

# Evaluación de flagelinas de diversas especies bacterianas como inmunomoduladores en patologías del tracto respiratorio.

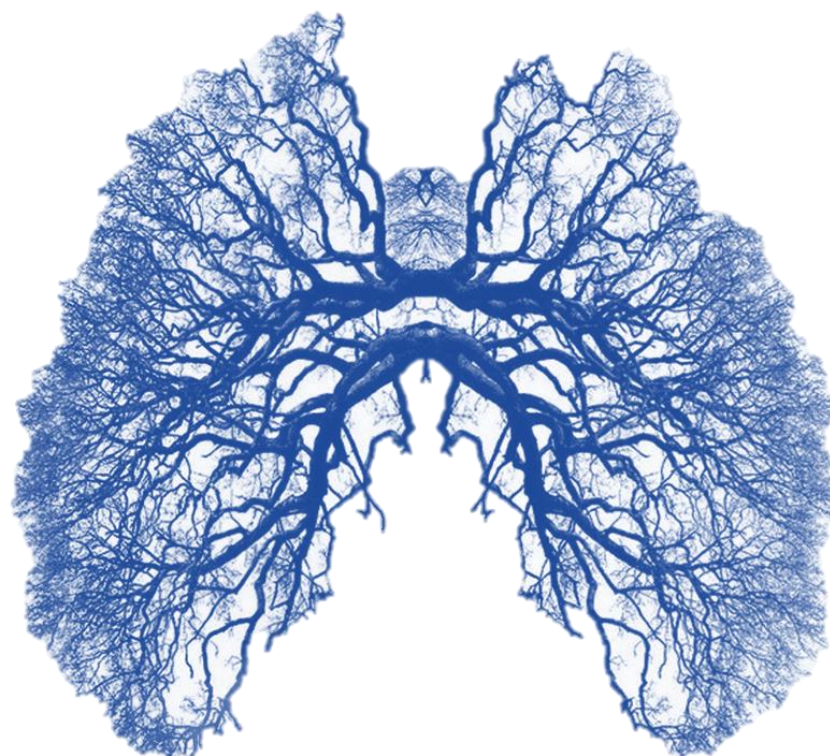
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA  
TESIS DE MAESTRÍA

Montevideo, Uruguay  
2017

Lic. Lucía Rodríguez

Orientador: Dr. Alejandro Chabalgoity.  
Co-Orientadora: Dra. Lucía Yim.



# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABREVIATURAS .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.1 AFECCIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO .....	3
1.2 INMUNOTERAPIA.....	5
1.3 FLAGELINA.....	12
1.4 ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO .....	15
1.5 FLAGELINA EN UN SISTEMA DE EXPRESIÓN CON ACTIVIDAD ENDOTÓXICA REDUCIDA. ....	17
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>21</b>
<b>2. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 OBTENCIÓN DE LAS FLAGELINAS DE ORIGEN GAMMAPROTEOBACTERIA. ....</b>	<b>22</b>
2.1.1 FLAGELINAS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> DE LOS SEROVARES DUBLIN Y ENTERITIDIS: .....	22
2.1.2 FLAGELINA DE <i>PROTEUS MIRABILIS</i> : .....	22
2.1.3 CUANTIFICACIÓN, PUREZA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FLAGELINAS: .....	23
<b>2.2 ESTIMULACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE EPITELIO PULMONAR HUMANO (A549) CON LAS FLAGELINAS.....</b>	<b>31</b>
2.2.1 LÍNEA A549 .....	31
2.2.2 RT-qPCR .....	31
<b>2.3 ESTUDIO DE LA PROTECCIÓN DE LAS FLAGELINAS EN UN MODELO DE INFECCIÓN RESPIRATORIO.....</b>	<b>34</b>
<b>2.4 BÚSQUEDA <i>IN SILICO</i> DE OTRAS FLAGELINAS Y SCREENING DE ESTIMULACIÓN PRIMARIO.....</b>	<b>35</b>
2.4.1 VARIABILIDAD DE LAS FLAGELINAS EN LA REGIÓN DE RECONOCIMIENTO AL TLR5. ....	35
2.4.2 SCREENING DE LAS FLAGELINAS EN UNA LÍNEA CELULAR REPORTERA PARA TLR5. ....	36

<i>Obtención de los extractos inactivados de las bacterias seleccionadas in silico</i> .....	36
<i>Clonaje de fliC de Herbaspirillum seropedicae en dos vectores: pET14b y pGEX-4T1</i> .....	23
<i>Estimulación de la línea celular HEK-Blue hTLR5/mTLR5 con las bacterias inactivadas y las flagelinas purificadas</i> .....	33
2.4.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROINFLAMATORIA <i>IN VIVO</i> DE LAS FLAGELINAS SELECCIONADAS A NIVEL PULMONAR. .....	37
<b>2.5 CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE <i>E. COLI</i> CON ACTIVIDAD ENDOTÓXICA REDUCIDA</b> .....	<b>39</b>
2.5.1 INACTIVACIÓN DEL GEN <i>MSBB</i> POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.....	39
2.5.2 CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES DH5A .....	41
2.5.3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DH5A CON EL PLÁSMIDO PKD46 .....	42
2.5.4 CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DH5A-PKD46 .....	42
2.5.5 ELECTROTRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DH5A CON EL PRODUCTO DE PCR (CASSETTE EXTENDIDO DE CLORANFENICOL). .....	43
2.5.6 VERIFICACIÓN DE LA INSERCIÓN DEL CASSETTE EXTENDIDO.....	43
2.5.7 TRANSDUCCIÓN DE LA CEPA DH5A $\Delta$ <i>MSBB</i> A LA CEPA MC1061 CON EL FAGO P1.....	44
2.5.8 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA DE LA CEPA $\Delta$ <i>MSBB</i> <i>IN VITRO</i> . .....	45
<i>Línea THP-1</i> .....	45
<i>Línea HEK-blue mTLR4</i> .....	46
2.5.9 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN LA CEPA MC1061 $\Delta$ <i>MSBB</i> . .....	47
<b>2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>48</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1 ESTUDIO COMPARATIVO DE DISTINTAS FLAGELINAS DE ORIGEN GAMMAPROTEOBACTERIA</b> .....	<b>49</b>
3.1.1 OBTENCIÓN DE FLAGELINAS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> (SEROVARES DUBLIN Y ENTERITIDIS) Y <i>PROTEUS MIRABILIS</i> . .....	49
3.1.2 CAPACIDAD ESTIMULADORA DE LAS FLAGELINAS EN LA LÍNEA EPITELIAL HUMANA A549. ....	51
3.1.3 CAPACIDAD DE LAS FLAGELINAS DE CONFERIR PROTECCIÓN EN UN MODELO DE INFECCIÓN PULMONAR. ....	52
<b>3.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE FLAGELINAS DE OTRAS ESPECIES BACTERIANAS</b> .....	<b>54</b>

3.2.1 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE FLAGELINAS DE OTRAS ESPECIES BACTERIANAS. ....	54
3.2.2 CRECIMIENTO DE <i>HERBASPIRILLUM</i> , <i>RALSTONIA</i> , <i>MESORHIZOBIUM</i> Y <i>DELFTIA</i> Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD ESTIMULADORA DE UNA LÍNEA REPORTERA PARA TLR5.....	56
3.2.3 OBTENCIÓN DE LA FLAGELINA <i>H.SEROPEDICAE</i> (BETAPROTEOBACTERIA) .....	59
3.2.4 CAPACIDAD ESTIMULADORA DE LA FLAGELINA DE <i>H.SEROPEDICAE</i> EN LA LÍNEA REPORTERA PARA TLR5 Y EN LA LÍNEA A549.....	62
3.2.5 CAPACIDAD DE FLAGELINA DE <i>H.SEROPEDICAE</i> DE CONFERIR PROTECCIÓN EN UN MODELO DE INFECCIÓN PULMONAR .....	64
3.2.6 CURVA DE DOSIS RESPUESTA DE LA FLAGELINA DE <i>H.SEROPEDICAE</i> EN LAS LÍNEAS REPORTERAS PARA TLR5 HUMANA Y MURINA.....	68
<b>3.3 CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN EN <i>E. COLI</i> CON ACTIVIDAD ENDOTÓXICA REDUCIDA.....</b>	<b>70</b>
3.3.1 INACTIVACIÓN DEL GEN <i>MSBB</i> POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.....	70
3.3.2 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA DE LA CEPA $\Delta$ <i>MSBB</i> <i>IN VITRO</i> . ....	71
3.3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN LA CEPA $\Delta$ <i>MSBB</i> .....	74
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1 ESTUDIO COMPARATIVO DE DISTINTAS FLAGELINAS DE ORIGEN GAMMAPROTEOBACTERIA.....</b>	<b>76</b>
<b>4.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE FLAGELINAS DE ESPECIES BACTERIANAS PERTENECIENTES A LAS CLASES A Y B-PROTEOBACTERIA. ....</b>	<b>80</b>
<b>4.3 CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN EN <i>E. COLI</i> CON ACTIVIDAD ENDOTÓXICA REDUCIDA .....</b>	<b>88</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>90</b>
<b>5.1 ESTUDIO COMPARATIVO DE DISTINTAS FLAGELINAS DE ORIGEN GAMMAPROTEOBACTERIA.....</b>	<b>90</b>
<b>5.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE FLAGELINAS DE ESPECIES BACTERIANAS PERTENECIENTES A LAS CLASES A Y B-PROTEOBACTERIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>5.3 CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN CON ACTIVIDAD ENDOTÓXICA REDUCIDA. ....</b>	<b>93</b>

<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>94</b>
---------------------------	-----------

## RESUMEN

Las patologías del tracto respiratorio son causas centrales de morbi-mortalidad a nivel mundial. La base de buena parte de estas patologías es de origen infeccioso y de la respuesta inmune que estos patógenos inducen en el tracto respiratorio. En la continua búsqueda de agentes seguros y efectivos frente a la emergencia y reemergencia de agentes infecciosos en dichas patologías, surge la inmunomodulación como terapia alternativa, para complementar a las tradicionales. En este sentido el estudio de flagelina, componente principal del flagelo bacteriano, ha adquirido un gran interés como inmunomodulador. La mayoría de los trabajos han sido realizados con la flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, la cual ha sido propuesta tanto como adyuvante de antígenos vacunales así como activador de entornos proinflamatorios con actividad protectora frente a patógenos respiratorios. La flagelina (FliC) es el ligando del receptor TLR5 a nivel extracelular y puede ser sensada también a nivel intracelular por el complejo Naip5-NLRC4, induciendo una fuerte inmunidad innata. Sin embargo, las flagelinas procedentes de diversas especies bacterianas pueden generar respuestas marcadamente diferentes, desde aquellas que desencadenan una fuerte actividad proinflamatoria, como es el caso de la flagelina de *S. Typhimurium*, hasta otras flagelinas como la de *Campylobacter jejuni* que carecen de capacidad para ser sensadas por TLR5. En este contexto, en el presente proyecto se planteó realizar una evaluación comparativa de la respuesta inmune inducida por distintas flagelinas con diferentes aproximaciones experimentales tanto *in vitro* como en un modelo murino de neumonía, utilizando FliC de *S. Typhimurium* como referencia. El resultado más llamativo se observó con la flagelina de *Herbaspirillum seropedicae*, que a pesar de ser sensada por TLR5 en modelos *in vitro*, no generó a nivel pulmonar un entorno proinflamatorio al ser administrada intranasalmente en ratones, y no fue capaz de proteger en el modelo murino de infección por *Streptococcus pneumoniae*. Este resultado resalta la idea de que FliC es capaz de generar diferentes respuestas dependiendo de la especie bacteriana, a pesar de presentar los aminoácidos claves para su reconocimiento por parte del receptor TLR5. A su vez, la posibilidad de que flagelinas de otras especies generen respuestas proinflamatorias menos intensas que la flagelina de *S. Typhimurium*, permitiría explorar en mayor profundidad aplicaciones alternativas en patologías respiratorias donde se den procesos inflamatorios crónicos y/o exacerbados, como por ejemplo en el caso de las alergias y el asma.

## ABREVIATURAS

FliC ST: Flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

FliC SD: Flagelina de *Salmonella enterica* serovar Dublin

FliC SE: Flagelina de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

FliC Pm: Flagelina de *Proteus mirabilis*

FliC Hs: Flagelina de *Herbaspirillum seropedicae*

Sp1: *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1

NF- $\kappa$ B: del inglés, *Nuclear Factor Kappa B*

NLR: del inglés, *Nod Like Receptor*

NLRC4: del inglés, *NLR Family, CARD domain containing*

TLR: del inglés, *Toll like receptor*

TNF- $\alpha$ : del inglés, *Tumoral Necrosis Factor alpha*

TGF- $\beta$ : del inglés, *Transforming Growth Factor beta*

IL: Interleuquina

Lcn2: Lipocalina-2, péptido antimicrobiano

Naip5: del inglés, *NLR Family apoptosis-inhibitory protein 5*

A20: regulador del factor de transcripción NF- $\kappa$ B

Ccl/Cxcl: quimioquinas

CBLB502: Flagelina de S.Dublin sin la región hipervariable

S100A9: del inglés, *S100 calcium-binding protein A9*

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

Foxp3: del inglés, *forkheadbox P3*. Factor regulador de las células T

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Afecciones del tracto respiratorio

Las enfermedades del tracto respiratorio representan una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad con alto impacto socioeconómico. Dentro de las enfermedades respiratorias más importantes se encuentran:

Asma: inflamación crónica de las vías aéreas, exacerbada por alergias, infecciones y contaminación ambiental. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que hay 235 millones de personas que padecen asma. El tratamiento dependerá del grado y persistencia del asma pero los más usados son los antiinflamatorios (glucocorticoides, cromonas y antileucotrienos) y/o los broncodilatadores (simpaticomiméticos  $\beta_2$ , teofilinas y antimuscarínicos) [1].

EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica): se produce una limitación del flujo aéreo que no revierte completamente, y se encuentra asociada principalmente al tabaquismo y a la contaminación ambiental [2]. Las exacerbaciones en EPOC (E-EPOC) son episodios inflamatorios agudos que se dan sobre el proceso inflamatorio crónico característico de EPOC, que pueden trascender al resto del organismo y dar lugar a un compromiso sistémico. Las E-EPOC resultan de interacciones complejas entre el huésped, bacterias, virus y la contaminación ambiental, incluido el humo de tabaco. Según la Organización mundial de la Salud, el EPOC está dentro de la tercer causa de muerte a nivel mundial (3.2 millones de muertes en 2015) [3]. Dentro de cinco ciudades latinoamericanas, Montevideo registró las mayores tasas de prevalencia de EPOC. De las causas reconocibles, las infecciones respiratorias pueden representar hasta el 80%, incluyendo bacterias, virus respiratorios y organismos atípicos. Si bien los porcentajes



pueden variar con los distintos países y contextos considerados, las bacterias más frecuentemente aisladas en las E-EPOC son: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa* [4-5].

Cáncer pulmonar: es la segunda causa de muerte en Estados Unidos según la CDC (Center for Disease Control and Prevention), tiene capacidad de desarrollarse en cualquier sector del pulmón y es de difícil detección. Según LungCancer.Org la mutación en el ADN puede ser causada por tabaquismo, envejecimiento y/o inhalación de gases ambientales.

Fibrosis quística: es una enfermedad genética respiratoria, causada por defecto del gen CTFR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística), que provoca un moco espeso y pegajoso lo que ocasiona susceptibilidad a infecciones tanto virales como bacterianas a nivel del tracto respiratorio.

Neumonía: es una infección respiratoria aguda de los sacos alveolares causada por bacterias (principalmente *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*), virus (virus sincicial respiratorio, rinovirus, influenza) y/o hongos. La neumonía tiende a ser más grave en niños menores de cinco años, los adultos mayores de 65 años, las personas con ciertas afecciones como la insuficiencia cardíaca, diabetes, EPOC y/o personas inmunodeprimidas por VIH/SIDA, quimioterapia e intervenciones quirúrgicas [6]. La neumonía representó el 16 % de las casusas de muerte en niños menores a 5 años, según registros de la OMS en 2015.

En general todas las afecciones respiratorias descritas son prevenible y tratables. Sin embargo, la recurrencia de infecciones respiratorias está más presente en estos tipos de condiciones crónicas, en donde se da un desequilibrio constante en la microbiota pulmonar ya sea por el uso de los antibióticos, los corticoides, la respuesta del hospedero, factores ambientales y/o hábitos alimenticios; y de esta forma este microambiente

complejo y dinámico que se genera puede contribuir favorablemente a las infecciones recurrentes de origen bacteriano y/o viral.

## 1.2 Inmunoterapia

En la continua búsqueda de agentes seguros y efectivos para la prevención y tratamiento de las enfermedades del tracto respiratorio, surge la necesidad de terapias alternativas que complementen a las tradicionales frente a la emergencia y reemergencia de agentes infecciosos, y especialmente en el contexto del incremento y la dispersión alarmante de patógenos resistentes a los antibióticos [7]. A su vez, en estos tipos de patologías muchas veces se dificulta conocer a priori el agente etiológico causal y por lo tanto el tratamiento a llevar a cabo [8]. En este sentido la administración de compuestos con capacidad de modular la respuesta inmunitaria del hospedero es una estrategia que está recibiendo gran atención como terapia complementaria [9],[10]. El objetivo de una terapia inmunomoduladora es regular la intensidad y/o el perfil de la respuesta inmunológica desencadenada, buscando aumentarla en aquellos casos en que se encuentra disminuida por alguna causa particular (inmunosupresión, estrés, infecciones crónicas), mientras que en otros casos se trata de disminuir dicha respuesta cuando se encuentra exacerbada (enfermedades autoinmunes, alergias, trasplantes, hipersensibilidad) [7]. Cabe mencionar la importancia de encontrar el equilibrio adecuado en este tipo de terapias en donde se busca generar una respuesta inmune efectiva y eliminar la infección, generando una inflamación limitada, y que no produzca mayor daño en los tejidos ya causado por la propia infección [11].

Los inmunomoduladores incluyen sustancias biológicas y/o compuestos químicamente definidos; su principal potencial radica en su modo de acción, que es estimular a los

efectores inmunológicos del hospedero, a diferencia de la acción microbicida directa de antibióticos, antivirales y antifúngicos conocidos, que a la larga se ha demostrado que generan resistencia.

Los receptores de la respuesta inmune innata, receptores tipo toll (TLR) y receptores tipo NOD (NLRs) son blancos particularmente relevantes en la búsqueda de nuevos inmunomoduladores que actúen como agonistas/antagonistas de los mismos. La modulación de la respuesta inmunitaria a través de estos receptores no específicos de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) provoca una protección de amplio espectro de microorganismos, permitiendo su uso profiláctico en individuos de mayor riesgo y un tratamiento temprano ante la falta de conocimiento a priori del agente infeccioso [12] [13].

