúmenes de alcohol absoluto y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 7. Se mezcló y se incubó a -20°C durante 15 minutos. Se centrifugó 30 segundos, se desechó el alcohol y agregó un volumen de etanol al 70% para lavar la pastilla, nuevamente se incubó a -20°C durante 15 minutos. A continuación se desechó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en agua desionizada estéril (Neumann, 1998).

## 6.5 Amplificación de un fragmento del gen *tbpB* mediante PCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó empleando una mezcla de reactivos de la marca Invitrogen y 10 ng de ADN genómico de *Av. Paragallinarum*, siguiendo las instrucciones del fabricante como se describe en la tabla 1. El producto de amplificación se obtuvo empleando un termociclador marca Eppendorf. El programa consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C, alineamiento 58 °C por 30 segundos y extensión de 72 °C durante 2 minutos. El programa terminó con una extensión final de 72 °C por 5 minutos y posteriormente el producto se almacenó a 4 °C.

| Reactivo          | Cantidad (μL)    |
|-------------------|------------------|
| Agua estéril      | 16.25            |
| Buffer 10X        | 2.5              |
| pTaq              | 0.5              |
| dNTPS<br>(100mM)  | 1                |
| Primer<br>(100Mm) | 1(rev ) + 1(fwd) |
| cDNA              | 1                |
| MgCl<br>(50mM)    | 0.75             |

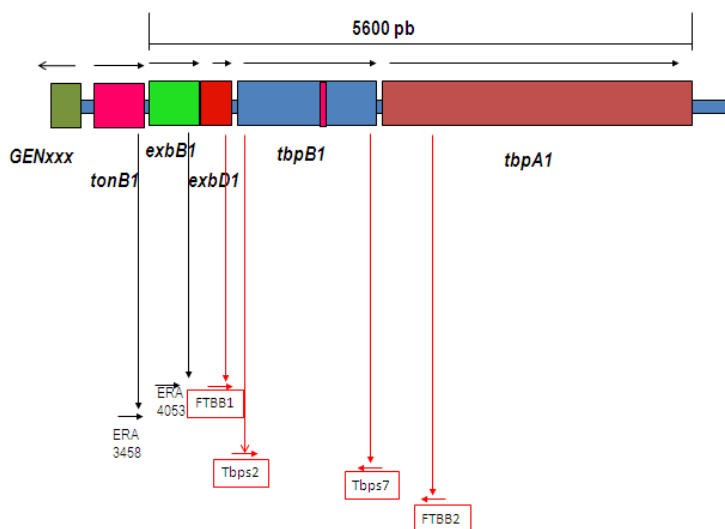
Tabla 1. Se muestran los reactivos y las cantidades utilizadas para llevar a cabo la reacción de PCR.

*Av. paragallinarum* cepa 0083 fue cultivada en caldo BHI suplementado con NAD, durante 24 horas, se extrajo su ADN genómico y se amplificaron diferentes regiones de la secuencia codificante *tbpB* utilizando los siguientes primers:

| Primer delantero | Primer reverso | Tamaño del amplificado |
|------------------|----------------|------------------------|
| ERA3458          | FTBB2          | 3557pb                 |
| ERA4053          | FTBB2          | 2962pb                 |
| FTBB1            | FTBB2          | 2534pb                 |
| Tbps2            | Tbps7          | 1591pb                 |

**Tabla 2.** Pares de primer utilizados para la amplificación de los distintos fragmentos de TbpB a través de la reacción de PCR.

Los primers son complementarios a las regiones que se muestran en el diagrama siguiente el cual representa el operón *tonB-exbB-exbD-tbpB-tbpA* que puede presentar *Avpg* (figura 5).



**Fig. 5.** Diagrama que representa la localización de los primers dentro del operón que contiene *tbpB* de *Avpg*.

## 6.6 Electroforesis en gel de agarosa

El producto amplificado mediante la técnica de PCR fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, en el que se cargaron 5 µL de muestra de reacción. El corrimiento se hizo en una cámara electroforética horizontal durante un tiempo aproximado de 50 minutos a 90 volts/cm en buffer TBE 0.5X. Los productos de PCR junto con el marcador de peso molecular fueron visualizados mediante tinción del gel con una solución acuosa de bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/mL durante 10 minutos. Posteriormente se colocó en un transluminador UV y se identificaron los fragmentos fluorescentes correspondientes a cada una de las versiones de *tbpB*.

### **6.7 Ligación al vector pBluescriptKs(-).**

Para ligar los productos de PCR se adicionaron 100 ng de DNA del producto amplificado, 50 ng del vector pBluescriptKs(-) previamente linealizado con la enzima *EcoRV* y la enzima ligasa T4 a la concentración recomendada por el fabricante con su buffer correspondiente. A continuación la reacción se incubó durante una noche a 20°C. El producto de ligación se almacenó a 4 °C hasta su uso en transformación (de acuerdo a las instrucciones del fabricante).

### **6.8 Transformación de *E. coli* DH5α competentes.**

Una vez ligado el producto de PCR al plásmido pBluescriptKs(-), a 5 µL de la ligación se le añadieron 50 µL de células competentes DH5α, se mezclaron y se incubaron durante 40 minutos en hielo, posteriormente se sometió a choque térmico incubando a 42 °C durante 1.5 minutos y después a 4 °C durante el mismo tiempo. Posteriormente se adicionó medio LB e incubó a 37°C durante 1 hr. Después de este tiempo, las células fueron sembradas en placas que contenían medio LB adicionado con ampicilina (125µg/mL) ya que el vector empleado contiene un cassette de resistencia para este antibiótico, además se adicionó XGal-IPTG como agentes inductores para permitirnos un seguimiento adecuado de las posibles transformantes. Las placas se incubaron a 37 °C por 12 horas.

### **6.9 Extracción de DNA plasmídico.**

Para determinar la presencia de DNA plasmídico en las células transformadas, se realizó una extracción mediante lisis alcalina, con el empleo de soluciones que en presencia de un detergente fuertemente aniónico (SDS), provoca lisis celular y desnaturalización del DNA cromosómico y así como de proteínas, pero no de DNA plasmídico, posteriormente se realizó una extracción con fenol-cloroformo, finalmente el DNA plasmídico se precipitó con etanol absoluto durante 10 minutos a 4°C, se centrifugó a 12 000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante, dejando secar la pastilla para evaporar el alcohol. El DNA se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril y se almacenó a 4°C.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con una alícuota de la muestra, el gel se reveló con bromuro de etidio para verificar el proceso de extracción del DNA plasmídico.

#### **6.10 Verificación de presencia y orientación del inserto**

El DNA purificado se sometió a restricción enzimática con dos enzimas, *EcoRV* y *HindIII*, seleccionadas por ser las enzimas capaces de liberar fragmentos identificables para la comprobación de la orientación y presencia del inserto. Dicha restricción se realizó separadamente, para lo que se mezclaron 100 ng de plásmido, en una reacción de 30  $\mu$ l y 10 U de enzima de restricción. La mezcla de reacción se incubó durante una hora a 37°C siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La restricción se verificó mediante separación electroforética, después de teñir el gel se identificaron las bandas correspondientes al tamaño de cada una de las versiones de *tbpB*.

#### **6.11 Inducción del gen *tbpB* con IPTG**

Una vez comprobada la orientación del inserto dentro del vector, se procedió a hacer una inducción con IPTG a una concentración de 1mM. Para este procedimiento primero se hizo un precultivo de 5 ml de cada una de las células que contienen diferentes construcciones y de un control, estos cultivos fueron incubados durante toda la noche. Al día siguiente, se tomó 1 ml de cada cultivo y se colocaron en matraces que contenían 50 ml de medio y se dejaron incubando a 37 °C hasta que llegaron a una  $D_{0.2-0.6 \text{ nm}}$ . Una vez que todos los cultivos llegaron a la densidad celular esperada, se adicionó IPTG a una concentración de 1mM. A partir de este momento se inició la toma de muestras cada 2 horas, durante 8 horas, después de la adición del agente inductor. Cada una de las muestras fue centrifugó y la pastilla obtenida fue resuspendida en buffer con  $\beta$ -mercaptoetanol. Las muestras fueron analizadas en un gel desnaturizante SDS-PAGE.

#### **6.12 Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE)**

Para verificar la inducción de la proteína, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las muestras analizadas se



prepararon mezclando la solución proteica con un volumen igual de solución tampón de corrimiento con SDS, se sometieron a ebullición durante 10 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10 %, que posteriormente se tiñó con azul de Coomassie para identificar la aparición de bandas distintas al patrón de bandeo correspondiente a nuestro control.

### **6.13 Inducción de la proteína con 2,2-Dipiridil**

De la misma manera que se hizo la inducción con IPTG, se hizo otra inducción pero esta vez usando 2,2-dipiridil. Una vez que se llevó el cultivo a una densidad óptica de 0.5 nm se agregó 2,2.dipiridil a una concentración de 50Mm una vez hecho esto, se procedió a tomar muestras cada 2 horas durante un tiempo de 8 horas. Las muestras se centrifugaron y la pastilla obtenida se procesó con  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente las muestras se analizaron en un gel desnaturalizante SDS-PAGE. El gel se tiñó con azul de Coomassie para comparar el patrón de bandeo correspondiente con el presentado por el control negativo.

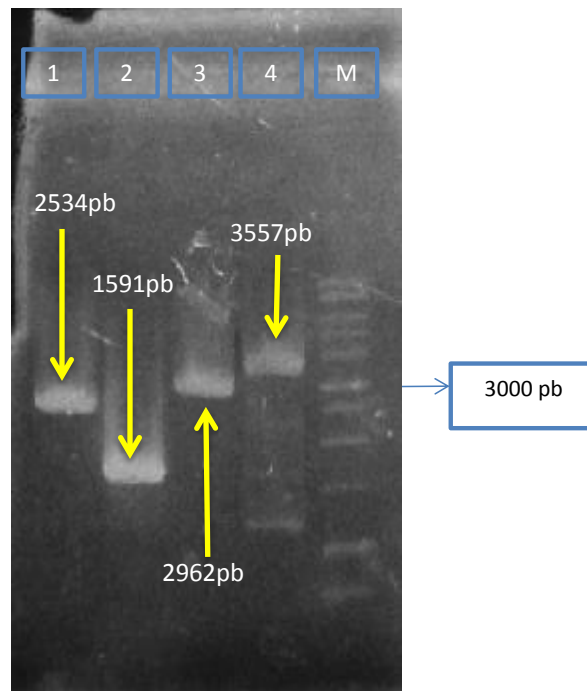
### **6.14 Western blot**

Una vez observada la presencia de bandas presuntivas de ser 60KDa, se procedió a determinar la reactividad cruzada de esta proteína mediante un western blot usando anticuerpos policlonales contra TbpB. Para esto, se hizo una transferencia de proteínas totales a una membrana de nitrocelulosa. Una vez hecho esto, la membrana se bloqueó y posteriormente se dejó incubando durante 2 horas con el anticuerpo Anti-TbpB de *Avpg*. A continuación se hicieron tres lavados con PBS para quitar el exceso de anticuerpo primario. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo igG de cabra anti-conejo secundario combinado con peroxidasa durante 2 horas, se hicieron tres lavados y se procedió a revelar la muestra con peróxido y diaminovencidina.