La familia de receptores TLR son glicoproteínas transmembrana compuestas por un dominio de reconocimiento de PAMPs (que contiene motivos LRR, del inglés “*Leucine Rich Repeats*”) y otro dominio TIR que desencadena las vías de señalización por las cuales los receptores afectan la actividad celular en presencia de sus ligandos, (Figura 1). En la actualidad se han descrito 10 en humanos (TLR1-10) y 12 en ratones (TLR1-9 y TLR11-13). Algunos de estos receptores reconocen motivos de patógenos a nivel extracelular, como es el caso de TLR4 que interacciona con el lipopolisacárido (LPS) de la pared bacteriana. El TLR2 en complejo con el TLR1 o TLR6 es capaz de reconocer el ácido lipoteicoico y el TLR5 a la flagelina, ambos componentes bacterianos. A nivel endosomal, el TLR3 reconoce cadenas dobles de ARN, el TLR7 y TLR8 interaccionan con cadenas simples de ARN, y el TLR9 reconoce oligonucleótido de ADN CpG no metilado [14], [15].

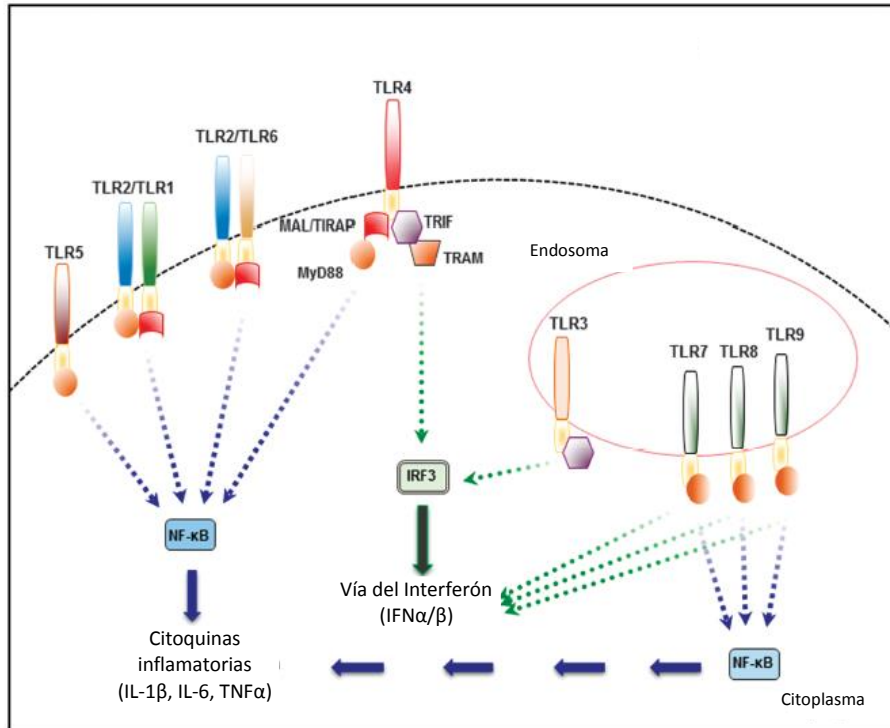


Figura 1. Esquema general de las vías de señalización desencadenadas por los receptores tipo toll. Versión adaptada de Dowling *et.al* [13].

Existen varios ejemplos de inmunomoduladores de TLRs que han avanzado hacia su aplicación clínica, ver Tabla 1. El MPLA (monofosfolípido A) como agonista de TLR4 es utilizado para rinitis alérgica estacional y el AS04 (combinación de MPLA con aluminio) como adyuvante en melanoma, papiloma y hepatitis [16]–[19]. También el NI-0101 como anticuerpo anti-TLR4 para la artritis reumatoidea [20]. Al igual que el compuesto Pam3Cys unido a OspA de *Borrelia burgdorferi* que es utilizado como adyuvante en la enfermedad de Lyme, y componentes de *Mycobacterium bovis* BCG como agonistas de TLR2 en modelos antitumorales [21]–[24]. Los ADNs de simple cadena sintéticos (polyICLC /poly I:C12U) ligandos para TLR3 se utilizan como adyuvantes en las formulaciones para vacunas contra el virus Influenza [25]. Además el compuesto CpG-7909, oligonucleótido sintético agonista de TLR9 ha sido evaluado en inmunoterapias para diferentes tipos de cáncer [26]. Por otro lado, el compuesto comercial Broncho-Vaxom (OM-85) es un lisado de un conjunto de cepas bacterianas,

que actúa como inmunoestimulante de varios TLRs, y es utilizado para el tratamiento de infecciones recurrentes del tracto respiratorio [27].

Tabla 1- Ejemplos de aplicación de inmunomoduladores de los receptores tipo toll en distintas patologías.

TLR	Aplicación clínica	Mecanismo de acción	Compuesto	Nombre comercial (Compañía)	Ref.
TLR4	Rinitis alérgica estacional	Agonista	MPLA	Pollinex Quattro (Allergy therapeutics)	[16]
	HBV	Adyuvante	AS04 y antígeno de HBV	FENDrix (GlaxoSmithKline)	[17]
	Melanoma	Adyuvante	AS04 y productos de pared celular de <i>Mycobacterium phlei</i>	Enhanzyn	[18]
	HPV	Adyuvante	AS04	Cervarix	[19]
	Influenza, RSV, Malaria	Adyuvante	E6020	E6020 (Eisai Pharmaceuticals)	[20]
	Artritis reumatoidea	Anticuerpo	NI-0101	NI-0101 (Novimmune)	[21]
TLR2	Enfermedad de Lyme	Adyuvante	Pam3Cys unido a OspA de <i>Borrelia burgdorferi</i>	LYMERix	[22]
	HBV	Adyuvante	Ácido palmítico conjugado a antígeno de HBV	Theradigm-HBV	[23]
	Cáncer/modelos antitumoral	Agonista	Componentes de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG Tokyo	SMP105 (Dainippon Sumitomo Pharma)	[24]
TLR3	Influenza	Adyuvante	polyI:CLC /poly I:C12U (Ampligen)	FluMist	[25]
TLR9	Melanoma y cáncer de pulmón a pequeñas células	Adyuvante	CpG 7909	ProMune/Energix	[26]
Varios TLRs	Infecciones respiratorias recurrentes, E-EPOC.	Agonista	OM-85 (Lisado bacteriano)	OM Pharma	[27]

**Abreviaturas:** MPLA, Monofosfolípido A; AS04, *Adjuvant System 04* es una combinación de hidróxido de aluminio con MPLA; E6020, *lipid A mimetic*; NI-0101, anticuerpo monoclonal anti-TLR4; Pam3Cys *triacylated lipoprotein*; OspA, epítoto C terminal *outer surface protein A* de *Borrelia burgdorferi*; HBV, virus de la hepatitis B; polyI:CLC /poly I:C12U, *dsRNA polyriboinosinic-polyribocytidylic acid* ligando sintético de TLR3; CpG 7909, oligonucleótido sintético como ligando de TLR9.

Una molécula agonista de TLR que ha recibido particular atención por sus propiedades activadoras de respuesta inmune es la flagelina, componente estructural del flagelo bacteriano, que ha sido evaluada extensamente como inmunoestimulante, adyuvante y carrier de vacunas [28]–[32]. En estudios clínicos la flagelina de *S.Typhimurium* ha sido utilizada como adyuvante fusionada a la proteína de matriz M2e del virus influenza (VAX102), induciendo altos niveles de anticuerpo anti-M2e con bajas dosis de administración del compuesto VAX102. Asimismo el compuesto VAX125 (flagelina de

Tabla 2. Avances clínicos para la aplicación de flagelina como inmunomoduladora.

Aplicación clínica	Mecanismo de acción	Compuesto	Nombre comercial (Compañía)	Fase clínica	Ref.
Isquemia miocardio/ lesión reperfusión	Adyuvante	CBLB502 (flagelina de <i>S.Dublin</i> modificada)	Entolimod (Cleveland BioLabs)	Fase I	[28]
Influenza	Adyuvante	Proteína de la matriz M2e del virus influenza unida a flagelina de <i>S.Typhimurium</i>	VAX102 (VaxInnate)	Fase II	[29]
Influenza	Adyuvante	Hemaglutinina H1 de Influenza unida a flagelina de <i>S.Typhimurium</i>	VAX125 (VaxInnate)	Fase II	[30]
Radioprotector	Inmuno estimulante	CBLB502		Pre-clínico	[31][32]
Cáncer	Inmuno estimulante	CBLB502		Pre-clínico	[31][32].

*S.Typhimurium* unida a la hemaglutinina H1 del virus influenza) se evaluó en personas mayores de 65 años, donde la respuesta inmune de por si es menor, y de todas formas se obtuvieron niveles altos de anticuerpo [29], [30].

Por otro lado, el compuesto CBLB502 (flagelina recombinante de *S.Dublin* sin la región hipervariable), presentó una fuerte actividad radioprotectora en modelos murinos y en

Macaco Rhesus por vía intravenosa, muscular y subcutánea; además de ser menos tóxico e inmunogénico en comparación con la flagelina nativa. Dentro de los mecanismos que explicarían dicho efecto protector, todos están mediados por la activación de la vía NF- $\kappa$ B que genera la producción de proteínas para la supresión de la apoptosis (IAPs, proteínas inhibidoras de la apoptosis y Bcl2, *B-cell lymphoma 2* regulador de la apoptosis), así como la disminución de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) a través de las proteínas superóxido dismutasa y ferritina, y la regeneración de los tejidos por la presencia de citoquinas como KGF (factor de crecimiento de keratinocitos) y G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) [31]. El CBLB502 también ha sido evaluado en un modelo murino de insuficiencia renal aguda de origen isquémico. La administración de CBLB502 previo a la isquemia e inmediatamente posterior a la reperfusión, generó un menor daño renal como resultado de una menor infiltración de neutrófilos durante la reperfusión y una disminución de la creatinina en suero (marcador de diagnóstico de disfunción renal)[28].

Además se encuentran otros trabajos en fase pre-clínica, que destacan el uso de CBLB502 (llamado comercialmente Entolimod) para aplicar en inmunoterapias dirigidas contra el cáncer. En particular, una única administración subcutánea de CBLB502 en modelos murinos de metástasis de hígado, desencadena una actividad antitumoral eficiente junto con una inmunidad de memoria antitumoral. El mecanismo propuesto es que el Entolimod activa las vías NF- $\kappa$ B, AP-1 y STAT3 específicamente dentro del hígado, induciendo una rápida expresión de las citoquinas CXCL9 y CXCL10 que permiten retener a las células Natural Killer dentro del hígado y éstas provocan la activación de las células dendríticas, que finalmente estimularán a los linfocitos CD8+ para que generen la respuesta y memoria antitumoral [33], [34], ver Tabla 2.



### 1.3 Flagelina

El flagelo, responsable de la motilidad bacteriana, es un factor de virulencia central de muchas bacterias patógenas por su rol en el movimiento, adhesión e invasión en la mucosa del hospedero, y en muchos casos como estructura para la secreción de otros factores de virulencia [35], [36].

El filamento flagelar está compuesto principalmente por más de 20000 subunidades de flagelina, una proteína de tamaño variable según la especie bacteriana entre 28-80 KDa [37]. Estudios iniciales demostraron que la flagelina monomérica es el ligando natural de TLR5, localizado en la membrana celular de células epiteliales e inmunes y como tal cumple un rol central en la inducción de la respuesta inmune innata frente a bacterias flageladas presentes en el medio extracelular [38]. El receptor TLR5 requiere de la molécula adaptadora MyD88 para transferir el estímulo hacia la cascada de señalización intracelular, allí se activan los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y MAPK, y estos activan la transcripción de genes involucrados en respuestas inflamatorias [35][39].

En monocitos y macrófagos, el reconocimiento de flagelina por TLR5 activa la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL6 y compuestos bactericidas como el óxido nítrico. En células epiteliales la flagelina estimula la producción de las quimioquinas CCL20 e IL8 (CXCL1 y CXCL2 homólogos en ratón), esenciales para el reclutamiento de neutrófilos y células dendríticas inmaduras al sitio de infección, así como también la producción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que tiene un importante efecto microbicida al igual que los péptidos antimicrobianos (Lcn2 y S100a9) secretados por las células epiteliales [40]–[45].

Flagelina también puede ser sensada a nivel citosólico por el receptor Naip5 y junto con el receptor NLRC4 forman el inflamasoma para activar la Caspasa-1, que con su actividad proteolítica produce la forma activa de las citoquinas IL1 $\beta$  e IL18. Este proceso desencadena una inflamación local y sistémica y hasta puede desencadenar la muerte celular (piroptosis) [46], [47]. Además, IL18 actúa en forma sinérgica con IL12 para promover la secreción de IFN $\gamma$  en los linfocitos Th1, requerido para la activación de células Natural Killer (NK) [48].

A nivel estructural, la flagelina está compuesta por dos dominios conservados en los extremos N- y C-terminal (D0 y D1) y un dominio central hipervariable (regiones D2 y D3). El dominio central está implicado en el reconocimiento antigénico del flagelo mientras que los dominios conservados son esenciales para su polimerización durante el ensamblaje del flagelo y la movilidad bacteriana, además de contener el sitio de reconocimiento por TLR5. Específicamente, se ha demostrado que los residuos 89-96 de la región D1 de la flagelina son esenciales para la actividad agonista de TLR5; y que el receptor citosólico Naip5 reconoce los últimos 35 aminoácidos del extremo C-terminal de la región D0 de la flagelina, [49]–[51] (Figuras 2 y 3).

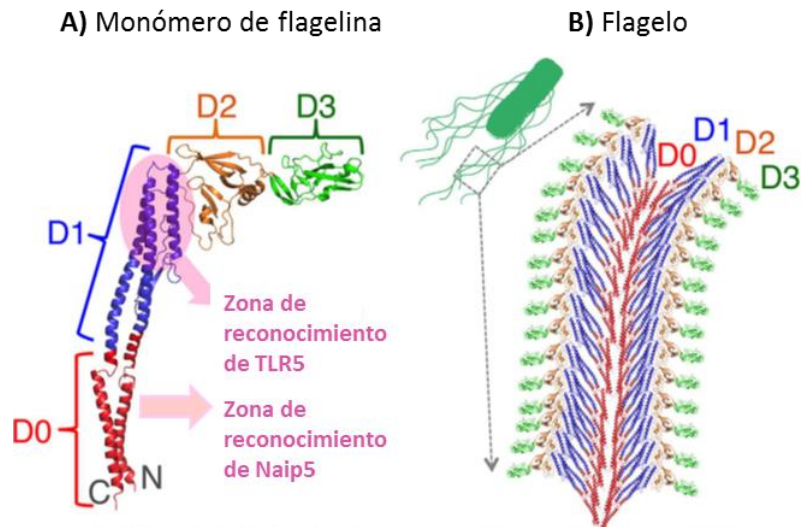


Figura 2- Representación esquemática de la flagelina de *S. Typhimurium*. **A)** Monómero de flagelina con las regiones conservadas N- y C-terminal. D0, reconocimiento de Naip5 y D1 reconocimiento de TLR5. **B)** Flagelo, disposición de los dominios de la flagelina. D2 y D3 expuestos al medio extracelular; D0 y D1 hacia el interior del flagelo. Versión adaptada de Lu y Swartz, 2016 [108].

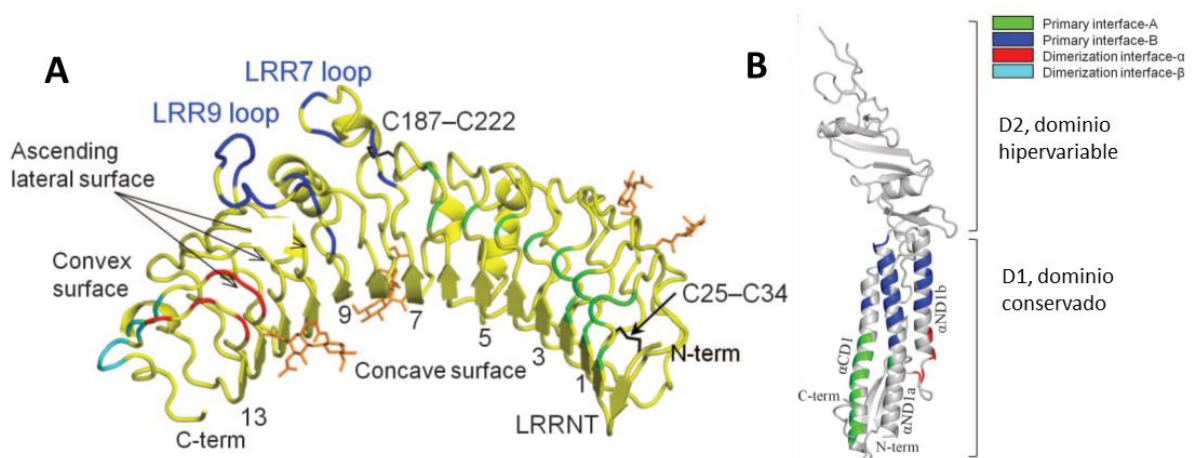


Figura 3- **A)** Estructura de TLR5, cada color representa una región de interacción con la flagelina. **B)** Estructura de la flagelina de *S. Dublin* (D2, dominio hipervariable y D1, dominio conservado). El dominio D1 consiste en cuatro segmentos, dos  $\alpha$ -hélices N-terminal ( $\alpha$ ND1a y  $\alpha$ ND1b), una  $\alpha$ -hélice C-terminal ( $\alpha$ CD1) y un segmento de hoja  $\beta$ . *Primary interface A* (verde): interacción de la hélice  $\alpha$ CD1 con la región ascendente del repetido de Leucina del TLR5 (LRRNT-LRR6); *Primary interface B* (azul): interacción del segmento superior de las hélices  $\alpha$ ND1a y  $\alpha$ ND1b con la región ascendente del repetido de Leucina del TLR5 (LRR7-LRR10), LRR9 es el loop mas conservado debido a que interacciona con los aminoácidos claves de la flagelina para su reconocimiento. *Dimerization interfase  $\alpha$*  (rojo): interacción del segmento convexo del LRR12/13 del otro monómero de TLR5, con la hélice- $\alpha$ ND1b de la flagelina. *Dimerization interfase  $\beta$*  (celeste) interacción entre los monómeros de TLR5 por residuos hidrofóbicos del loop LRR12/13. Versión adaptada de Soon *et al.*, 2012 [51].

La actividad inductora de fuertes respuestas inmunes innatas ha llevado a considerar a la flagelina como una molécula con grandes propiedades inmunoestimulantes. La mayoría de estos trabajos han sido realizados con la flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (FliC ST), para la cual se ha estudiado su potencial tanto como adyuvante de antígenos vacunales así como activadora de entornos proinflamatorios con actividad protectora frente a otros patógenos [52]–[58].