## 7. Resultados

### 7.1 Amplificación del gen *TbpB* mediante PCR

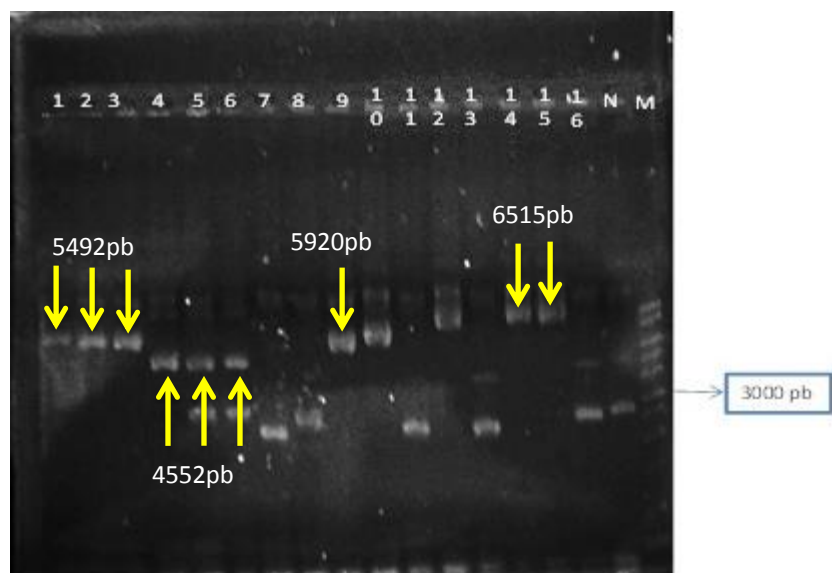
Con los primers previamente mencionados, se obtuvieron los distintos amplificados predichos en la tabla 2, los cuales se muestran en la figura 6. Los amplificados corresponden a la secuencia codificante *tbpB* que contienen regiones 5' de diferente tamaño (2543pb, 3557 pb y 2962 pb) y un amplificado del gen en su forma trunca (1591 pb).



**Fig. 6.** Gel de agarosa al 0.8% donde se muestran los productos amplificados del gen *tbpB* con varios tamaños. Carril 1: 2534pb; carril 2: 1591 pb; carril 3: 2962 pb; carril 4: 3557 pb; carril M: marcador de peso molecular.

### 7.2 Ligación de los productos amplificados al vector pBluescriptKs (-)

Los diferentes productos de PCR se ligaron al vector pBluescript KS(-) y se hizo la transformación en células competentes de *E. coli*. La selección de transformantes se hizo en medio LB adicionando ampicilina, Xgal e IPTG. Se extrajo el ADN plasmídico, y se verificó la ligación de *tbpB* (productos de PCR) por medio del corrimiento electroforético en gel de agarosa (Figs.7 y 8).



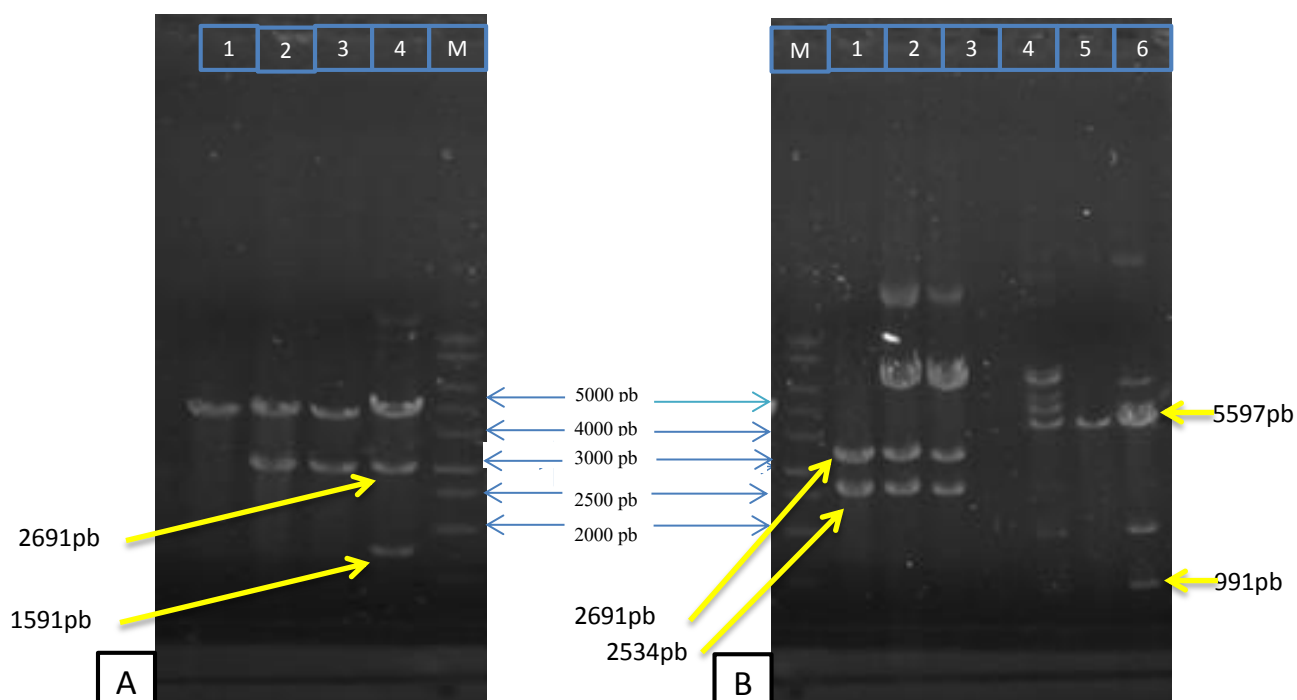
**Fig. 7.** Gel de agarosa al 0.8% donde se muestran diferentes versiones de *tbpB* clonadas en pBluescript KS(-). Las flechas señalan los tamaños correspondientes a cada versión. Carriles 1-3: 5492 pb; carriles 4-6: 4552 pb; carril 9: 5920 pb; carriles 14 y 15: 6515 pb; carril N: control (-) Ks(-).