Sin embargo, flagelinas de diferentes especies bacterianas poseen variaciones importantes, tanto a nivel de secuencia aminoacídica como de su capacidad de activar respuestas proinflamatorias. Estudios comparativos han demostrado que la región 89-96 de la secuencia, se desvía de la consenso descrita como ligando para TLR5 en bacterias pertenecientes a las clases  $\alpha$  y  $\epsilon$ -Proteobacteria, tales como *Helicobacter pylori* o *Campylobacter jejuni*, resultando en una pérdida de la capacidad de ser sensada por TLR5 [59].

## 1.4 Antecedentes del grupo de trabajo

En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que el tratamiento con 1  $\mu$ g de flagelina de *S. Typhimurium* por vía intranasal en el modelo murino induce protección frente a infección por *Streptococcus pneumoniae* a través de la potenciación de la respuesta proinflamatoria [57]. En dicho trabajo se demuestra que, la protección inducida por flagelina esta mediada por neutrófilos que son reclutados al pulmón por aumento de la expresión de genes proinflamatorios (*IL6*, *Tnfa*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl20*). Cabe destacar, que luego del proceso proinflamatorio y de la disminución de la carga bacteriana en el pulmón, se indujo una rápida restauración de los tejidos. Esta propiedad de autolimitación

de la respuesta proinflamatoria es relevante al momento de evaluar inmunomoduladores efectivos.

Por otra parte, ha sido reportado que la administración intranasal de 7 µg de flagelina de *Proteus mirabilis*, otra enterobacteria, sola o co-administrada con un antígeno fimbrial, no fue capaz de generar protección en un modelo de infección del tracto urinario. Sin embargo, se produjeron niveles altos de IL10 (citoquina antiinflamatoria) en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos, obtenidos 7 días luego de la última inmunización con la flagelina, y estimulados *in vitro* con flagelina [60].

La inmensa mayoría de los trabajos han sido realizados con la flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, un serotipo altamente prevalente a nivel mundial causante de la salmonelosis humana [61]. Sin embargo, existen otros serovares pertenecientes a la especie *Salmonella enterica* tales como *S. Enteritidis* que presenta un índice de invasividad similar a Typhimurium y otros tales como *S. Dublin*, que es mucho menos prevalente pero se asocia a índices de invasividad mucho más elevados [62]–[64]. Dado que la flagelina es un determinante molecular asociado a la patogenicidad en *Salmonella*, surge la pregunta de si estas diferencias observadas en los índices de invasividad pueden ser en parte producto de la flagelina, la cual es clave en el reconocimiento y el desencadenamiento de las distintas respuestas inmunológicas generadas.

Por los antecedentes mencionados, consideramos interesante evaluar si las flagelinas de distintos serovares de *Salmonella* como Dublin y Enteritidis o flagelinas de otras especies bacterianas como *Proteus mirabilis* u otras, puedan jugar diferentes roles en cuanto a su capacidad inmunomoduladora y su uso potencial para el desarrollo de futuras inmunoterapias dirigidas a afecciones del tracto respiratorio.

## 1.5 Flagelina en un sistema de expresión con actividad endotóxica reducida.

En paralelo al estudio de las flagelinas como inmunomoduladores también surgió el interés, dentro de este trabajo, por la construcción una cepa bacteriana con actividad endotóxica reducida. Dicha cepa será de gran utilidad ya sea en la producción de flagelinas y/o futuras proteínas heterólogas con aplicaciones biotecnológicas.

En la industria biofarmacéutica se producen más de 220 biofármacos y un tercio de ellos son proteínas recombinantes de uso terapéutico, de las cuales la mitad se producen en el sistema de expresión de *Escherichia coli* [65], [66] . Este sistema sigue siendo elegido por lo simple y rápido de cultivar, además de que se encuentra completamente caracterizado a nivel genético, y produce buenos rendimientos de proteína recombinante a costos industriales relativamente bajos [67].

*E.coli* es una bacteria gram negativa y por tanto presenta en la membrana externa el lipopolisacárido (LPS), el cual es capaz de unirse al receptor TLR4 en las células del sistema inmune y desencadenar, vía la activación del NF- $\kappa$ B, la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 $\alpha$ . La exacerbación de una respuesta como consecuencia de la presencia del LPS puede generar un shock séptico; esto es un aspecto importante que se debe tener en cuenta al momento de producir una proteína de uso terapéutico para la salud humana.

Se han desarrollado varios métodos para eliminar la presencia de LPS como la ultracentrifugación, separación de fase con Tritón X, cromatografía de intercambio aniónico, adsorción con carbono activado, o tratamiento con resinas de afinidad a polymixina B o histamina; sin embargo ninguno de ellos es completamente efectivo y la

mayoría son costosos a nivel industrial. También hay que tener en cuenta que el tipo de tratamiento dependerá de las propiedades de la proteína recombinante, ya que es fundamental preservar su integridad, además de eliminar el LPS [68], [69].

El LPS se compone de un núcleo de oligosacáridos unidos entre sí por el azúcar ácido 2-keto-3-deoxioctanato (KDO), el antígeno O que varía en composición y en el número de azúcares dependiendo de la especie bacteriana, y el lípido A o endotoxina que es el responsable de la toxicidad por la capacidad que tiene de inducir fuertes respuestas pro inflamatorias (Figura 4).

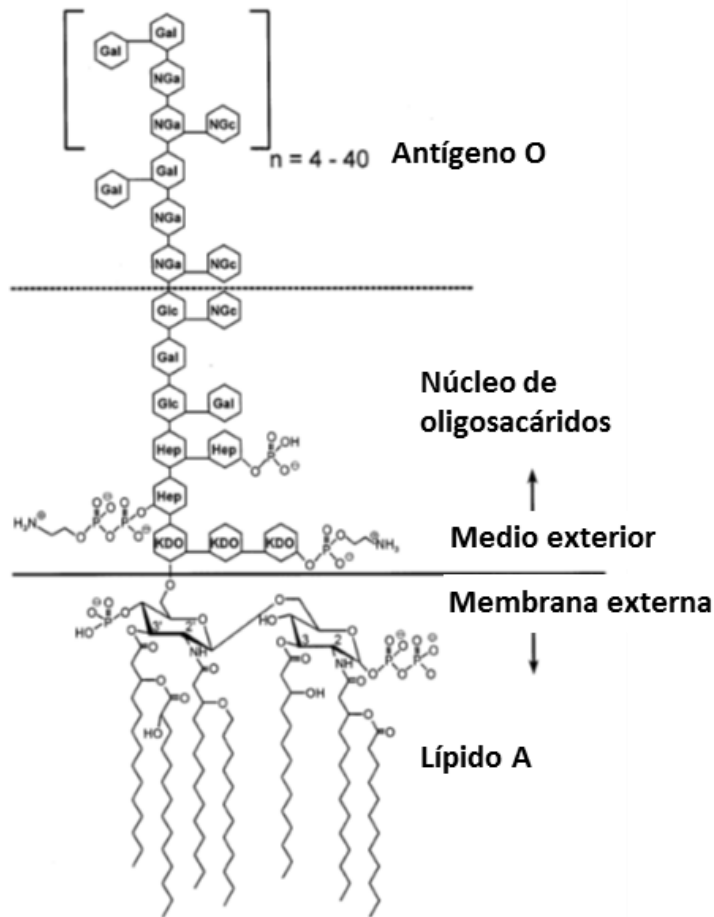


Figura 4- Esquema representativo de la estructura del lipopolisacárido LPS de *E. coli* O111:B4. Adaptado de Petsch y Anspach, 2000 [68]. El lípido A es un disacárido de glucosaminas fosforiladas en las posiciones 1 y 4' y acilado en las posiciones 2-, 3-, 2'- y 3' con R-3-hidroximiristato. Los grupos OH de las cadenas de R-3-hidroximiristato en las posiciones 2' y 3' se acilan adicionalmente con laurato y miristato, respectivamente.

Abreviaciones: Hep, L-glicero-D-mano-heptosa; Gal, galactosa; Glc, glucosa; KDO, ácido 2-ceto-3-desoxioctónico; NGa, N-acetil-galactosamina; NGc, N-acetil-glucosamina.

Una estrategia utilizada para reducir la actividad endotóxica del LPS, es la modificación de la estructura del lípido A. El lípido A de *E.coli* presenta dos fosforilaciones en el disacárido glucosamina y además se encuentra hexacilado con cadenas de ácido láurico y mirístico (Figura 5). Estudios han demostrado que la modificación del patrón de acetilación en las cadenas hidrofóbicas del lípido A tiene un impacto en la permeabilidad de la membrana y en el reconocimiento de TLR4, generando una menor actividad endotóxica [70]–[72].



La enzima miristoil aciltransferasa, cataliza el último paso en la biosíntesis del lípido A, incorporando una cadena de ácido graso mirístico, (Figura 5). Estudios previos han demostrado que la disrupción del gen *msbB* (*lpxM*), que codifica para dicha enzima, fue capaz de generar cepas viables y con capacidad endotóxica reducida [73], [74]. En base a estos antecedentes se decidió construir una cepa de *E. coli* el gen *msbB* inactivado por reemplazamiento génico con un cassette de resistencia antibiótica.

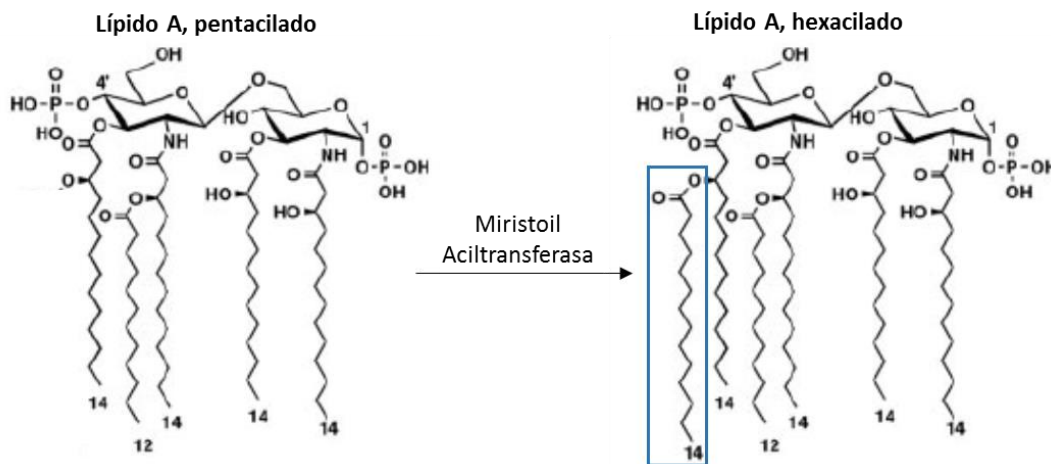


Figura 5- Esquema representativo del último paso de la biosíntesis del lípido A. La enzima Miristoil aciltransferasa, codificada por el gen *msbB* (*lpxM*), incorpora el ácido graso mirístico. La inactivación de este gen produce un lípido pentacilado con menor actividad endotóxica. Adaptado de Wang, 2007 [72].

## HIPÓTESIS

Flagelinas provenientes de diversas especies bacterianas pueden tener capacidad inmunoestimuladora diferencial y en consecuencia tener potencia diferente como inmunoterapias frente a infecciones del tracto respiratorio.

## OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo de nuevas inmunoterapias para el tratamiento de las afecciones respiratorias basadas en el uso de flagelina como posible moduladora de la respuesta inmune en el tracto respiratorio.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener flagelinas de diversos serovares de *Salmonella* y diversas especies bacterianas.
2. Evaluar la respuesta inducida en una línea epitelial de pulmón frente a la estimulación con las distintas flagelinas.
3. Estudiar la capacidad de protección de las flagelinas en un modelo de infección por *Streptococcus pneumoniae*.
4. Construir un sistema de expresión en *Escherichia coli* con actividad endotóxica reducida para la producción de la/s flagelinas a ser seleccionadas.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Obtención de las flagelinas de forma mecánica y/o recombinante.

#### 2.1.1 Flagelinas de *Salmonella enterica* de los serovares Dublin y Enteritidis:

Se inoculó una colonia de cada cepa en 3 ml de medio LB (Lysogeny broth-Miller) y se crecieron durante 4 horas a 37 °C a 150 rpm para evitar el desprendimiento de los flagelos. Luego se realizaron diluciones 1/500 de los cultivos bacterianos en medio LB y se dejaron 16 horas bajo las mismas condiciones de crecimiento. Cuando ambos cultivos llegaron a fase estacionaria (OD ~1,5) se centrifugaron 20 minutos a 5000 rpm, luego se lavaron con 20 ml de buffer fosfato (PBS) y se volvieron a centrifugar 20 min a 5000 rpm. Las bacterias se resuspendieron en 3 ml de PBS y los flagelos se desprendieron por agitación mecánica con vórtex durante 2 minutos a velocidad máxima. Posteriormente se centrifugaron 20 minutos a 5000 rpm para recuperar los sobrenadantes con los flagelos. Finalmente, los sobrenadantes se centrifugaron a 100.000g durante 1 hora a 4 °C y los sedimentos se resuspendieron en 750 µl de PBS y se conservaron a -80 °C.

#### 2.1.2 Flagelina de *Proteus mirabilis*:

La cepa Pr 2921 de *Proteus mirabilis*, cedida por el grupo de investigación del Dr. Pablo Zunino del Instituto de Investigaciones Biológicas del Clemente Estable, se sembró en 18 placas de medio BHI (Brain Heart Infusion) e incubó a 37 °C durante 24 horas, [75]. Las placas se lavaron con PBS a un volumen suficiente como para recuperar la mayor cantidad de bacterias. Se realizó una centrifugación a 5000 rpm 15 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se pesó el sedimento. Dicho sedimento se resuspendió en PBS en una

relación de 100 ml de PBS cada 6 gramos de peso húmedo. Los flagelos fueron extraídos de forma mecánica a una velocidad alta durante 30 segundos con el disruptor de tejidos seguido de una centrifugación a 16.000 g, 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante con los flagelos se centrifugó a 40.000 g durante 1 hora a 4°C. El sedimento de flagelina se resuspendió en 1 ml de PBS y se conservó a -80°C.

### 2.1.3 Clonaje de *fliC* de *Herbaspirillum seropedicae* en dos vectores: pET14b y pGEX-4T1.

#### Clonado.

El gen codificante para la flagelina de la cepa *Herbaspirillum seropedicae* Z67 (GenBank: AKN65598.1) se amplificó con los cebadores que se muestran en la tabla 4, dependiendo del plásmido utilizado:

Tabla 4- Cebadores utilizados para clonar el gen *fliC* Hs en dos vectores: pGEX4T1 y pET14b.

Cebadores 5' - 3'	Plásmido pGEX4T1	Plásmido pET14b
Forward	CAAGAATTCATGGCATCAGTCATCAATAC CAAC	CAACATATGATGGCATCAGTCATCA ATACC
Reverse	AAAGCGGCCGCTTATTTCAACAGCGAGA GGACCT	AAAGGATCCCTTATTTCAACAGCGAG AGGAC

Los sitios de restricción para clonar el gen *fliC* Hs en el plásmido pGEX4T1 fueron *EcoRI* (GAATTC) y *NotI* (GCGGCCGC) y para el plásmido pET14b fueron *NdeI* (CATATG) y *BamHI* (GGATCC). En cursiva, se marca el codón de inicio (ATG) y el codón stop (TTA).

Los productos de PCR y los plásmidos pGEX4T y pET14b fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes (ver tabla 5), y posteriormente se realizó la ligación de cada producto de PCR con su vector de expresión correspondiente.

Tabla 5- Condiciones para la amplificación, digestión y ligación del gen de flagelina de *Herbaspirillum seropedicae*, en los plásmidos de expresión pET14b y pGEX-4T1.

Condiciones de la PCR	Digestión	Ligación
<p>Ciclo 1: 94°C 3 min;</p> <p>Ciclo 2: 94°C 30 seg, 55°C 1 min, 72°C a 1 min (5 repeticiones);</p> <p>Ciclo 3: 94°C 30 seg, 60°C 1 min, 72°C 1 min. (2 repeticiones);</p> <p>Ciclo 4: 94°C 30 seg, 62°C 1 min (28 repeticiones).</p> <p>Ciclo 5: 72°C 5 min. (1 repetición).</p>	<p><b>Plásmido</b></p> <p><b>pGEX4T1:</b> <i>EcoRI</i> (Invitrogen) y <i>NotI</i> (fermentas).</p> <p><b>Plásmido pET14b:</b> <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i> (fermentas). Digestión a 37°C durante 6 horas.</p>	<p><b>pGEX4T1:</b> 100 ng de plásmido y 114 ng de producto de PCR (<i>fliC</i> Hs) con 1 µl de T4 ADN ligasa (Invitrogen).</p> <p><b>pET14b:</b> 80 ng de plásmido y 95 ng de producto de PCR (<i>fliC</i> Hs) con 1 µl de T4 ADN ligasa (Invitrogen). Ligación a 23°C durante 1 hora.</p>

Los tamaños de los productos amplificados y digeridos se verificaron en gel de agarosa al 0.8%. Asimismo, las secuencias clonadas fueron secuenciadas por el servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo, para verificar la ausencia de mutaciones. Posteriormente, la construcción pETflicHs se transformó en la cepa de *E. coli* Rosetta pLysS (Novagen) y la construcción pGEXflicHs en la cepa MC1061Δ*msbB* (cepa construida en este trabajo).

Tabla 6- Plásmidos y cepas utilizadas para la obtención de flagelina de *Herbaspirillum seropedicae* recombinante.