### 7.3 Verificación de la orientación del inserto de *tbpB*

Después de obtener las clonas se verificó la orientación del inserto mediante restricción con las enzimas *EcoRV* Y *HindIII* para el caso de las versiones de *tbpB* (2962 pb y 2534 pb). Para la otra versión de *tbpB* (3557 pb) se utilizaron las mismas enzimas debido a que se estaba cortando en el plásmido y se esperaban distintos tamaños ya que los amplificados de *tbpB* son de diferentes número de pares de bases. Se logran observar algunas clonas positivas (en cuanto orientación) para estas tres versiones de *tbpB* (Fig.9). Cabe destacar que los amplificados obtenidos incluyen los fragmentos que abarcan la mayor parte del gen y estos, nos permitirán obtener la proteína completa o versiones

ligeramente más cortas de la misma. Los tamaños liberados por la restricción enzimática son:

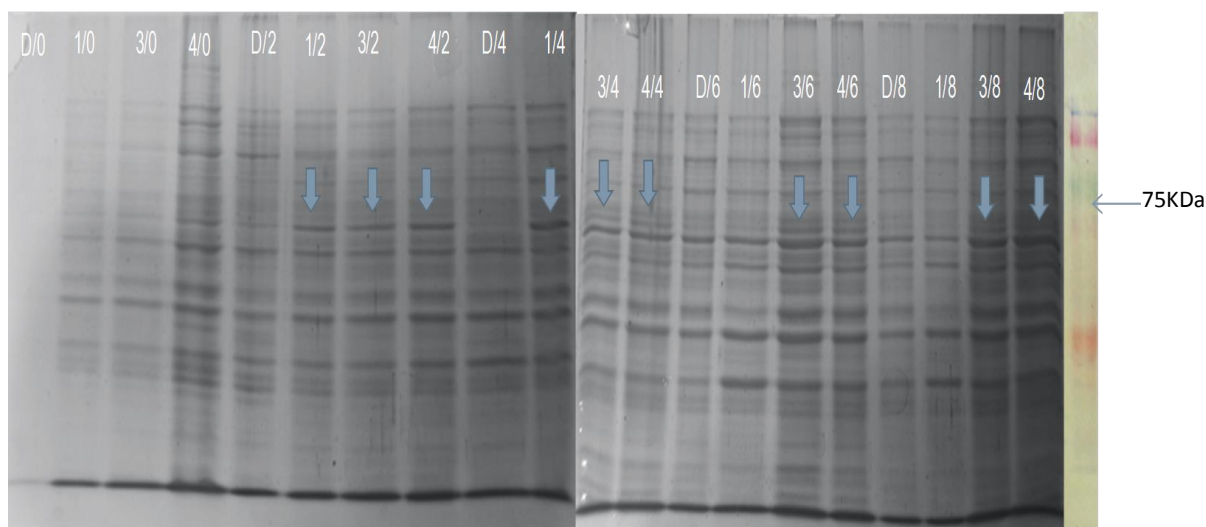
|         |                  |
|---------|------------------|
| 1) 4552 | •2961pb + 1591pb |
| 2) 5492 | •2961pb+ 2534pb  |
| 3) 6515 | •5597pb + 991pb  |



**Fig. 9. Geles de agarosa al 0.8% que muestran la liberación de los fragmentos clonados de *tbpB* en pBluescript KS(-), restricción enzimática con *EcoRV* y *HindIII*.** A) carriles 1-3: digestiones parciales donde solo se obtiene la linealización de la construcción 1; carril 4: fragmentos liberados correspondientes a la primer construcción; B) carriles 1-3: fragmentos liberados correspondientes a la segunda construcción; carriles 4-5: digestiones fallidas, carril 6: fragmentos liberados correspondientes a la tercer construcción.

## 7.4 Inducción con IPTG

La inducción de la expresión de la probable TbpB a partir de las diferentes construcciones en *E. coli*, con 1 mM de IPTG, permitió observar una banda de aproximadamente 60 kDa, la cual se encontraba ausente en el patrón de proteínas de *E. coli* que contenía únicamente pBluescript KS(-) sin inserto alguno. Las proteína inducidas con 1mM de IPTG se observan en un gel SDS-PAGE, el patrón de bandeo se muestra comparativamente con el control negativo (Fig. 10).