	Características	Origen/Ref.	
Plásmidos	pET14b	Vector de expresión, expresa la proteína de interés fusionada en su extremo Nt a un tag de 6 aminoácidos de Histidina, bajo control del promotor T7, inducible por IPTG, Amp <sup>R</sup>	Novagen®
	pGEX-4T1	Vector de expresión, expresa la proteína de interés fusionada en su extremo Nt a la GST (Glutation-S-transferasa), bajo control del promotor P <sub>Tac</sub> y lacI <sup>q</sup> , inducible por IPTG, Amp <sup>R</sup>	GE Healthare®
Construcciones	pETFliCHs	Vector de expresión conteniendo el gen que codifica para la flagelina de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (FliCHs) fusionada a 6 His en su extremo Nt, bajo control del promotor T7, inducible por IPTG, Amp <sup>R</sup>	Presente trabajo
	pGEXFliCHs	Vector de expresión, conteniendo el gen que codifica para la flagelina de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (FliCHs) fusionada en su extremo Nt a la GST (Glutation-S-transferasa), bajo control del promotor P <sub>Tac</sub> y lacI <sup>q</sup> , inducible por IPTG, Amp <sup>R</sup>	Presente trabajo
Cepas	<i>Escherichia coli</i> DH5α	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ80dlacZΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>hsdR17</i> (rK-mK+), λ-	Hanahan, 1983 [83]
	<i>Escherichia coli</i> Rosetta2 (DE3) pLysS	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE2 Cm <sup>R</sup>	Novagen®
	<i>E.coli</i> MC1061	str.K-12 F- λ- Δ( <i>ara-leu</i> )7697 [ <i>araD139</i> ]B/r Δ( <i>codB-lacI</i> )3 <i>galK16 galE15 e14- mcrA0 relA1 rpsL150</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>spoT1 mcrB1 hsdR2</i> (r-m+)	Casadaban, 1980 [84].
	<i>Escherichia coli</i> MC1061Δ <i>msbB</i>	MC1061,Δ <i>msbB</i> :: Cm <sup>R</sup>	Presente trabajo

### Transformación de las construcciones en las cepas Rosetta pLysS y MC1061 $\Delta$ *msbB*.

Para las transformaciones se utilizaron 200  $\mu$ l de las cepas quimiocompetentes (Rosetta y MC1061 $\Delta$ *msbB*) que se mantuvieron en hielo por 10 minutos, luego se agregaron 2  $\mu$ l del vector correspondiente (pETfliCHs ó pGEXfliCHs), se incubó 20 minutos en hielo, 1 minuto a 42 °C y 2 minutos nuevamente en hielo. Luego se agregó 1 ml de caldo LB y se incubó 1 hora a 37°C bajo agitación a 200 rpm. Finalmente, cada cultivo, se centrifugó y se resuspendió en 100  $\mu$ l, para sembrar 100  $\mu$ l en placas de LB con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y así seleccionar los transformantes de pETfliCHs-Rosetta pLysS; y placas con 100  $\mu$ g/ml de Ampicilina y 25 $\mu$ g/ml de cloranfenicol para los transformantes pGEXfliCHs-MC1061 $\Delta$ *msbB*.

### Producción y purificación de la flagelina recombinante de *Herbaspirillum seropedicae* (FliC Hs).

Para la producción de la flagelina recombinante FliC Hs en ambas construcciones, se partió de un precultivo de 3 ml a 37°C durante 16 horas bajo agitación a 200 rpm y luego se realizó una dilución 1/100 en 200ml de medio LB con antibiótico de selección (Ampicilina [100 $\mu$ g/ml] final y cloranfenicol [25 $\mu$ g/ml] final para Rosetta, y solo ampicilina [100 $\mu$ g/ml] final para la cepa MC1061 $\Delta$ *msbB*).

Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 200 rpm hasta llegar a una DO<sub>600nm</sub> entre 0.6-0.8. y luego se indujo la expresión del gen *fliCHs* con 50  $\mu$ M de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) durante 16 horas a 18 °C en la cepa Rosetta y 0.2 mM de IPTG en la cepa MC1061 $\Delta$ *msbB* bajo las mismas condiciones. Finalizada la inducción, los cultivos se centrifugaron a 4°C a 5000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavaron los sedimentos con PBS y se centrifugaron nuevamente. Se prosiguió con la lisis

celular resuspendiendo los sedimentos bacterianos en 8 ml de buffer lisis: PBS pH=7.4, 0.5 mM EDTA, 0.15 mM PMSF (inhibidores de proteasas, Gibco), 0.25 mg/ml de lisozima (Sigma); y se mantuvo en frío por 30 minutos para finalmente completar la lisis celular por sonicación. Dicho proceso se realizó a 4°C aplicando 10 ciclos de 15 segundos cada uno a 40% de amplitud, con intervalos de 1 minuto de descanso en hielo entre cada ciclo (Omni-Ruptor 4000). Luego se agregó Tx-100 a una concentración final de 0.5%, y se procedió a centrifugar a 15600 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante (lisado clarificado) se utilizó para la purificación de las correspondientes proteínas de fusión como se detalla a continuación.

Por un lado, la purificación de la flagelina de *H.seropedicae* unida a 6 histidinas en el extremo N-Terminal (FliCHs-6xHis) se realizó en columna de cromatografía Poly-prep (Bio-rad, #cat.731-1550) con la matriz comercial “GenScript High Affinity Ni-Charged Resin” (GenScript) según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 7 ml de lisado con 0.5 ml de matriz durante 20 minutos a 4°C, la columna estaba previamente equilibrada con Buffer de equilibrio: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris•Cl, 8 M urea, pH 8.0. Se recogió el “*Flow Through*” y se hicieron lavados de la columna con el buffer de lavado: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris•Cl, 10 mM imidazol, 8 M urea, pH 8.0 y 10% de glicerol. Finalmente se hicieron tres eluciones de 1 ml cada una con buffer de elución: 100 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM de Tris•Cl, 250 mM de imidazol, 8 M de urea, pH 8.0 y 10% de glicerol. Luego la fracción eluída se dializó cuatro veces contra buffer PBS para eliminar la urea y el imidazol; y las alícuotas de flagelinas se conservaron a -80 °C.

Por otro lado, la purificación de la flagelina de *H.seropedicae* unida a la Glutation S-Transferasa en el extremo N-terminal (FliCHs-GST) se realizó en columna de cromatografía Poly-prep (Bio-rad, #cat.731-1550) con la matriz comercial “Glutathione Resin” (GenScript) según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 7 ml



de lisado con 0.4 ml de matriz durante 20 minutos a 4°C, la columna estaba previamente equilibrada con PBS pH 7.4. Se recogió el “*Flow Through*” y se hicieron lavados primero con PBS suplementado con 0.5% de Tx-100 y luego lavados solo con PBS. Posteriormente, la fusión FliCHs-GST se eluyó con 1 ml de buffer de elución: 10 mM de glutatión reducido en 50 mM de Tris HCl. pH 8.0 y luego se digirió en solución con 8 unidades de trombina (Merck) 16 hs a 25 °C. Finalmente, la solución se pasó por la resina para retener la GST y el eluido conteniendo la FliCHs se conservó en alícuotas a -80 °C.

La identidad de la flagelina de *H.seropedicae* fue confirmada por el servicio de Espectrometría de Masas del Institut Pasteur de Montevideo. Cabe destacar que en todos los ensayos de estimulación con flagelina, siempre se utilizó una alícuota nueva (del mismo lote pero sin descongelarse) y se verificó por SDS PAGE la integridad de la misma.

Además la flagelina de *H.seropedicae* y la de *S.Typhimurium* se pasaron por columnas con resina de polymixina B para eliminar la contaminación por LPS, según las indicaciones del fabricante (Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel, Thermo Scientific).

#### **2.1.4 Cuantificación, pureza y actividad biológica de las flagelinas:**

Las concentraciones de todas las flagelinas nativas fueron determinadas por el método de BCA (Ácido Bicinonínico). Se realizó una curva de calibración (rango de 0.0937 a 1.5 mg/ml) con BSA como proteína estándar (albúmina sérica bovina). A 10 µl de cada concentración de BSA estándar y/o muestras se le agregaron 200µl de solución de BCA (50:1 de ácido bicinonínico: sulfato cúprico al 4%) y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos, posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm de cada estándar y/o muestra en un lector de placas (Dynex Technologies). La concentración de la flagelina

recombinante FliCHs se determinó por densitometría con el programa GeneTools (G-box Syngene).

El grado de pureza de las flagelinas se analizó en geles de acrilamida/bisacrilamida al 12% de 1 mm de espesor siguiendo las instrucciones del manual de la cuba de electroforesis utilizada (Tetra Cell-Bio-rad). La corrida se realizó a 20 mA/gel en un buffer Tris-HCl 25 mM pH 8.3, 192 mM de glicina y 0,1% de SDS.

A su vez, la línea celular Caco-2 CCL20-Luc permitió evaluar la actividad biológica de las flagelinas obtenidas. Este sistema reportero posee el gen de la luciferasa bajo control del promotor *Ccl20* humano transfectado en la línea celular Caco-2 [35]. Para ello se cultivó dicha línea en medio DMEM high glucosa (Capricorn) suplementado con 2 mM de glutamina (Sigma), 0.00813 g/l de aminoácidos no esenciales (Applichem), 10 % de suero fetal ovino (Capricorn), 1 mM de piruvato de sodio (Sigma) y 0,7 mg/ml de geneticina (Sigma).

Tres días antes del ensayo se sembraron  $2 \times 10^4$  células por pocillo en 200  $\mu$ l de medio sin geneticina en placas de 96 pocillos. El día anterior al ensayo se renovó el medio (150  $\mu$ l) y el mismo día del ensayo se completó el medio con 50  $\mu$ l de cada flagelina a analizar diluidas en el medio de cultivo de las células. Las flagelinas se evaluaron a una concentración de 1  $\mu$ g/ml y también dichas flagelinas tratadas previamente con tripsina.

Para la tripsinización de las flagelinas, las muestras se prepararon a una concentración de 0.2  $\mu$ g/ml y 2/3 de esas soluciones se mezclaron con 1/3 de tripsina-EDTA al 0.017% (GE Healthcare). Luego se incubaron a 37 °C durante 1 hora y finalmente la tripsina se inactivó a 70 °C durante 30 minutos.

La actividad luciferasa se midió en el luminómetro (Luminoskan ascent, Thermo scientific) y el incremento de la actividad luciferasa fue calculado como la relación en

unidades relativas de luminiscencia de cada condición con las flagelinas respecto a las células sin estimular.

## 2.2 Líneas celulares.

### 2.2.1 Línea epitelial de pulmón A549

La línea epitelial de pulmón A549 (ATCC CCL-185) se mantuvo en medio DMEM HamF12 con 10% SFB (Capricorn) hasta una confluencia de 80-90%. Luego se realizaron pasajes con diluciones entre 1/3-1/8 y se renovó el medio cada 2-3 días.

Para el ensayo se utilizaron botellas T175 (Greiner bio-one) y cuando alcanzó una confluencia de 80%, se lavaron con PBS, se tripsinizaron con 2,5 ml de tripsina-EDTA durante 3 minutos a 37 °C y luego se resuspendieron en 14 ml de medio fresco. Las células se tiñeron con azul de tripán (Life technologies) y se contaron en la cámara de Neubauer. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 24 y se dejaron adherir por 24hs. Al día siguiente, se quitó la mitad del medio y se agregó nuevo medio con el antígeno correspondiente.

Se realizó un curso temporal (2, 4, 6, 12, 24 hs) de estimulación con 0,1µg/ml de flagelinas de *S.Typhimurium*, *S.Dublin*, *S.Enteritidis*, *P.mirabilis*, *H.seropedicae*.

En cada tiempo de estimulación se quitó el medio y se agregaron 500 µl de Trizol (Life technologies) para posteriormente realizar la extracción del ARN.

### RT-qPCR

Los niveles de expresión de ARN mensajeros en la línea epitelial A549 fueron determinados por PCR cuantitativa. A las muestras estimuladas con las diferentes flagelinas se le agregaron 500 µl de trizol y se siguió el protocolo de extracción de ARN recomendado por el fabricante (Life technologies). Brevemente a cada muestra se le agregaron 100 µl de cloroformo, se centrifugó para separar las fases y se tomó la fase acuosa la cual luego se precipitó con isopropanol. El sedimento se lavó con 75% de etanol, y finalmente cada muestra se resuspendió en 10µl de agua ultrapura (Gibco) con

incubación de 10 minutos a 55 °C. La concentración y la pureza del ARN se evaluaron en un Nanodrop (Thermo).

Previo a la retrotranscripción, cada muestra de 1 µg de ARN total fue tratada con 0.35 U de DNAsa para eliminar el ADN genómico, se dejó a temperatura ambiente 15 minutos y luego la DNAsa se inactivó a 70 °C por 10 minutos. Para la retrotranscripción, se tomó 1 µg de ARNm previamente tratado con DNAsa de cada muestra y se mezclaron con 200 ng de random primers, 1 mM de dNTPs, 400 U de RNAsa Out, 20 mM de DTT y 200 U de la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen). El ciclado fue de 10 min, 25 °C; 50 min, 37°C; 15 min, 70 °C en un termociclador Corbett CG196. Finalmente los ADN<sub>s</sub> copia fueron diluidos al 1:8 en agua ultrapura.

En la reacción de PCR cuantitativa se empleó el kit de Sybergreen QuantiTect (Qiagen) y se utilizaron 2 µl del ADN copia de cada muestra. El ciclado fue de 15 min, 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 seg, 95°C; 1 min, 60°C en los termocicladores de tiempo real 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem) o Rotor Gene-6000 (Corbett Life Sciences). En la tabla 3 se muestran las secuencias de los cebadores diseñados para detectar los niveles de ARN mensajeros en la línea epitelial humana A549. Se aplicó el método del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para el cálculo de los niveles relativos de ARN mensajero para cada gen de interés, normalizados con los niveles del gen beta-2-microglobulina (*B2m*) o el gen beta-actina (*ACTB*), en las células estimuladas respecto a las sin estimular, [76]. Se verificó que controles sin tratar con retrotranscriptasa no amplificaran o lo hicieran mas de 6 ciclos más adelante que las mismas muestras tratadas con RT, así como también que los  $C_t$  para el gen normalizador no variaran significativamente entre las distintas condiciones.

Tabla 3- Secuencia de los cebadores humanos utilizados en la línea epitelial A549.

Cebadores humanos	Secuencia 5'-3'
<b>F-<i>ACTB</i></b>	CTACGAGCTGCCTGACGG
<b>R-<i>ACTB</i></b>	AGGACTCCATGCCCAGGAA
<b>F-<i>B2m</i></b>	GAGGCTATCCAGCGTACTCCA
<b>R-<i>B2m</i></b>	TCGGATGGATGAAACCCAGAC
<b>F-<i>Ccl20</i></b>	CAGTGCTGCTACTCCACCTC
<b>R-<i>Ccl20</i></b>	GCAGTCAAAGTTGCTTGCTTCT
<b>F-<i>Cxcl1</i></b>	CGCCCAAACCGAAGTCATAG
<b>R-<i>Cxcl1</i></b>	TTGGATTTGTCACTGTTTCAGCAT
<b>F-<i>Cxcl8</i></b>	GCGCCAACACAGAAATTATTGTAA
<b>R-<i>Cxcl8</i></b>	GCCCTCTTCAAAAACCTTCTCCAC
<b>F-<i>A20</i></b>	CTGCCAGGAATGCTACAGATAC
<b>R-<i>A20</i></b>	GTGGAACAGCTCGGATTTTCAG
<b>F-<i>Lcn2</i></b>	TTTTGTTCCAGGTTGCCAGC
<b>R-<i>Lcn2</i></b>	CACCACTCGGACGAGGTAAC
<b>F-<i>Camp</i></b>	GACAGTGACCCTCAACCAGG
<b>R-<i>Camp</i></b>	GGGCAAATCTCTTGTTATCCTTATC
<b>F-<i>Nos2</i></b>	GAGGGGACTGGGCAGTTCTA
<b>R-<i>Nos2</i></b>	TCTTCACTGTGGGGCTTGCAG
<b>F-<i>Ccl15</i></b>	TGCATCTGCCTCCCATATTC
<b>R-<i>Ccl15</i></b>	TCGGGTGACAAAGACGACTG
<b>F-<i>IL6</i></b>	GGTACATCCTCGACGGCATC
<b>R-<i>IL6</i></b>	CTTGTTACATGTCTCCTTTCTCAGG

### 2.2.2 Línea reportera HEK-Blue hTLR5/mTLR5.

La línea HEK-Blue hTLR5 (Catálogo # hkb-htlr5, Invivogen) responde a la estimulación del receptor humano TLR5 (hTLR5). Deriva de la línea celular HEK293 y se obtuvieron co-transfectando el gen *hTLR5* y el gen reportero SEAP. La estimulación con el ligando de TLR5 activa las vías NF- $\kappa$ B y AP-1 e inducen la secreción de la fosfatasa embriónica alcalina (SEAP). Esta línea celular se creció en medio DMEM, 4.5 g/l glucosa, 2 mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino (Capricorn), 50 U/ml de penicilina, 50  $\mu$ g/ml de estreptomycin, 100  $\mu$ g/ml de Normicina y con los antibióticos de selección (30  $\mu$ g/ml de Blastidina y 100  $\mu$ g/ml de Zeocina), Invivogen. Las células se contaron en la cámara de Neubauer con la tinción con azul de tripán luego de llegar a una confluencia de 80%.

Para los ensayos se sembraron 180  $\mu\text{l}$  de una concentración de  $1.4 \times 10^5$  cel/ml en placas de 96 pocillos, y se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de las muestras con los extractos bacterianos ( $1 \times 10^7$  ufc/ml) y/o las flagelinas purificadas (se tuvo en cuenta la diferencia de peso molecular de cada una para poner el mismo número de moles). Se incubaron en estufa a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas y luego se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de sobrenadante para revelar con 150  $\mu\text{l}$  de Quantiblu (Invivogen). El color producido por la actividad de la fosfatasa alcalina (SEAP) se midió a 638 nm en un lector de placas (Tecan).

El protocolo de crecimiento para la línea murina HEK-Blue mTLR5 (Catálogo # mkb-mtlr5, Invivogen) es igual que para la línea humana HEK-Blue hTLR5 pero con antibióticos de selección a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  de Blastidina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de Zeocina.

## 2.3 Estudio de la protección de las flagelinas en un modelo de infección respiratorio.

En el ensayo de protección se utilizaron ratones hembras Balb/c de entre 6-8 semanas de edad y se siguió el protocolo del modelo murino de infección por *Streptococcus pneumoniae* serotipo1 (E1585), aislado clínico de sangre de la colección del Centro Nacional de Referencia del MSP, puesto a punto en nuestro laboratorio [57]. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a la normativa vigente y habilitados por el Comité de Ética en el uso de Animales de la Facultad de Medicina (Registro Institucional ante la CNEA N° 0011/11).

Los ratones fueron anestesiados con 111 mg Ketamina y 5.6 mg Xilacina por kg de peso vía intraperitoneal, y luego de 10 minutos fueron co-administrados con la mínima dosis letal de *Streptococcus pneumoniae* 1 ( $2 \times 10^4$  ufc/50 $\mu\text{l}$ ) vía intranasal y con 5  $\mu\text{g}$  de cada

flagelina. Como grupo control de muerte solo se administraron  $2 \times 10^4$  ufc/50 $\mu$ l de *Streptococcus pneumoniae* y se evaluó la protección conferida por cada flagelina haciendo un seguimiento de la sobrevivencia durante 7 días.

Para verificar la dosis real de *S. pneumoniae* inoculada a los ratones, se realizó un recuento del inóculo administrado (ufc/ml) en placas de Agar Tripticasa de Soja (Difco), suplementadas con 5% de sangre ovina a 37 °C en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> durante 16-18 horas.

## 2.4 Búsqueda *in silico* de otras flagelinas y screening de estimulación primario.

### 2.4.1 Variabilidad de las flagelinas en la región de reconocimiento por TLR5.

Se realizó una búsqueda de secuencias de flagelina en 11 filos (Actinobacteria, Planctomycete, Spirochaetes, Fusobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Fibrobacteres, Aquificae, Thermotogae, Chloroflexi, Proteobacteria) con el motor de búsqueda PSI-blast en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) y como secuencia *Query* se utilizó la secuencia de flagelina de *Salmonella* Typhimurium LT2 (Acc. No P06179). Luego de tener una secuencia de flagelina representativa de cada filo, se eliminó la zona hipervariable, dejando las regiones conservadas, N-terminal (5-143) y C-terminal (409-494), que definen el dominio característico de la proteína. A partir de cada una de estas 11 secuencias conservadas se realizó una nueva búsqueda por PSI-blast en la misma base de datos, esta vez utilizando criterios de identidad, mínimo 30% y de cobertura, mínimo 95%.



Se identificaron 11548 proteínas, cuyas secuencias fueron descargadas de la base de datos y alineadas utilizando el programa MAFFT y se extrajo la región de unión al receptor TLR5 (88-114) [77]. Se aplicó el programa cd-hit para eliminar secuencias 100% idénticas en esta región [78]. Finalmente se trabajaron con las 4488 secuencias de flagelinas representativas de la variabilidad en esta región para el análisis del árbol filogenético realizado con el programa Figtree [79].

#### 2.4.2 Obtención de los extractos inactivados de las bacterias seleccionadas *in silico*

Las bacterias *Mesorhizobium sp.* DC18A (alfaproteobacteria) y *Herbaspirillum seropedicae* Z 67 (ATCC 35892) (betaproteobacteria) fueron cedidas por el grupo de la Dra. Elena Fabiano del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable [80], y la *Delftia sp.* (betaproteobacteria) por el grupo de la Dra. Susana Castro, [81]. La *Ralstonia solanacearum* UY031 (betaproteobacteria) fue cedida por el grupo de la Dra. María Inés Siri de Facultad de Química, [82].

Para la obtención de los extractos inactivados se realizaron previamente las curvas de crecimiento de todas ellas, para poder determinar la fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Las bacterias *Mesorhizobium sp.*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Delftia sp.* fueron crecidas en medio TY (5 grs. de triptona, 3 grs. de extracto de levadura, 0.09 grs. de CaCl<sub>2</sub> por litro) a 28°C y 150 rpm, mientras que la *Ralstonia solanacearum* se creció en medio Φ (10 grs. de peptona, 1 gr. de extracto de levadura, 1 gr. de casaminoácidos por litro) a 28°C y 150 rpm. Una vez alcanzada la densidad óptica, en fase exponencial y en fase estacionaria, se centrifugaron durante 1 hora a 1400g y se resuspendieron en 10 ml de PBS. Se hizo recuento de las unidades formadoras de colonias (ufc/ml) en cada fase de crecimiento y posteriormente se inactivaron por calor durante 20 minutos a 80 °C.

Finalmente se sembraron 100 µl de cada extracto en placas de agar con el medio correspondiente de cada bacteria para verificar la ausencia de bacterias vivas. Los extractos inactivados se conservaron a -20 °C.

### 2.4.3 Evaluación de la capacidad proinflamatoria *in vivo* de las flagelinas seleccionadas a nivel pulmonar.

Ratones hembras Balb/c de entre 6-8 semanas de edad fueron anestesiados con 111 mg Ketamina y 5.6 mg Xilacina por kg de peso vía intraperitoneal, y luego de 10 minutos fueron administrados con 1 µg de cada flagelina (se tuvo en cuenta la diferencia de peso molecular de cada una para poner el mismo número de moles) vía intranasal. Luego de 24 horas, se extrajeron los pulmones y se congelaron en Trizol para posterior extracción del ARN total y cuantificación por RT qPCR de los ARN mensajeros (*ACTB*, *Ccl20*, *Cxcl1*, *IL1a*, *Foxp3*, *Tgfb*, *IL10*, *Lcn2*, *S100a9*, *iNOS*), ver tabla 7. A su vez, se realizó el mismo procedimiento pero con ratones que fueron co-administrados con flagelina y *S.pneumoniae*. Todas las muestras se trataron de igual forma de cómo se describe en la sección 2.2.2, excepto por el primer paso, en el cual el tejido se disgrega mecánicamente con un disruptor celular (Qiagen Tissue Ruptor). El análisis de los datos obtenidos de la PCR en tiempo real se realizó como se indica en la sección 2.2.2.

Tabla 7- Secuencia de los cebadores murinos.

Cebadores murinos	Secuencia 5'-3'
<b>F -<i>ACTB</i></b>	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<b>R -<i>ACTB</i></b>	CGTCATCCATGGCGAACTG
<b>F -<i>Ccl20</i></b>	TTTTGGGATGGAATTGGACAC
<b>R -<i>Ccl20</i></b>	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC

<b>F -Cxcl1</b>	CTTGGTTCAGAAAATTGTCCAAAA
<b>R -Cxcl1</b>	ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT
<b>F -IL1a</b>	CTGCCAGCCAGAGAGGGAGTC
<b>R -IL1a</b>	CAGATTGATCCATGCAGCCTTC
<b>F -Foxp3</b>	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT
<b>R -Foxp3</b>	TTCTCACAACCAGGCCACTTG
<b>F -Tgfb</b>	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT
<b>R -Tgfb</b>	GAGTTTGTTATCTTTGCTGTCACAAGA
<b>F -IL10</b>	CATTTGAATTCCTGGGTGAGA
<b>R -IL10</b>	TGCTCCACTGCCTTGCTCTT
<b>F -Lcn2</b>	CCATCTATGAGCTACAAGAGAACAAT
<b>R-Lcn2</b>	TCTGATCCAGTAGCGACAGC
<b>F -S100a9</b>	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT
<b>R -S100a9</b>	TGTCATTTATGAGGGCTTCATTT
<b>F -iNos2</b>	CGTCATTTCTGTCCGTCTCT
<b>R -iNos2</b>	TTGCTGGCTGATGGCTGGCG

## 2.5 Construcción de una cepa de *E. coli* con actividad endotóxica reducida.

### 2.5.1 Inactivación del gen *msbB* por recombinación homóloga.

El mutante en la cepa *E.coli* MC1061 se realizó aplicando de la técnica descrita por Datsenko y colaboradores, la cual consiste en reemplazar el gen de interés por un marcador de selección a través de recombinación homóloga [85]. En este caso se reemplazó el gen *msbB*, responsable de la expresión de la enzima la miristoiltransferasa que cataliza el último paso de la síntesis del lípido A, por el gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*).

Tabla 8- Cepas, plásmidos y construcciones utilizadas para la obtención de la cepa *E.coli* con actividad endotóxica reducida.

	Características		Origen/Ref.
Cepas	<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>hsdR17</i> (rK-mK+), $\lambda$ -	Hanahan, 1985 [83].
	<i>E.coli</i> MC1061	str.K-12 F- $\lambda$ - $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 [ <i>araD139</i> ]B/r $\Delta$ ( <i>codB-lacI</i> )3 <i>galK16 galE15 e14- mcrA0 relA1 rpsL150</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>spoT1 mcrB1 hsdR2</i> (r-m+)	Casadaba, 1980 [84].
	<i>E.coli</i> MC1061 $\Delta$ <i>msbB</i>	<i>E.coli</i> MC1061, $\Delta$ <i>msbB</i> :: Cm <sup>R</sup>	Presente trabajo
Plásmidos	pKD3	Plásmido molde para la amplificación del cassette de resistencia a Cm. El gen <i>cat</i> está posicionado entre los sitios FRT. oriR6Kgamma, bla (Amp <sup>R</sup> ), rgnB (Ter), cat.	Datsenko, 2000 [85].
	pKD46	Vector de expresión de la “red recombinase $\lambda$ ” del fago lambda. repA101 (ts), araBp-gam-bet-exo, oriR101, bla (Amp <sup>R</sup> ).	Datsenko, 2000 [85].
	pBAD22	Vector de expresión bajo control del promotor P <sub>BD</sub> y <i>araC</i> , inducible por L-arabinosa, Amp <sup>R</sup>	Guzman, 1995 [86].
Construcciones	pBAD22 <i>botD</i>	Vector de expresión conteniendo el gen <i>botD</i> que codifica el extremo carboxiterminal de la cadena pesada de la toxina botulínica tipo D bajo control del promotor P <sub>BD</sub> y <i>araC</i> , inducible por L-arabinosa, Amp <sup>R</sup> .	Dr. Guarnaschelli
	pBAD22 <i>tetC</i>	Vector de expresión conteniendo el gen <i>tetC</i> que codifica el extremo carboxiterminal de la cadena pesada de la toxina tetánica tipo C bajo control del promotor P <sub>BD</sub> y <i>araC</i> , inducible por L-arabinosa, Amp <sup>R</sup> .	Dr. Guarnaschelli
	pGEXEIk	Vector de expresión, conteniendo el gen que codifica para Prp (proteína priónica de ciervo) fusionada al extremo Ct de GST (Glutation-S-transferasa), bajo control del promotor P <sub>Tac</sub> y <i>lacI</i> <sup>f</sup> , inducible por IPTG, Amp <sup>R</sup>	MsC. V.Esteves

En primer lugar, se realizó una PCR para obtener una extensión del cassette de resistencia a cloranfenicol con los extremos homólogos a los genes adyacentes al gen *msbB*, (Figura 6). Como molde se utilizó el plásmido pKD3 y los cebadores fueron:

Cebadores 5' - 3'	Plásmido pKD3
Forward <i>msbB-P1</i>	CGCTACACTATCACCAGATTGATTTTTGCCTTATCCGAAACTGGAAAAGC- <b>TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</b>
Reverse <i>msbB-P2</i>	CAAACCTGAACTTATCATCAGGCGAAGGCCTCTCCTCGCGAGAGGCTTTT- <b>CATATGAATATCCTCCTTAGTTC</b>

Ciclado: 94°C 3 minutos; 94°C 30 segundos, 55°C 1 minuto, 72°C 1 minuto 30 segundos

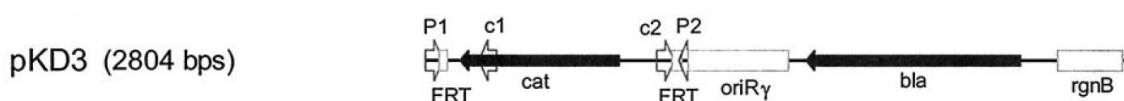


Figura 6- Esquema representativo del plásmido pKD3. Se muestran las regiones P1 (**TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG**) y P2 (**CATATGAATATCCTCCTTAGTTC**) donde hibridan los cebadores diseñados *msbB-P1* y *msbB-P2* para la síntesis del cassette extendido de cloranfenicol. Extraído de Datsenko *et al.*, 2000 [85].

(5 repeticiones); 94°C 30 segundos, 60°C 1 minuto, 72°C 1 minuto 15 segundos (2 repeticiones); 94°C 30 segundos, 65°C 1 minuto (28 repeticiones); 72°C 1 minuto 15 segundos (1 repetición).

El producto de PCR se corrió en un gel preparativo de agarosa al 0.8% a 40 mV, se extrajo la banda del tamaño esperado, y luego se siguió el protocolo de extracción de ADN del QIAEX II gel extraction Kit (cat#20021). Se prepararon células *E.coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes y se realizó la transformación con el plásmido pKD46.

## 2.5.2 Células quimiocompetentes DH5 $\alpha$

Se inoculó una colonia de *E.coli* DH5 $\alpha$  en 3 ml de medio LB durante 16 hs y de ese cultivo se realizó una dilución 1/100 en 250 ml de LB, se creció a 37 °C 200 rpm hasta

alcanzar una densidad óptica de 0.5. Las bacterias se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el medio y se resuspendieron en 25ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío. Quedaron 10 minutos en frío y posteriormente se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 2 ml de solución 100 mM de CaCl<sub>2</sub> fría con 20% de glicerol. Finalmente se hicieron alícuotas de 200 µl (ependorff previamente fríos) y se conservaron a -80 °C.

### 2.5.3 Transformación de células DH5α con el plásmido pKD46

Se tomó una alícuota de 200 µl de *E.coli* DH5α quimiocompetente y se agregó 1µl del plásmido pKD46 (portador de la recombinasa Red del fago lambda clonada bajo control de un promotor inducible por arabinosa y de replicón termosensible, Datsenko & Wanner 2000). La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, luego 1 minuto a 42°C y nuevamente en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se agregaron 800 µl de medio LB y se dejó agitando durante 1 hora 30 min a 30°C (plásmido termosensible) para luego plaquear en LB agar con 100µg/ml de ampicilina.

### 2.5.4 Células electrocompetentes DH5α-pKD46

Se inoculó una colonia de *E.coli* DH5α-pKD46 en 10 ml de medio LB con ampicilina durante 16 hs a 30°C y de ese cultivo se realizó una dilución 1/100 en 50 ml de LB con 5 mM de arabinosa, se creció a 30°C 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7. El cultivo se dejó en hielo durante 20 min, luego se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 50 ml de H<sub>2</sub>O miliQ estéril. Nuevamente las células se centrifugaron en las mismas condiciones y se resuspendieron en la mitad de volumen de H<sub>2</sub>O miliQ estéril. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de glicerol 10% en H<sub>2</sub>O miliQ estéril. Como último paso se

centrifugaron y resuspendieron en 200  $\mu$ l de glicerol 10% en H<sub>2</sub>O miliQ estéril y se guardaron alícuotas de 60  $\mu$ l a -80°C.

### 2.5.5 Electrotransformación de células DH5 $\alpha$ con el producto de PCR (cassette extendido de cloranfenicol).

Una alícuota de 60  $\mu$ l de células DH5 $\alpha$ -pKD46 electrocompetentes se mezcló con 3  $\mu$ l del producto de PCR [211 ng/ $\mu$ l]. La mezcla se incubó en hielo durante 1 min. y luego se electroporó a 50 mA, 89 W, 1750 V (Electroporador Invitrogen). Inmediatamente se agregaron 940  $\mu$ l de medio LB y las células se incubaron 2 hs a 37 °C 200 rpm. Del ml de cultivo, se separó la mitad para centrifugar, concentrar en 100  $\mu$ l, y plaquear en LB agar con 25  $\mu$ g/ml de cloranfenicol. El volumen restante se conservó a temperatura ambiente hasta el día siguiente (como precaución de que no se observaran colonias en el primer concentrado). Luego de 24 hs a 37 °C se obtuvieron algunas colonias en la placa con cloranfenicol. Éstas se re-estriaron, en paralelo, en placas de LB-ampicilina a 30 °C (control de pérdida del plásmido pKD46 termosensible), LB-cloranfenicol 37 °C (control de incorporación del cassette extendido de cloranfenicol) y solo LB 37 °C (control de viabilidad). Finalmente las células DH5 $\alpha$  que incorporaron el cassette extendido (cat) se guardaron en crioviales en medio LB conteniendo 16.7% de glicerol a -80°C.

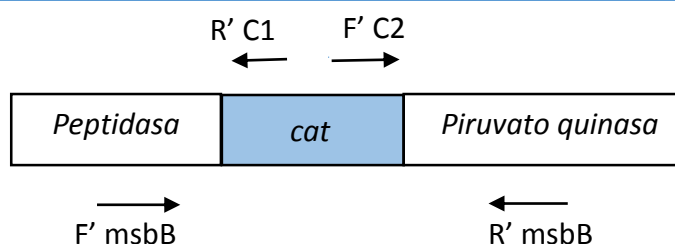
### 2.5.6 Verificación de la inserción del cassette extendido.

La verificación de la inserción del cassette cat en la posición correcta se realizó mediante tres PCRs. Se procedió a las extracciones de ADN genómico de la cepa DH5 $\alpha$  salvaje (WT) y la cepa DH5 $\alpha$  mutante ( $\Delta$ *msbB*) con el kit DNeasy Blood Tissue (Qiagen). Estos ADN genómicos se utilizaron como moldes de las tres PCRs para verificar la construcción DH5 $\alpha$   $\Delta$ *msbB*, ver tabla 9.



Tabla 9- Secuencias de cebadores para la verificar la correcta construcción de la cepa DH5 $\alpha$   $\Delta msbB$ .

Par de cebadores	Secuencia 5' - 3'	Tamaño esperado WT (pb)	Tamaño esperado $\Delta msbB$ (pb)
F' <i>msbB</i> /R' <i>msbB</i>	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG/ GGA ACTAAGGAGGATATTCATATG	1317	1362
F' <i>msbB</i> /R' C1	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG/ GCATGATGAACCTGAATCG	-	426
F' C2/R' <i>msbB</i>	GATCTTCGTCACAGGTAGG/ GGA ACTAAGGAGGATATTCATATG	-	188



Esquema de la inserción del cassette de cloranfenicol entre los genes adyacentes al gen reemplazado (*msbB*). Verificación de la construcción con la combinación de cebadores F' *msbB*/R' *msbB*; F' *msbB*/R' C1; F' C2/R' *msbB*.

### 2.5.7 Transducción de la cepa DH5 $\alpha$ $\Delta msbB$ a la cepa MC1061 con el fago P1.

Se realizó la transducción con el fago P1 de la cepa *E.coli* DH5 $\alpha$   $\Delta msbB$  a la *E.coli* MC1061 cepa para evitar posibles mutaciones adicionales que se hayan generado en la cepa inicial por producir la recombinasa del fago lambda. Se siguió el protocolo del “*Current Protocols in Molecular Biology*” [87]. Brevemente, se tomó 1 ml de un cultivo

O/N. en caldo LB de la cepa MC1061, se centrifugó durante 5 min. a 3900 g y luego el sedimento se resuspendió en 1 ml de solución P1 ( 10 mM de CaCl<sub>2</sub> + 5 mM de MgSO<sub>4</sub>). Se mezclaron 100 µl de MC1061 (cepa receptora) con 100 µl del lisado de la cepa DH5α *ΔmsbB* (4.5 x10<sup>9</sup> pfu/ml) obtenido por infección con el fago P1, se incubó a 37 °C por 20 min sin agitación, y luego se agregaron 20 µl de citrato de sodio 1M y se centrifugó durante 10 min a 3900 g. El sedimento se resuspendió en 1 ml de caldo LB con 20 mM de citrato de sodio y se dejó bajo agitación durante 1 hora a 37 °C. Nuevamente, el cultivo se centrifugó y el pellet se resuspendió en 100 µl de caldo LB con 20 mM de citrato de sodio para sembrar por extensión, en placas de LB conteniendo 5 mM de citrato y 25 µg/ml de cloranfenicol. A las colonias seleccionadas, resistentes a cloranfenicol, se las verificó por PCR, como se describió en sección 2.5.6. Se seleccionó una colonia resistente a cloranfenicol y que tuviera la inserción correcta y se denominó MC1061*ΔmsbB*. Se realizó en paralelo una curva de crecimiento de la cepa MC1061 WT y MC1061 *ΔmsbB* en 500 ml de caldo LB a 37°C 200 rpm, registrándose la densidad óptica a 600 nm cada 30 min para verificar que la cepa mutada no tuviera afectada su velocidad de crecimiento respecto a la parental.