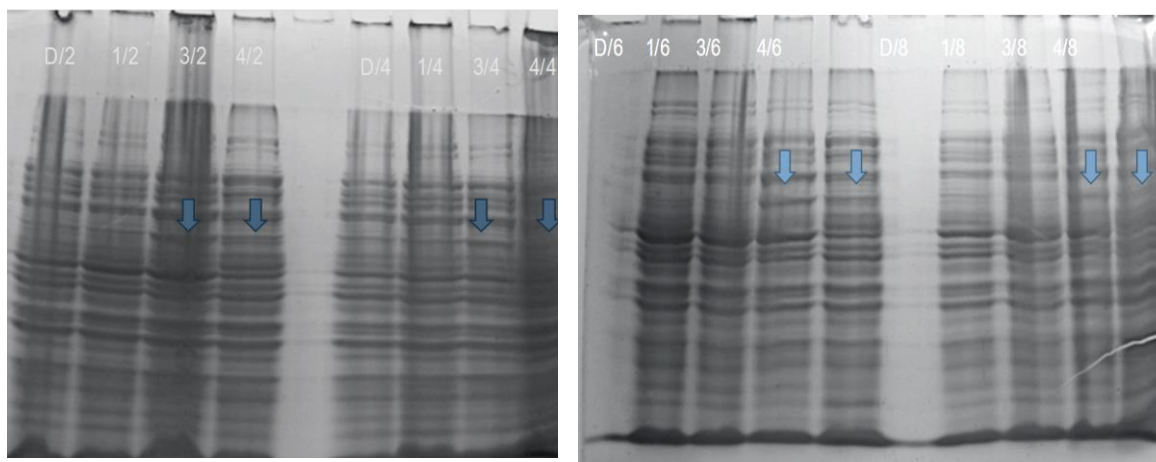


**Fig. 10.** Gel de SDS-PAGE al 10% donde se observa el patrón de proteínas de diferentes transformantes de *E. coli* DH5α + pBluescript conteniendo clonaciones 1, 3 y 4 o *E. coli* DH5α + pBluescript sin inserto en presencia de IPTG a diferentes tiempos de inducción (2, 4, 6, y 8h). En la imagen se puede observar la aparición de una banda proteica distinta al patrón de bandeo del control negativo (DH5α) aproximadamente a un tamaño de 60KDa. Las flechas indican la aparición de la proteína inducida.

## 7.5 Respuesta de las diferentes cepas DH5a pBluescript- *tbpB* a la adición de 2,2 dipiridyl

Para verificar la expresión del gen bajo condiciones de estrés por hierro, se cultivaron las diferentes construcciones genéticas en presencia de 2,2 dipiridyl a una concentración de 20 µg/ml.

A las 3 cepas que contienen las construcciones ya inducidas y al control negativo se les extrajo la proteína total e inmediatamente se hizo el corrimiento electroforético en un SDS-PAGE (Fig.11).

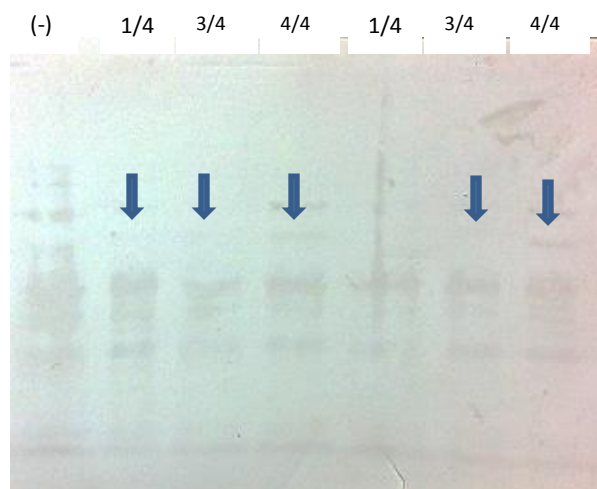


**Fig. 12. Gel de SDS-PAGE al 10% donde se observa el patrón de proteínas de diferentes transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  + pBluescript conteniendo clonaciones 1, 3 y 4 o *E. coli* DH5 $\alpha$  + pBluescript sin inserto en presencia de dipiridil a diferentes tiempos de inducción (2, 4, 6, y 8h). En la imagen se puede observar la aparición de una banda proteica distinta al patrón de bandeo del control negativo (DH5 $\alpha$  + pBluescript sin inserto) aproximadamente a un tamaño de 60KDa. Las flechas indican la aparición de la proteína inducida.**

D: control conteniendo sólo DH5- $\alpha$  KS (a 2, 4, 6 y 8 hrs.); 1, 3, 4: corresponden a los extractos proteicos de las distintas transformantes (a 2, 4, 6 y 8 hrs). Las flechas indican la posición de la banda correspondiente al peso de la proteína de nuestro interés (60 KDa).

## 7.6 Western blot

La aparición de bandas no presentes en la muestra del control negativo, nos hacía sospechar de la posible expresión del gen clonado. Para corroborar esta posibilidad, se hizo un inmunoreconocimiento antigénico con anticuerpos policlonales para detectar la proteína TbpB y de esta manera establecer la expresión del gen *tbpB*. (Fig. 12).



**Fig. 12. Western blot donde se muestra la identificación de la proteína TbpB.** 1::control conteniendo sólo DH5- $\alpha$  KS (a 4 hrs.); 1/2, 3/2,4/4: corresponden a las distintas transformantes (a 2 hrs); 1/4, 3/4,4/4: corresponden a las distintas transformantes (a 4 hrs) Las flechas indican la posición de la banda correspondiente al peso de la proteína de interés.