## 2.5.8 Análisis de la actividad proinflamatoria de la cepa *ΔmsbB in vitro*.

### Línea THP-1

La línea de monocitos humana THP-1 (ATCC TIB-202) se mantuvo en medio RPMI (PAA), Hepes 10 mM, NaPyr 1 mM, glucosa 4.5g/l, 0.05 mM β mercaptoetanol con 10% de suero fetal bovino (PAA). En placa de 24 pocillos se sembraron 2x10<sup>5</sup> células y se dejaron 24hs con 40 ng/ml de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) para diferenciar a macrófagos. Luego se estimularon con la cepa MC1061 salvaje (WT) y MC1061*ΔmsbB* en una relación de 10:1 (bacteria: macrófago). Como control positivo, los macrófagos

fueron estimulados con 200 ng/ml de LPS y 4000 U/ml de IFN $\gamma$ , y a cada muestra se le agregaron 500  $\mu$ l de trizol posterior al tiempo de estimulación (2 y 4 hs). Finalmente se procedió a la extracción del ARNm y a evaluar los genes proinflamatorios (*Tnfa*, *IL1a*, *IL6*) como se describió en la sección 2.2.2, excepto para el gen *IL1a* donde se utilizó otro ciclado para la qPCR. El ciclado para *IL1a* fue de 15 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 94°C; 30 seg, a 56°C; 30 seg, a 72°C en los termocicladores de tiempo real 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem) o Rotor Gene-6000 (Corbett Life Sciences), ver Tabla 10.

Tabla 10- Cebadores utilizados para verificar la actividad endotóxica de la cepa MC1061  $\Delta$ msbB.

Cebadores humanos	Secuencia 5'-3'
<b>F-B2m</b>	GAGGCTATCCAGCGTACTCCA
<b>R-B2m</b>	TCGGATGGATGAAACCCAGAC
<b>F-IL6</b>	GGTACATCCTCGACGGCATC
<b>R-IL6</b>	CTTGTTACATGTCTCCTTTCTCAGG
<b>F-Tnfa</b>	ATCTTCTCGAACCCCGAGTG
<b>R-Tnfa</b>	CAGCTTGAGGGTTTGCTACAAC
<b>F-IL1<math>\alpha</math>*</b>	CTGCCAGCCAGAGAGGGAGTC
<b>R-IL1<math>\alpha</math>*</b>	CAGATTGATCCATGCAGCCTTC

\*[ ] de cebadores 0.5  $\mu$ M

### Línea HEK-blue mTLR4

Las células HEK-Blue mTLR4 (Catálogo # hkb-mtlr4, Invivogen) responden a la estimulación del receptor murino TLR4 (mTLR4). Derivan de la línea celular HEK293 y se obtuvieron co-transfectando el gen mTLR4, los co-receptores MD-2/CD14 y el reportero SEAP. Esta línea celular se creció en medio DMEM, 4.5 g/l glucosa, 2 mM L-glutamina, 10% de suero fetal bovino (Capricorn), 50 U/ml penicilina, 50  $\mu$ g/ml estreptomycin, 100  $\mu$ g/ml de Normicina y 1X HEK-Blue Selection, Invivogen. Las células se contaron en la cámara de Neubauer con la tinción con azul de tripan luego de llegar a una confluencia de 80%. Para el ensayo se sembraron 180  $\mu$ l de una concentración

de  $1.4 \times 10^5$  cel/ml en placas de 96 pocillos, y se agregaron 20  $\mu$ l de bacterias inactivadas de las cepas MC1061 salvaje (WT) y MC1061 $\Delta$ *msbB* en cantidades de UFC crecientes (0.375, 0.75, 1.5,  $3 \times 10^3$ ). Posteriormente, se incubaron en estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas y luego se tomaron 50  $\mu$ l de sobrenadante para revelar con 150  $\mu$ l de Quantiblu (Invivogen). El color producido por la actividad de la fosfatasa (SEAP) se midió a 638 nm en un lector de placas (Tecan).

### 2.5.9 Análisis de la producción de proteínas heterólogas en la cepa MC1061 $\Delta$ *msbB*.

Se realizaron precultivos en 3 ml de caldo LB-Ampicilina con las tres cepas MC1061  $\Delta$ *msbB* transformada con plásmidos de expresión portadores de los genes *botD*, *tetC*, *PRP*, estos genes corresponden a proteínas heterólogas de *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Cervus elaphus*, respectivamente, ver Tabla 8. En paralelo, se hicieron precultivos con las cepas salvajes MC1061 WT transformadas con los mismos genes. El protocolo de transformación de todas las construcciones es el descrito anteriormente en la sección 2.5.3.

Todos los precultivos se incubaron a 37°C durante 16 horas bajo agitación a 200 rpm y luego se diluyeron 1/100 en medio LB-Ampicilina en 20 ml de volumen final. Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 200 rpm a hasta llegar a una DO<sub>600nm</sub> entre 0.6-0.8., y luego se realizaron las inducciones con 0.2% de arabinosa durante 3 horas.

Posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 minutos y se lisaron con 8 ml de buffer lisis: PBS pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 0.15 mM PMSF (inhibidores de proteasas, Gibco), 0.25mg/ml de lisozima (Sigma); y se mantuvieron en frío por 30 minutos para finalmente completar la lisis celular por sonicación. Dicho proceso se realizó a 4°C aplicando 10 ciclos de 15 segundos cada uno a 40% de amplitud, con

intervalos de 1 minuto de descanso entre cada ciclo (Omni-Ruptor 4000). Luego se agregó Tritón X-100 a una concentración final de 0.5%, y se procedió a centrifugar a 15600 g durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, la inducción de la expresión de las tres proteínas heterólogas en ambas cepas se analizó en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%.

## 2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc). Se empleó el unpair t test y ANOVA para la comparación de medias entre grupos. Las curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier se analizaron por el test de log rank (Mantel-Cox).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Estudio comparativo de distintas flagelinas de origen gammaproteobacteria.

##### 3.1.1 Obtención de flagelinas de *Salmonella enterica* (serovares Dublin y Enteritidis) y *Proteus mirabilis*.

Como punto de partida de este trabajo se realizó la purificación de las flagelinas nativas provenientes de diferentes serovares y/o especies bacterianas. Se obtuvieron las flagelinas nativas de *Salmonella enterica* Dublin, *Salmonella enterica* Enteritidis y *Proteus mirabilis*; con rendimientos y grado de pureza suficientes para los posteriores ensayos *in vitro* e *in vivo*, Tabla 11.

Tabla 11- Concentraciones de las extracciones de las flagelinas nativas.

Flagelinas	Concentración por BCA (mg/ml)
<i>Salmonella</i> Dublin	1.8
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1.3
<i>Proteus mirabilis</i>	12

La flagelina de *Salmonella enterica* Typhimurium estaba purificada previamente en el laboratorio y se utilizó como referencia para compararla con las nuevas flagelinas obtenidas. Las flagelinas se cuantificaron por el método de BCA y la integridad proteica y el grado de pureza se determinaron por electroforesis en gel (Figura 7). Luego se verificó la actividad de las flagelinas en una línea celular reportera CacoCCL20-Luc, dicha línea genera luz al producirse la interacción entre la flagelina y su receptor de superficie TLR5, dado que el gen de la enzima luciferasa se encuentra bajo control del promotor de *CCL20*, gen que se induce como consecuencia de la activación del factor de

transcripción NF- $\kappa$ B. Como control negativo se realizó la tripsinización de las mismas flagelinas, para verificar que la inducción de la expresión de genes observada fuera causada únicamente por ellas y no por contaminantes arrastrados en la extracción (por ej. LPS, un componente no proteico, contaminante común de las purificaciones de proteínas).

Por un lado, se observó un incremento relativo en la intensidad de luz en aquellas células que fueron estimuladas con las flagelinas nativas extraídas, verificando de esta forma el estado activo de dichas proteínas.

Por otro lado, la estimulación con las flagelinas tripsinizadas resultó en niveles de producción de luciferasa similares a los obtenidos en las células sin estimular, corroborando así que la activación del promotor de *Ccl20* es debida únicamente a la estimulación por las flagelinas, (Figura 8).

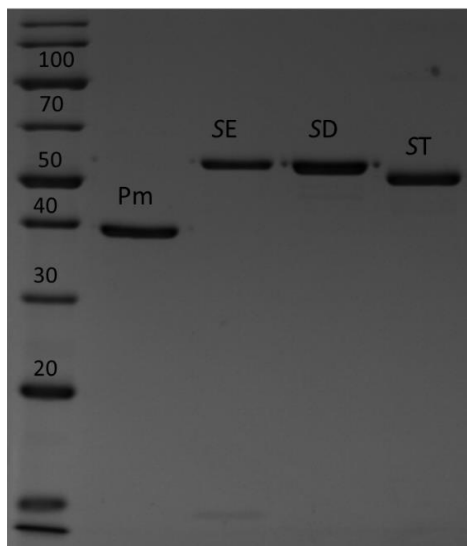


Figura 7. Análisis por SDS-PAGE (12%) de las flagelinas nativas extraídas de las diferentes especies bacterianas. Marcador peso molecular (KDa) #26630 (Thermo Fisher), Pm: *Proteus mirabilis* (~41KDa), SE: *Salmonella* Enteritidis (~53KDa), SD: *Salmonella* Dublin (~53KDa), ST: *Salmonella* Typhimurium (~52KDa).

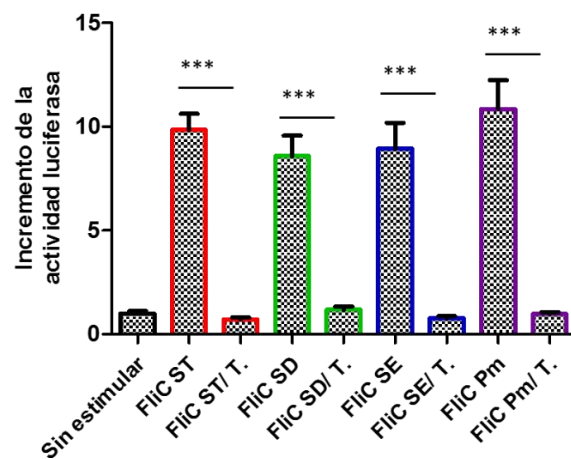


Figura 8. Actividad biológica de las flagelinas nativas en la línea reportera Caco-CCL20-Luc. Se representa el incremento en unidades relativas de la actividad luciferasa en las células Caco-CCL20-Luc tratadas con flagelinas (1 $\mu$ g/ml) respecto a las células no estimuladas. FliC ST *Salmonella* Typhimurium, ST/T.tripsinizada (rojo), FliC SD *Salmonella* Dublin, SD/T.tripsinizada (verde), FliC SE *Salmonella* Enteritidis, SE/T.tripsinizada (azul), FliC Pm *Proteus mirabilis*, Pm/T.tripsinizada (violeta). Las barras representan la media  $\pm$  SEM para un n=4. Las diferencias entre las condiciones se determinaron con el test ANOVA considerando un valor de  $p < 0,05$  como significativo.  $p < 0,05$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

### 3.1.2 Capacidad estimuladora de las flagelinas en la línea epitelial humana A549.

Las células epiteliales cumplen un rol fundamental en la respuesta inmune local debido a que son capaces de secretar citoquinas/quimoquinas en respuesta a un estímulo, entre otras por la presencia de receptores de tipo Toll en su superficie. A nivel pulmonar, estas células son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos, como lo es la flagelina, y desencadenar la producción de citoquinas, quemoquinas y/o péptidos antimicrobianos. Por esta razón, como primera aproximación, se decidió evaluar *in vitro* con la línea epitelial pulmonar humana A549 el perfil transcripcional de citoquinas y/o péptidos antimicrobianos en un curso temporal (2, 4, 6, 12, 24 horas) de estimulación con las flagelinas obtenidas.

La mayor expresión de los genes de las citoquinas proinflamatorias (*Ccl20*, *Cxcl1* y *Cxcl8*) se observó a las 2 horas, respecto al control de células sin estimular, al igual que el gen A20 (regulador negativo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B). Mientras que para la expresión del péptido antimicrobiano, lipocalina 2 (*Lcn2*) se observó un aumento de cuatro veces, respecto al control sin estimular, a las 24 horas de estimulación con todas las flagelinas evaluadas, (Figura 9). Dentro del curso temporal de la expresión de cada gen, se puede observar un patrón similar para todas las flagelinas, este resultado confirma lo observado en trabajos anteriores del laboratorio con la FliC de *S.Typhimurium* [88]. Sin embargo para las citoquinas *Ccl20*, *Cxcl1* y A20 a tiempos 2 horas, a pesar de no presentar diferencias significativas, se observa una tendencia de mayor expresión en las células estimuladas con la flagelina de *S.Dublin* respecto a las estimuladas con la flagelina



de *S.Typhimurium*. Estas citoquinas participan en la activación y el reclutamiento de linfocitos y células dendríticas al sitio de infección.

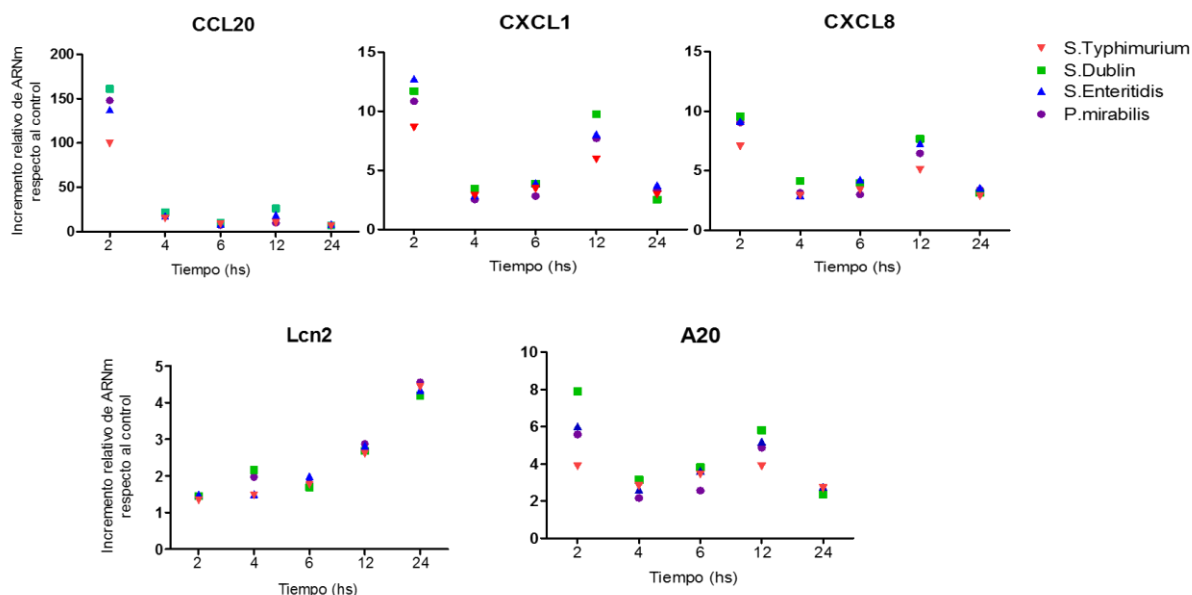


Figura 10. Análisis por qRT-PCR del perfil transcripcional de la línea epitelial A549 frente a la estimulación con las flagelinas nativas. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células/ml por pocillo en placas de 24 y se estimularon con  $0,1 \mu\text{g/ml}$  de flagelinas de *S.Dublin* y *S.Typhimurium* durante 2 hs. La cuantificación relativa del ARNm se normalizó con el gen normalizador beta-2-microglobulina y cada muestra se relativizó con la condición sin estimular,  $n=7$ . Las diferencias significativas (\*) respecto al control sin estimular fueron calculadas con el test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ).

### 3.1.3 Capacidad de las flagelinas de conferir protección en un modelo de infección pulmonar.

El ensayo en la línea epitelial A549 sirvió como primera aproximación para evaluar posibles diferencias en la expresión de genes pro y anti inflamatorios y así poder inferir la potencial capacidad inmunoestimuladora de las flagelinas purificadas.

Sin embargo, dicho estudio no representa el contexto general que se da a nivel pulmonar al desencadenarse una respuesta inmune compleja en la cual participan otros tipos

celulares, además del gran papel que representan las barreras epiteliales como estructuras activas en la expresión de péptidos antimicrobianos, quimioquinas y citoquinas moduladoras de la respuesta inmunitaria.

Por otro lado, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la flagelina de *S. Typhimurium* era capaz de inducir una respuesta inmune protectora en un modelo de infección respiratorio (*Streptococcus pneumoniae*) [57]. Se consideró relevante por tanto, evaluar si las flagelinas de diferentes especies obtenidas presentaban diferencias en la capacidad de proteger frente a un desafío letal con *S. pneumoniae*, y caracterizar los procesos celulares y moleculares que definen dicha diferencia.

Para ello, se llevó a cabo la co-administración vía intranasal de las flagelinas (5µg) con una dosis letal de *S.pneumoniae* ( $2 \times 10^4$  ufc/50ul). Las flagelinas de *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis protegieron en un 100%, mientras que las flagelinas de *Salmonella* Dublin y *Proteus mirabilis* mostraron un 80% de protección, (Figura 11).

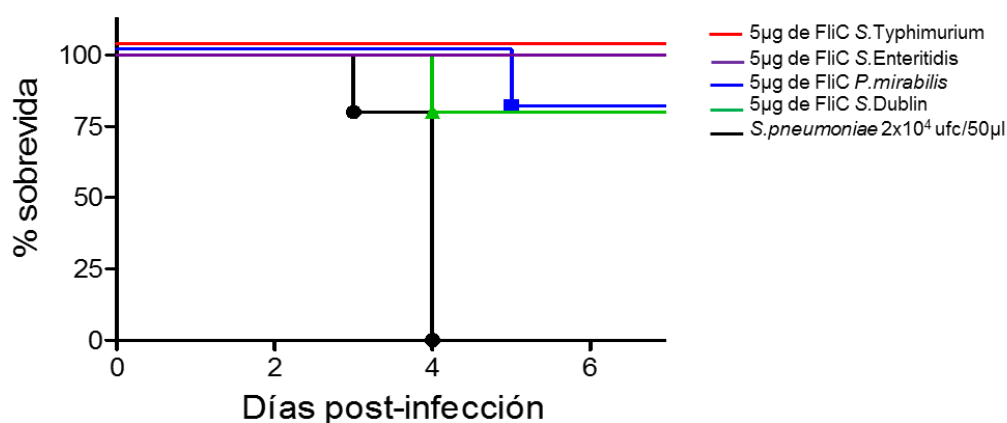


Figura 11. Evaluación de la capacidad protectora de las diferentes flagelinas frente a un desafío con *S.pneumoniae*. Ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad fueron co-administrados con 5 µg de cada flagelina vía intranasal: FliC de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Dublin y *Proteus mirabilis* junto a una dosis mínima letal de *S.pneumoniae* ( $2 \times 10^4$  ufc/50µl por ratón). Grupos de 5 animales/condición.

## 3.2 Estudio comparativo de flagelinas de otras especies bacterianas.

### 3.2.1 Análisis *in silico* de flagelinas de otras especies bacterianas.

Debido a que las flagelinas de distintos serovares de *Salmonella* y la de *Proteus* evaluadas hasta el momento generaron similares respuestas tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*, se decidió ampliar el espectro de flagelinas provenientes de otras especies bacterianas. Para ello se llevó a cabo un análisis bioinformático con todas las secuencias de flagelinas existentes en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). La flagelina es una proteína conservada dentro de las bacterias por el rol que cumple, sin embargo dentro de los dominios conservados (N- y C-terminal) se visualiza una gran heterogeneidad dependiente de la clase de bacteria, como se observa en el árbol filogenético, (Figura 12).

Por un lado, los grupos de las  $\beta$  y  $\gamma$ -proteobacterias estrechamente relacionadas, presentan los aminoácidos claves para el reconocimiento por TLR5 (L<sub>88</sub>, Q<sub>89</sub>, R<sub>90</sub>, L<sub>94</sub>, Q<sub>97</sub>, N<sub>100</sub>, E<sub>114</sub>), definidos inicialmente para FliC de *S. Typhimurium* [49].

Por otro lado se observa en las  $\alpha$ - y  $\epsilon$ -proteobacterias, al igual que en los firmicutes, mayor variabilidad en los aminoácidos claves para el reconocimiento por TLR5 respecto a la flagelina de *Salmonella*. En las secuencias de *H.pylori* y *C.jejuni* (ambas  $\epsilon$ -proteobacterias) se observan cambios, como glutamina por ácido aspártico (Q<sub>89</sub>→D), arginina por treonina (R<sub>90</sub>→T), leucina por lisina (L<sub>94</sub>→K), asparagina por glutamina (N<sub>100</sub>→Q) y ácido glutámico por ácido aspártico (E<sub>114</sub>→D). Se ha demostrado que todos estos cambios importantes, generan que esta clase de flagelinas pierdan la capacidad de ser sensadas por TLR5 [59].

Sin embargo, es interesante evaluar flagelinas del grupo de las  $\beta$ -proteobacterias que conservan los aminoácidos claves respecto a las  $\gamma$ -proteobacterias (flagelinas que han sido evaluadas en este trabajo) pero que presentan diferencias en los aminoácidos cercanos a los importantes en la región de reconocimiento, (Figura 12).

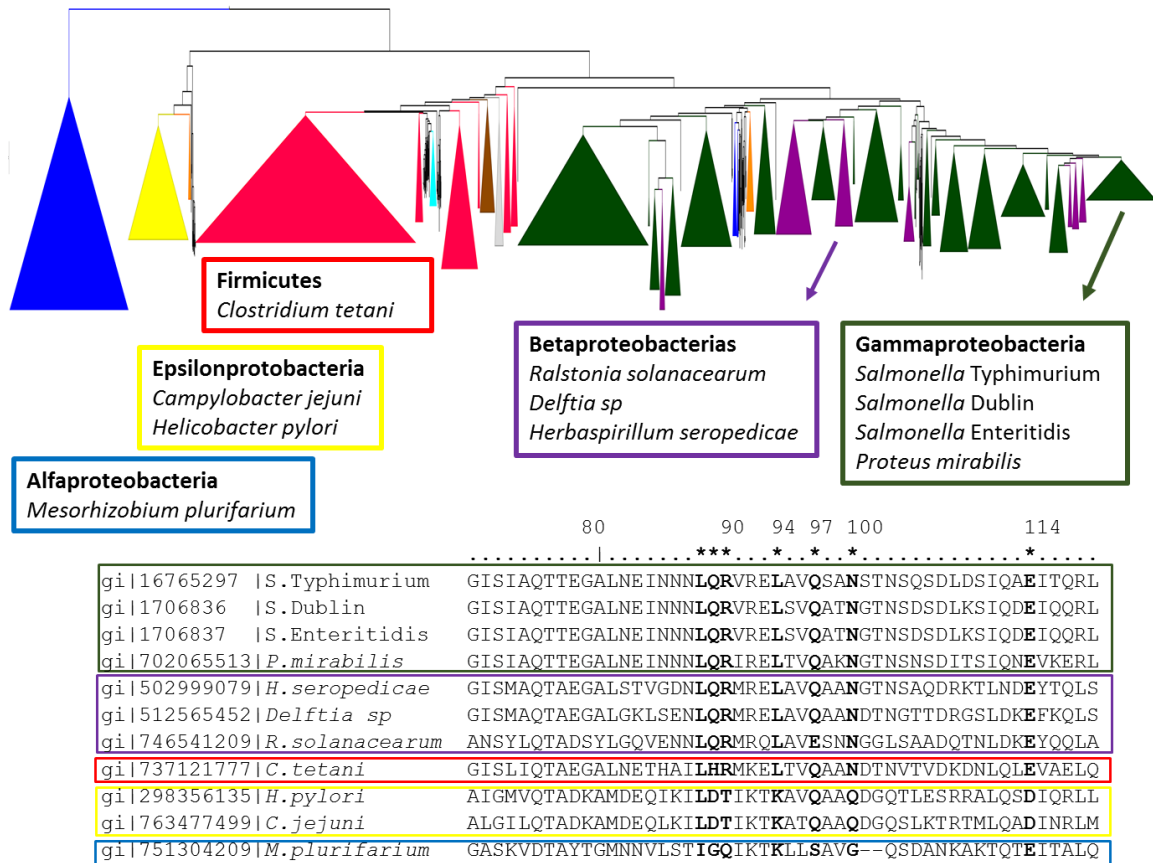


Figura 12. Árbol filogenético representativo de la variabilidad de flagelina en la zona de reconocimiento de unión al receptor TLR5 (aa 88-114) realizado el programa Figtree. La búsqueda de las secuencias de flagelinas se realizó en la base de datos NCBI con el motor de búsqueda PSI-blast, utilizando criterios de identidad, mínimo 30%, y de cobertura, mínimo 95%. \*, representa los aminoácidos de flagelina importantes para el reconocimiento por TLR5.

### 3.2.2 Crecimiento de *Herbaspirillum*, *Ralstonia*, *Mesorhizobium* y *Delftia* y evaluación de su capacidad estimuladora de una línea reportera para TLR5.

En base al análisis filogenético del dominio conservado de las flagelinas, se seleccionaron otras flagelinas para ser evaluadas como potenciales inmunoestimulantes. Dentro de los criterios de selección, que las bacterias no fueran gammaproteobacterias y que presentaran variabilidad dentro de la región de reconocimiento por TLR5. Como primera aproximación para evaluar las flagelinas seleccionadas del estudio *in silico*, se realizó un screening con los extractos de las nuevas bacterias (*Herbaspirillum*, *Ralstonia*, *Mesorhizobium* y *Delftia*) en la línea reportera para TLR5 (HEK blue-hTLR5). Este ensayo se realizó como forma de determinar el nivel con que las flagelinas de cada especie son sensadas por TLR5 en comparación con la flagelina de *S. Typhimurium* (flagelina de referencia en este trabajo).

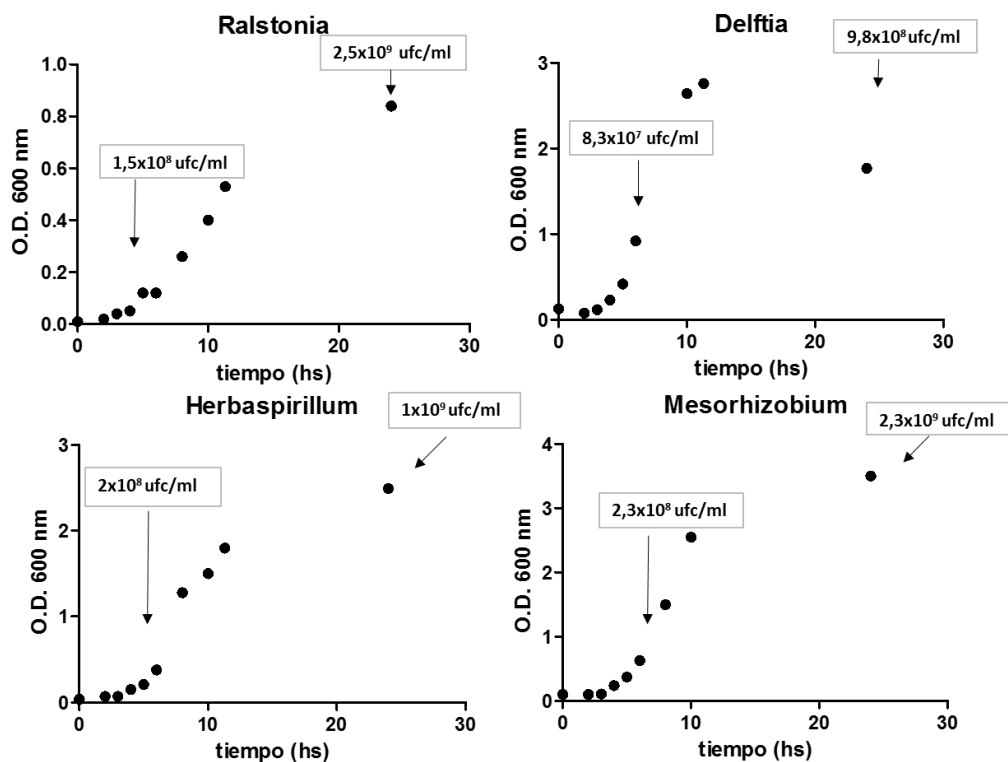


Figura 13. Curvas de crecimiento de las especies bacterianas seleccionadas por el análisis *in silico*. Se obtuvieron extractos inactivados por calor de las bacterias *Ralstonia*, *Delftia*, *Herbaspirillum* y *Mesorhizobium* en fase exponencial y estacionaria (flechas), todos los extractos se llevaron a  $1 \times 10^7$  ufc/ml para su inactivación por calor y evaluación en la línea reportera para TLR5. El resultado es representativo de 3 experimentos independientes.

Para ello, en primer lugar se realizaron curvas de crecimiento para las nuevas especies bacterianas seleccionadas (de la clase  $\beta$  y  $\alpha$ - proteobacterias) (Figura 13), se tomaron muestra de cultivos en fase exponencial y estacionaria para cuantificar las ufc/ml en cada fase para cada especie y se prepararon extractos inactivados para su evaluación en la línea reportera para TLR5, (Figura 14).

Los resultados obtenidos muestran una tendencia mayor en la capacidad de estimular TLR5 para todos los casos en fase exponencial. En *Delftia* y *Salmonella* se observan diferencias significativas entre los cultivos en fase exponencial y estacionaria, (Figura 14). Este hecho se podría explicar simplemente por la regulación de la expresión del flagelo en las condiciones evaluadas, que por ende influye en la cantidad de moléculas de

flagelina disponibles en cada fase para interactuar con el receptor TLR5. Existen evidencias que demuestran la represión del flagelo en fase estacionaria en *Salmonella* y en *Ralstonia* se ha observado que pierde movilidad cuando alcanza densidades celulares mayores a  $1 \times 10^9$  ufc/ml [89], [90].

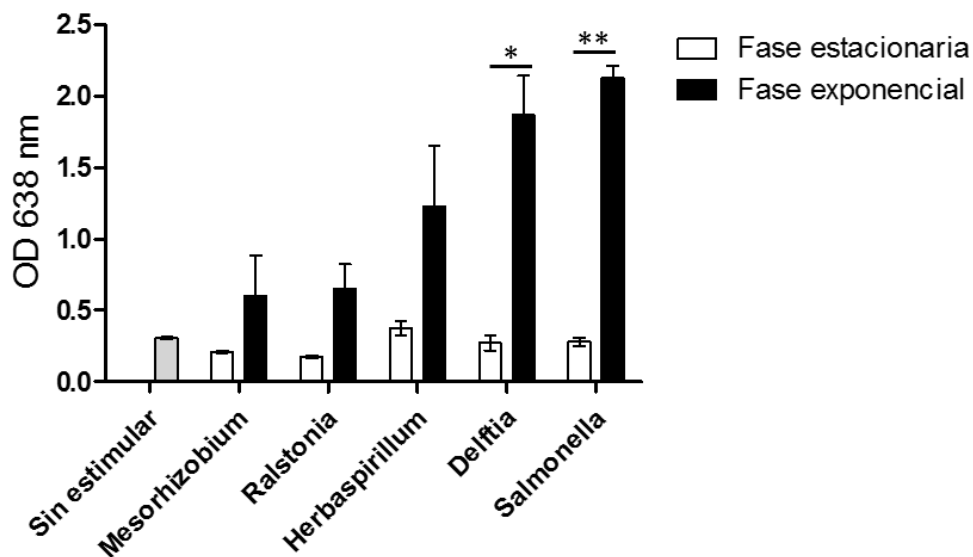


Figura 14-Screening primario de la capacidad estimuladora de TLR5 de las diferentes flagelinas seleccionadas *in silico*. La línea humana reportera Hek-TLR5 fue estimulada con las bacterias inactivadas ( $1 \times 10^7$  ufc/ml) en fase exponencial y en fase estacionaria durante 24hs. Las barras representan la media  $\pm$  SEM para n=3. Unpair t test  $p < 0,05$ .

Los extractos crecidos hasta la fase exponencial de *Herbaspirillum* y *Delftia*, ambas  $\beta$  proteobacterias, fueron capaces de estimular la línea TLR5, inclusive *Delftia* activó a un nivel similar que *Salmonella* ( $\gamma$  proteobacteria), sin embargo las células estimuladas con los extractos de *Ralstonia* ( $\beta$  proteobacteria) y *Mesorhizobium* ( $\alpha$  proteobacteria) no presentaron diferencias significativas respecto a la condición sin estimular (Figura 15).

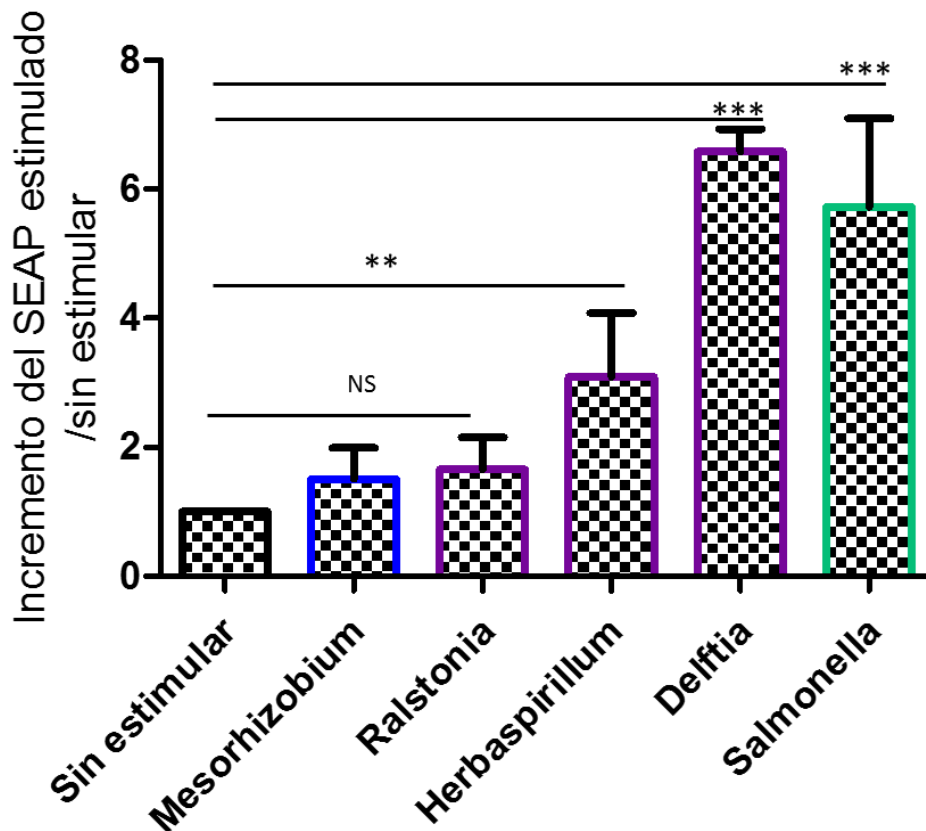


Figura 15. Screening primario de la capacidad estimuladora de los extractos de las distintas especies bacterianas en fase exponencial de crecimiento en la línea humana reportera HEK-TLR5. En verde, se representan las  $\gamma$ -proteobacterias (*S.Dublin*), en violeta las  $\beta$ -proteobacterias (*Delftia sp*, *Ralstonia sp*, *H.seropedicae*) y en azul la  $\alpha$ -proteobacteria (*Mesorhizobium sp*). En este ensayo se representa el incremento en unidades relativas de la producción de la fosfatasa embriónica alcalina secretada (SEAP) en las células estimuladas con respecto a las células sin estimular. Las barras representan la media  $\pm$  SEM para  $n=3$ , el resultado es representativo de 3 experimentos independientes. Los asteriscos representan las diferencias entre la condición sin estimular con respecto a cada bacteria y se determinó con el unpaired t test,  $p < 0,05$ . NS: No significativo, (\*\*)  $p < 0.002$ , y (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

### 3.2.3 Obtención de la flagelina *H.seropedicae* (betaprotebacteria)

Al principio de este trabajo se comenzó con el estudio comparativo de flagelinas provenientes de serovares de *Salmonella enterica* y otra  $\gamma$ -proteobacteria como *Proteus mirabilis*. Debido a que los resultados no presentaron claras diferencias entre las



flagelinas evaluadas, se comenzó la búsqueda de otras que tuvieran al menos mayores diferencias en la secuencia aminoacídica de reconocimiento a TLR5 y/o que en su defecto no hubieran estudios previos reportados. Con estos criterios y los resultados de estimulación de los extractos bacterianos (Figura 15) se eligió continuar con la  $\beta$ -proteobacteria (*Herbaspirillum seropedicae*), dado que fue capaz de estimular al TLR5 y a su vez presentó diferencias en el nivel de estimulación en relación al generado por la flagelina de *Salmonella*. Inicialmente se trató de obtener la flagelina de *H.seropedicae* de forma nativa como se había conseguido con las flagelinas de *Salmonella* y *Proteus*, pero ésta presentaba muchas impurezas en relación a la poca cantidad que se obtenía en grandes volúmenes de cultivo (entre 2-5 litros). Por estas razones, se decidió obtener y clonar la flagelina FliC Hs en dos sistemas de expresión (pET y pGEX) que permiten obtener la flagelina unida a 6 Histidinas por el extremo N terminal y a la flagelina unida a una Glutathion S-transferasa respectivamente. A su vez la flagelina fue expresada en dos cepas de *E.coli*, la Rosseta pLysS y la MC1061  $\Delta$ msbB construida en este trabajo que presenta actividad endotóxica reducida, ver sección 3.3, (Figura 16).