## 8. Discusión

Las bacterias de la especie *Avpg* son un problema en la salud veterinaria, especialmente en los sistemas de producción de aves de postura y de carne, esto debido a la generación de la enfermedad coriza infecciosa. Como un intento para contrarrestar la enfermedad se han elaborado vacunas de bacterias atenuadas conocidas como bacterinas. Este remedio ha sido poco exitoso debido a que regularmente aparecen nuevas variedades patogénicas de *Avpg*. Ante esta situación en el presente trabajo se planteó el diseño de una estrategia que condujera a montar un sistema de expresión de proteínas, propio para producir antígenos específicos de la bacteria *Avpg*. El candidato de primera elección fue la proteína TbpB y su gen, con los cuales se montaría el sistema de expresión y se evaluaría la capacidad de acumulación de proteína en una serie de condiciones, que permitirían inducir la expresión de TbpB por medio de la activación del gen codificante a través del promotor del gen de la beta-galactosidasa albergado en el plásmido *pBluescript KS(-)* por medio del inductor gratuito IPTG. Una alternativa adicional que se planteo fue probar la capacidad que tendrían las secuencias 5' del gen *tbpB* para contener un promotor que regulara la transcripción del gen problema. Esta situación de entrada entraña un interés adicional para conocer la contribución reguladora específica del extremo 5' dado que el gen *tbpB* forma parte de un operón, que está constituido de los genes *tonB-exbB-exbD-tbpB-tbpA* arreglados en tándem, en donde una posible secuencia reguladora prácticamente estaría contenida en las cortas secuencias codificantes de los genes río arriba del gen *tbpB*.

Una de las construcciones contenía la región estructural o interna de la región codificante del gen *tbpB* (con 2534 pb), esta construcción no tiene forma de expresarse por carecer de un promotor activo en la secuencia clonada por lo que sería un control carente de expresión aunque su clonación también es útil porque se pretendía que se clonara para futuros análisis de expresión dirigidos por un promotor ajeno al sistema de captación de hierro, con el cual se podría hacer una inducción a modo. Esta secuencia no tuvo expresión en *pBluescript KS(-)* como se esperaba aunque se hizo el proceso de inducción con dipyrilidil.

La segunda construcción contenía un fragmento río arriba de 2962 pb que contenía un pequeño segmento de *exbD1* y la región intergénica, aquí podría existir una mínima secuencia reguladora que controlara la expresión de *tbpB* que parece ser el caso, como se observó en el gel de Coomassie después de la inducción. No obstante, es posible que la



inducción generara un transcrito completo por medio del promotor de la betagalactosidasa, que por el uso de un promotor residente en la secuencia nativa rio arriba de *tbpB*. Si fue este el caso, la región rio arriba de la secuencia nativa de *tbpB*, tampoco genero una alteración en la sobreexpresión de la proteína tentativa de *tbpB*, como se ha propuesto para las regiones rio arriba no traducidas de otros genes.

En la última construcción probada en este trabajo que abarco una segunda región intergénica que abarcó hasta el 3' del gen *tonB1* (contenía 3557 pb), la inducción con IPTG, mostro la misma inducción de proteína. Esta observación es consistente con una secuencia rio arriba estable. En términos de una región líder no traducible, esta no evitó la expresión observada con regiones cortas del extremo 5' de *tbpB*, excepto a tiempos largos cuando las secuencias más cortas dieron la apariencia de una represión, atenuación o inestabilidad del transcrito corto producido por el promotor *lac*.

El análisis del patrón de proteínas totales de *E. coli* transformado con las diferentes construcciones que contenían a *tbpB1* con longitudes variables de la región líder 5' nativas de este gen, tuvieron una correlación con el western blot, donde se identificó la proteína TpbB por medio de anticuerpos policlonales de conejo. Por lo tanto se puede concluir que es prometedora la idea de usar a TpbB como un antígeno potencial en *Avpg* en un sistema de vacunación cuyo origen sea un sistema heterólogo, ahora habrá que pensar en un buen sistema de expresión de la proteína TpbB que permita evaluar rendimiento para lograr alta productividad sin pérdida de antigenicidad.

Sabiendo que existen varios microorganismos que elaboran una proteína TbpB también resulta atractivo hacer un análisis de las proteínas con el fin de identificar potenciales epítomos comunes que facilitaran ampliar la estrategia de generar inmunidad contra proteínas que ligan transferrinas, tal es el caso de otros patógenos de animales como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* como patógenos de humano. La estrategia evaluada en este trabajo quizás igual podría dirigirse hacia la proteína complemento del sistema de captación de hierro a través de transferrina, la proteína TbpA, con el fin de comparar la efectividad de una respuesta inmune inducida contra un antígeno.

## 9. Conclusiones

- El sistema de expresión heterólogo propuesto en este trabajo permitió la expresión de 3 versiones de distintas longitudes de la proteína TbpB.
- Las condiciones utilizadas para el sistema de expresión son adecuadas y se corroboró por medio de la identificación de la proteína con anticuerpos policlonales.
- Usar TbpB como una proteína antigénica es prometedor para evaluarla como un antígeno potencial en *Avpg* que puede ser obtenido un sistema heterólogo.

## 10. Anexos

- **Medio Luria- Bertani (LB).**

Es un medio de cultivo apto para un gran número de bacterias sin requerimientos especiales.

La forma de preparación es la siguiente:

Para 1000 ml de agua desionizada se necesitan:

10 g Peptona de caseína

5 g Extracto de levadura

10 g Cloruro de sodio

- **LB con Ampicilina.**

La preparación de este medio es idéntica a LB, sin embargo está adicionado con ampicilina (concentración de 100 µg/mL), para permitir sólo el crecimiento de las cepas que tengan resistencia a este antibiótico, la cual está dada por la inserción de un plásmido que confiere la resistencia.

### **A. Geles de agarosa al 0.8%.**

Los geles de agarosa son soportes rígidos con poros de gran tamaño, que permiten que el gel sea atravesado por moléculas grandes, cuyo radio hidrodinámico efectivo sea del orden de 3 a 10 nm, tales como ácidos nucleicos, lipoproteínas, o partículas virales. El tamaño de los poros depende inversamente de la concentración de agarosa; es posible formar geles útiles para electroforesis empleando cantidades de agarosa comprendidas

desde el 0.4% en peso hasta el 5%. En el trabajo se uso la concentración 0.8% usando como dispersante solución (1X) de Tris-Boratos 89 mM. La suspensión se calienta para disolver el polvo, se espera a que se enfríe un poco y se vierte a la cámara. Una vez que ha gelificado se coloca en la cámara electroforética.

Para 30 ml:

0.24 g de agarosa

30 ml de TBE 0.5X

- **Geles de acrilamida al 10%.**

El gel de acrilamida esta formado por dos partes, el gel inferior o separador y el superior o concentrador.

- *Para 10 ml de gel inferior:*

3.3 ml de agua

4 ml de acrilamida al 30%

2.5 ml de 1.5M Tris pH 8.0

100 µl SDS al 10%

100 µl de Persulfato de amonio al 10%

10 µl de TEMED

- *Para 3ml del gel superior:*

2.1 ml de agua

0.5 ml acrilamida al 30%

0.38 ml de 1.0M Tris pH 6.8

30 µl SDS al 10%

30 µl Persulfato de amonio al 10%

3 µl de TEMED

- **Solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, PH 7.5**

Para 100ml:

0.60 gr Tris base

Ajustar pH con HCl

- **Colorante Azul de Coomasie**

0.125 gr Coomasie blue R-250

200 ml Metanol

35 ml Ácido acético

- **Solución amortiguadora TBE.**

Es un amortiguador de pH eficaz para mantener condiciones levemente básicas, que mantiene al DNA desprotonado y soluble en agua. El EDTA es un quelante de cationes bivalentes, particularmente del magnesio ( $Mg^{2+}$ ). Puesto que estos iones son cofactores necesarios para muchas enzimas, incluyendo nucleasas contaminantes, el papel del EDTA es proteger los ácidos nucleicos contra la degradación enzimática.

Para preparar TBE a 10X se disuelven:

108 g de Tris base

55 g de ácido bórico

20 ml de EDTA 0.5 M (pH 8)

Se afora a 1 litro con agua destilada y posteriormente se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

- **Solución de EDTA.**

El ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA) es un quelante y es usado para bajar la concentración libre de iones  $Mg^{2+}$ . Por lo tanto, el EDTA inhibe nucleasas y minimiza la degradación de ácidos nucleicos durante su extracción y purificación.

Para preparar 250 ml de esta solución a 0.5 M se necesitan disolver 46.53 g de EDTA en agua y ajustar el pH a 8.

- **Solución de fenol-cloroformo.**

Para preparar 50 ml de esta solución se mezclan:

24 ml fenol

24 ml de cloroformo

2 ml de alcohol isoamílico

- **Soluciones I, II y III para extracción de DNA plasmídico (lisis alcalina).**

La alcalinización con NaOH en presencia de un detergente fuertemente aniónico (SDS), provoca la lisis celular, la desnaturalización del DNA cromosómico y de las proteínas, y la liberación de los plásmidos. Los plásmidos se ven menos afectados por su pequeño tamaño y estructura superenrollada.

- *Solución I para extracción de DNA plasmídico (lisis alcalina).*

Para preparar 100ml de esta solución:

50 mM de glucosa

25 mM Tris-Cl pH 8.0

10 mM EDTA pH 8.0

Se mezclan los componentes y se afora a un volumen final de 100 ml y posteriormente se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 10 libras de presión.

- *Solución II para extracción de DNA plasmídico.*

Forma de preparación:

0.2 N NaOH (diluído del stock 10 N)

1% SDS

Se prepara y usa al momento

- *Solución III para extracción de DNA plasmídico.*

Preparación:

Adicionar a 28.5 ml de H<sub>2</sub>O estéril los siguientes reactivos:

5M de acetato de potasio      60.0 ml

Acido acético glacial              11.5 ml

A continuación proceder a agitar suavemente hasta lograr la mezcla homogénea de los componentes.

- **Tris-glicina 10X pH= 8.8.**

Adicionar los siguientes reactivos a un volumen de agua y realizar la mezcla homogénea de los siguientes componentes:

Tris-glicina 10X pH= 8.8

60.55 gr de Tris 500 mM.

46.05 de glicina 500 mM.

A continuación proceder a verificar el pH y aforar a un litro.

- **Solución para desteñir geles de acrilamida (500 mL).**

Metanol            200 mL

Ácido acético    50 mL

Agua destilada   250mL



## 11. Referencias bibliográficas

- Baichoo N, y Helmann J.D. (2002) "Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur boxes consensus". J. Bacteriol 184: 5826-5832.
- Baltes N, Hennig-Pauka I, Gerlach G. (2002) "Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacilluspleuropneumoniae* serotype 7 infection FEMS" MicrobiolLett 209:283-7.
- Baltes N, Tonpitak W, Gerlach G.F, Hennig P, Horrmann A, Ganter M and Hermann R. (2001) "*Actinobacilluspleuropneumoniae* Iron Transport and Urease Activity: Effects on Bacterial Virulence and Host Immune Response". Infection and Immunity 69: 472-478.
- Blackall P, (1988) "Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*" Avian Dis. 32: 742-747.
- Blackall P, (1995). "Vaccines against infectious coryza" World's Poultry Science Journal 51: 17-26.
- Blackall P, (1999). "Infectious coriza: overview of the disease and new diagnostic options" ClinMicrob Rev. 12: 627-632.
- Blackall P, Matsumoto M, and Yamamoto R, (1997) "Infectious coryza". En: Diseases of Poultry. Calnek B., Barnes H., Beard C., McDougald L., Saif Y., (eds), 10<sup>th</sup> ed., Ames, Iowa. p. 179-190.

- Blackall P, Rogers D, and Yamamoto R. (1990) "Outer-membrane proteins of *Haemophilus paragallinarum*." Avian Dis. 34: 871-877.
- Bragg R, Coetzee L, and Verschoor J. (1997) "Effect of growth conditions and incubation times on the expression of antigens of *Haemophilus paragallinarum* which are detected by monoclonal antibodies" J. Vet. Res. 64: 57-63.
- Cornelissen C, (2003) "Transferrin-iron uptake by gram-negative bacteria" Frontiers in Bioscience 8: 836-847.
- De Lorenzo V, Herrero, M, Giovanni F, and Neillands J (1988) "Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolic-activation protein) modulate transcription of the *fur* gene in *Escherichia coli*" Eur. J. Biochem. 173: 537-546.
- Del Río M, (2004) "Proteínas de unión a transferrina y a sideróforos como sistemas de captación de hierro en *Haemophilus parasuis*. V Reunión del Grupo de Microbiología Molecular, Jaca.
- Del Río M, (2004) "Sistemas de captación de hierro en *Haemophilus parasuis*. Tesis Doctoral". Universidad de León
- Escolar L, Martí J, y de Lorenzo V (1999) "Opening the iron box: transcriptional Metalloregulation by Fur protein". J. Bacteriol. 181:6223-6229.
- Fernandez L, and Berngueria J (2000) "Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria." Microbiol. Res. 28: 303-312.

- Higgs P, Myers P, and Postle K (1998) "Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form heteromultimers". J Bacteriol 180: 6031–6038.
- Hofstan M, (1964) "Coriza infecciosa y enfermedad respiratoria crónica" En: Biester H, and Schawarte L, (eds) Enfermedad de las aves. México: Hispano Americana. 1ª ed. 320-324.
- Holt J, Kreing N, and Sneat P, and William S, (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.: Williams and Wilkins. 9ªed.
- Iritiani Y, and Hidaka S, (1976) "Enchancement of heagglutinig activity of *Haemophilus paragallinarum*hemagglutinin" Avian Dis. 20(3): 614-616.
- Iritiani Y, Iwaki S, and Yamaguchi T (1980) "properties of heat-stable antigen in the culture supernate of *Haemophilus paragallinarum*" Jpn. J. Vet. Sci. 42: 635-641.
- Iritiani Y, Katagiri K, and Arita H, (1980) "Purification and properties of *Haemophilus paragallinarum*hemagglutinin" Am J. Vet. Res. 41(12): 2114-2118.
- Kume K, Sawata A, and Nakase Y (1980) "Relationship between protective activity and antigen structure of *Haemophilus paragallinarum*serotypes 1 and 2" Am J. Vet. Res. 41(1): 97-100.
- Rosenshine I, Ruschkowki S, and Finlay B (1996) "Expression of attaching/effacing activity by enropathogenic Escherichia coli depends on growth phase, temperature and protein systhesis upon contact with epithelial cells" Infection and Immunity, 64 (3): 966-973.

- Sandoval V, Telzolo H, and Blackall P (1994) "Complicated infectious coryza outbreaks in Argentina" *Avian Dis* 38: 672-278
- Sawata A, Kume K, and Nakai T (1984) "Relationship between anticapsular antibody and protective activity of a capsular antigen of *Haemophilus paragallinarum*" *Jpn. J. Vet.Sci* 46 (4): 475-486.
- Sawata A, Kume K, and Nakase Y (1979) "Antigenic structure and relationship between serotypes 1 and 2 of *Haemophilus paragallinarum*" *Am. J. Vet. Res* 40(10): 1450-1453.
- SchyversA, and Stojiljkovic I. (1999) "Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*". *Mol. Microbiol.* 32: 1117-1123.
- Terzolo H, (2009). "Revisión sobre Coriza infecciosa: propuestas para de investigación para su diagnóstico y control". *Rev Med Vet.* 81:262-269.
- Tonpitak W, Thiede S, Oswald W, Baltes N, Gerlach G, (2000) "*Actinobacilluspleuropneumoniae* iron transport: a set of *exbBD* genes is transcriptionally linked to the *tbpB* gene and required for utilization of transferrin-bound iron". *Infect.*
- Yamamoto R (1980) "Infectious Coryza" In: S.B. Hitchner, C. Charles, D. H. Granham and J. E. Williamms (eds). *Insolation and identification of avian pathogens* 2da ed. American association of avian pathologists. Texas: 16-18.
- Zinsser H (1983) "Microbiología" Médica Panamericana. Buenos Aires: 511-516.