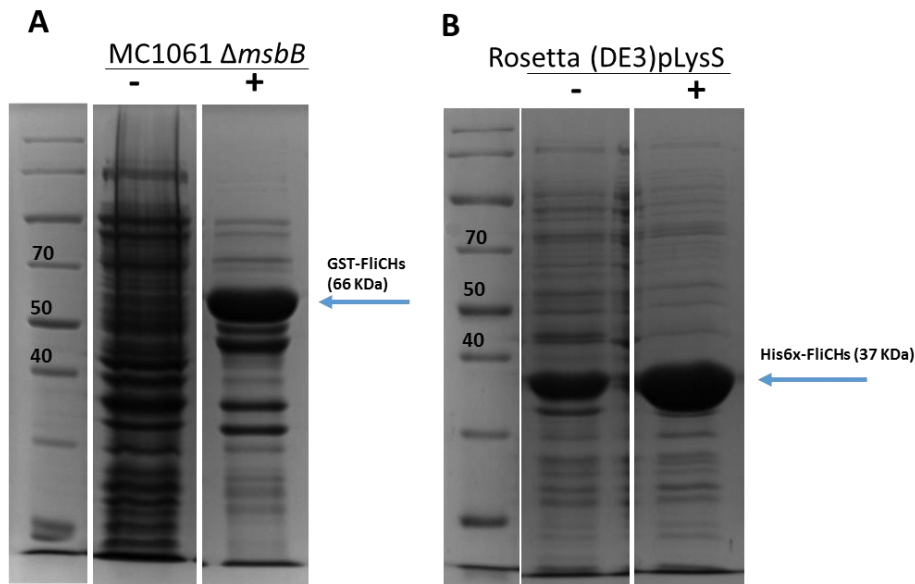


Figura 16- **A)** Expresión de la flagelina de *Herbaspirillum seropedicae* (pGEXFliC Hs) en la cepa MC1061  $\Delta$ msbB. La producción de FliC Hs se indujo en fase exponencial con 0.2 mM de IPTG a 18 °C durante 16 hs., la altura de la banda (~ 66 KDa) representa el peso de la flagelina (FliC Hs) fusionada a la glutation-S-transferasa (GST) **B)** Expresión de la flagelina de *Herbaspirillum seropedicae* (pETFliC Hs) en la cepa Rosetta pLysS. La producción de FliC Hs se indujo en fase exponencial con 50  $\mu$ M de IPTG a 18 °C durante 16 hs., la altura de la banda (~ 37 KDa) representa el peso de la flagelina (His6x-FliC Hs) fusionada a 6 histidinas en el extremo N-terminal.

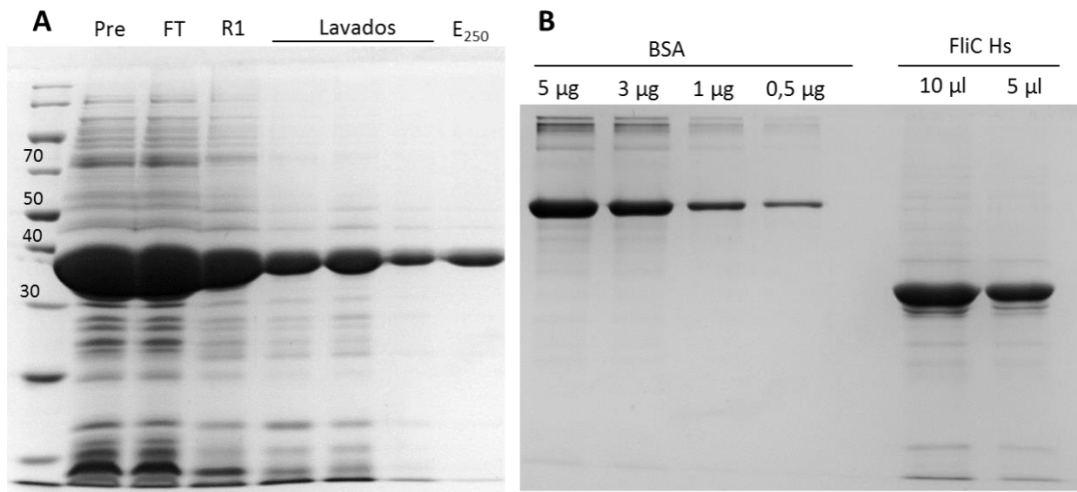


Figura 17- **A)** Purificación de la flagelina de *H.seropedicae* (pET/FliC Hs) en resina de níquel en condiciones desnaturalizantes (GenScript High Affinity Ni-Charged Resin). **Pre:** fracción insoluble cargada en la resina de níquel, **FT:** fracción no unida a la resina, **R1:** fracción unida a la resina, **Lavados:** 10 mM imidazol, **E<sub>250</sub>:** eluido de la flagelina con 250 mM de imidazol. **B)** Cuantificación de la flagelina *H.seropedicae* (FliC Hs) por densitometría. Cantidad de BSA estándar/ pocillo de 5 a 0,5  $\mu$ g, y cantidad de FliC Hs en 10  $\mu$ l/pocillo es 8,18  $\mu$ g y en 5  $\mu$ l/pocillo es 4,25  $\mu$ g de flagelina. La concentración de FliC Hs es de 0,84  $\mu$ g/ $\mu$ l.

En la flagelina unida a GST se dificultó el proceso de purificación por columna, la proteína quedaba retenida y una vez que se logró eluirla y cortar con trombina para eliminar la GST, se observaron dos bandas de similar intensidad; por lo cual se decidió continuar solo con la purificación de la flagelina unida a histidina. Ésta se pasó por columna de níquel en condiciones desnaturalizantes con urea y se eluyó con 250 mM de imidazol. Se hicieron varios lavados previos a la elución para eliminar impurezas a pesar de que en ese proceso se perdieron cantidades importantes de flagelina (Figura 17A). La cuantificación de la flagelina (FliC Hs) por densitometría fue de 0.84 mg/ml, suficiente para los posteriores ensayos *in vitro* e *in vivo*, (Figura 17B).

Una vez purificada y cuantificada la flagelina de *H.seropedicae* se comenzaron los estudios comparativos con la flagelina de *S.Typhimurium*.

### **3.2.4 Capacidad estimuladora de la flagelina de *H.seropedicae* en la línea reportera para TLR5 y en la línea A549.**

Como primer paso se probó la flagelina de *H.seropedicae* en la línea reportera para TLR5 para evaluar si presentaba actividad agonista de TLR5 y el nivel de estimulación respecto a la flagelina de *S.Typhimurium*. Como se aprecia en la Figura 18, la flagelina de *H.seropedicae* activa TLR5 en igual grado que la flagelina de *S.Typhimurium*.

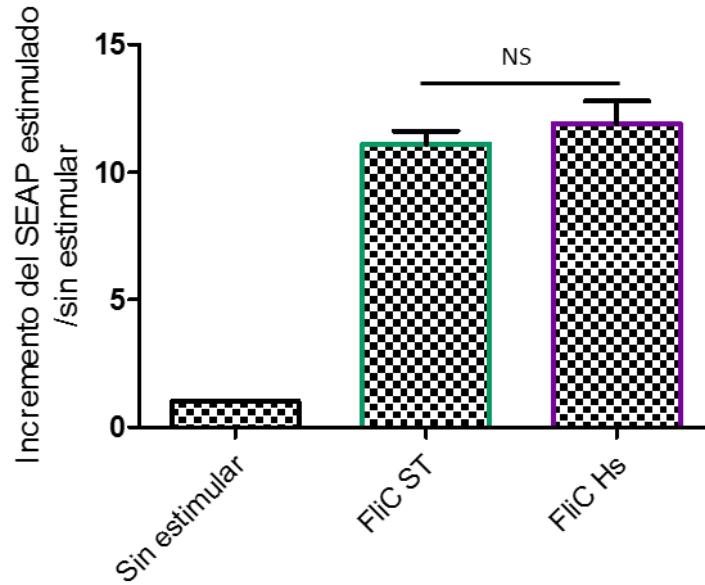


Figura 18. La línea reportera humana Hek-TLR5 de estimulada con 2 nM de flagelina de *S.Typhimurium* (FliC S.T, verde) o, 2 nM de FliC de *H.seropedicae* (FliC Hs, violeta). Se representa el incremento en unidades relativas de la producción de la fosfatasa embrionica alcalina secretada (SEAP) en las células estimuladas con las flagelinas, respecto a las células sin estimular. Las barras representan la media  $\pm$  SEM para n=3. El resultado es representativo de dos experimentos independientes y se determinó con el unpaired t test,  $p < 0,05$ . NS, no significativo.

A continuacion se decidió evaluar el nivel de expresión de genes proinflamatorios en la línea epitelial de pulmón A549. Ambas flagelinas fueron capaces de estimular esta línea epitelial humana, obteniéndose niveles de expresión similares de los genes proinflamatorios *Ccl20*, *Cxcl8*, *Cxcl1*, *IL6*, *Ccl5*, (Figura 19).

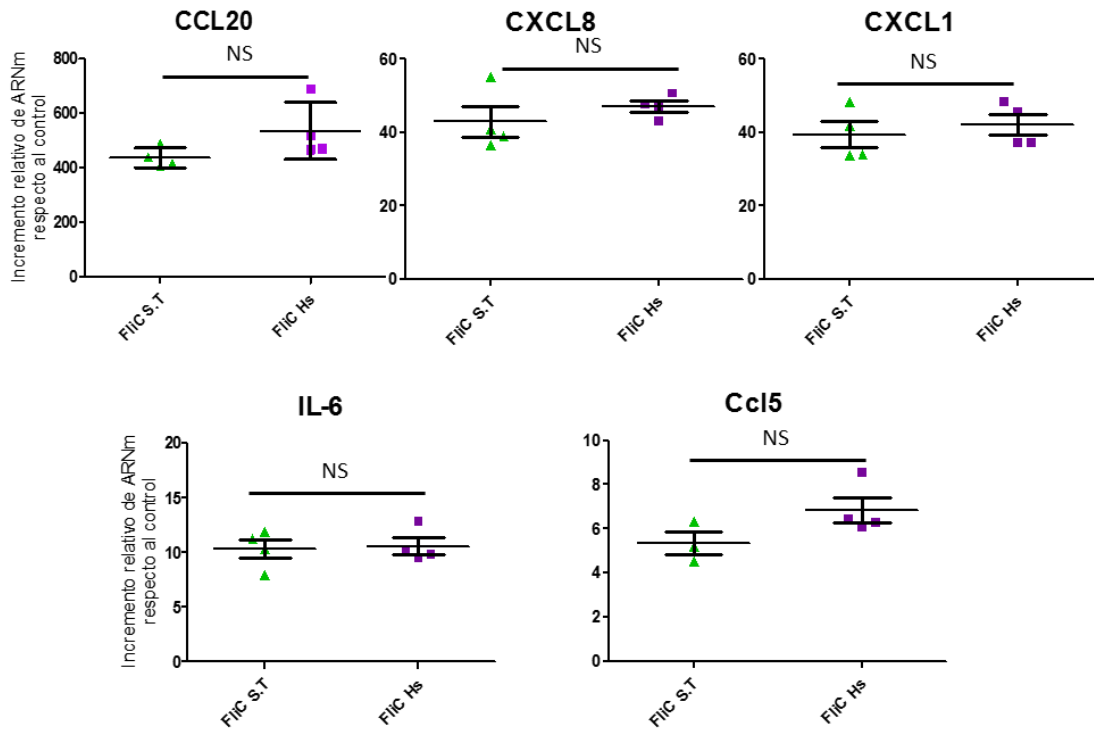


Figura 19. Análisis por qRT-PCR del perfil transcripcional de la línea epitelial A549 frente a la estimulación con las flagelinas de *S. Typhimurium* y *H. seropedicae*. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células/ml por pocillo en placas de 24 pocillos y se estimularon durante 2 horas con 2 nM de flagelina de *S.Typhimurium* (FliC ST) o con 2 nM flagelina de *H.seropedicae* (FliC Hs), La cuantificación relativa del ARNm se normalizó con el gen beta actina (*ACTB*) y se relativizó con la condición sin estimular, cada muestra por cuadruplicado con el test estadístico unpair  $p < 0,05$ . NS, no significativo.

### 3.2.5 Capacidad de flagelina de *H.seropedicae* de conferir protección en un modelo de infección pulmonar

Posteriormente, se evaluó la capacidad de flagelina de *H.seropedicae* de conferir protección frente a la infección causada por *S.pneumoniae*. Cabe mencionar que previamente se había evaluado la protección de flagelina de *S.Typhimurium* junto con *S.Dublin*, *S.Enteritidis* y *P.mirabilis* (ver Sección 3.1.3). Todas ellas confirieron protección entre un 80-100%, sin embargo la flagelina de *H.seropedicae* no fue capaz de proteger cuando se co-administró junto a la mínima dosis letal de *S.pneumoniae* ( $2 \times 10^4$  ufc/50  $\mu$ l) vía intranasal, (Figura 20).

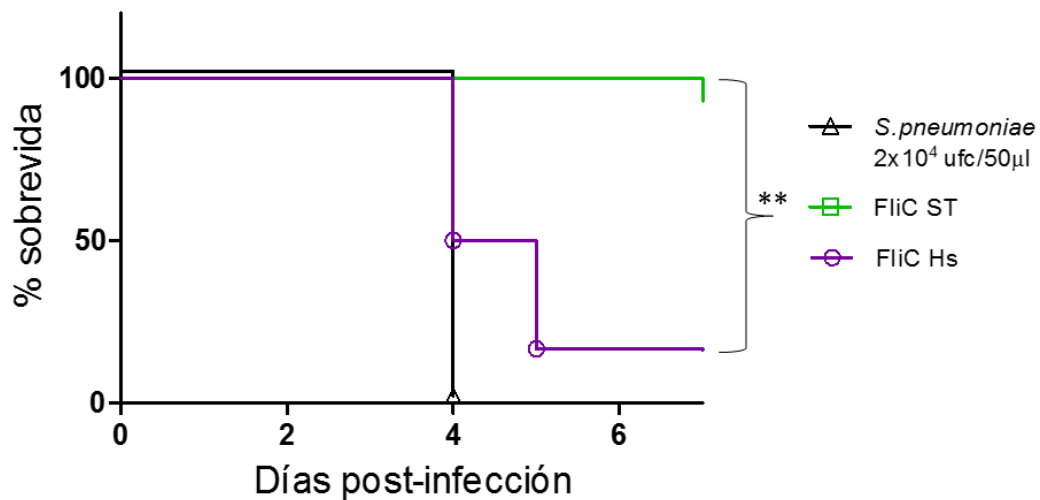


Figura 20. Evaluación de la capacidad protectora de las flagelinas frente a un desafío con *S.pneumoniae*. Ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad fueron co-administrados vía intranasal con 1 µg de FliC ST *Salmonella* Typhimurium (en verde) y 0,7<sup>#</sup> µg FliC Hs *Herbaspirillum seropedicae* (en violeta), junto a una dosis mínima letal de *S.pneumoniae* (2x10<sup>4</sup> ufc/50µl por ratón). Grupos de 6 animales/condición, representativo de dos ensayos independientes. Las curvas de supervivencia fueron evaluada con el test log-Rank (Mantel-Cox) y los asteriscos indican diferencias significativas  $p < 0.01$  (\*\*). # Se tuvo en cuenta la diferencia de peso molecular de ambas flagelinas para administrar la misma cantidad de moléculas de flagelinas/animal.

Como consecuencia de este resultado, en donde se observa una clara diferencia en la protección frente a la infección, se analizaron los niveles de expresión de genes proinflamatorios (*Ccl20*, *Cxcl1*, *IL1a*, *iNOS*), antiinflamatorios (*IL10*, *Tgfb*, *Foxp3*), péptidos antimicrobianos (*Lcn2* y *S100A9*) en los pulmones, que pudieran explicar en parte este resultado.

Por un lado, se analizaron a las 24 horas los pulmones de aquellos ratones que fueron administrados únicamente con cada flagelina. Dichos pulmones presentaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de los genes proinflamatorios *Ccl20* y *Cxcl1*, donde se observaron aumentos de 50 y 29 veces más, respectivamente, en los animales que recibieron FliC ST en comparación con los que recibieron la FliC Hs. Sin embargo

para el gen *IL1a* no hubo diferencias entre ambos grupos. Asimismo, los niveles de ARNm de los genes *Foxp3*, *Tgfb*, *S100A9* e *iNOS* no mostraron diferencias significativas entre las dos condiciones. Sin embargo para los genes *Foxp3*, *S100A9* e *iNOS* se puede observar una tendencia de mayor nivel de expresión en los animales que recibieron la flagelina de *S.Typhimurium*. Respecto a los genes *Lcn2* e *IL10* se observó un aumento significativo en los animales que recibieron la FliC ST respecto a los que recibieron FliC Hs, de 2.8 y 3.3 respectivamente, (Figura 21).

Por otro lado, se analizaron a las 24 horas los pulmones de aquellos ratones que recibieron por vía intranasal la co-administración de *S.pneumoniae* (Sp1) junto con cada flagelina, la FliC ST o la FliC Hs. Por PCR cuantitativa se midieron los niveles de ARNm de los genes *Ccl20*, *Cxcl1* e *IL1a*, donde *Ccl20* y *Cxcl1* se ven aumentado 35 y 26 veces más, respectivamente, en la condición FliC ST + Sp1 frente a FliC Hs + Sp1, mientras que para *IL1a* no se observaron diferencias significativas entre las dos flagelinas, (Figura 21). Con respecto a los genes *Foxp3*, *Tgfb* e *IL10* se observaron niveles similares en los ratones que recibieron ambas flagelinas co-administradas con Sp1. En lo que respecta a los péptidos antimicrobianos (*Lcn2* y *S100A9*) solo se observó un aumento significativo en los niveles de ARNm para *S100A9* en la condición FliC ST + Sp1 de 2.6 veces más con respecto a la condición FliC Hs + Sp1; mientras que el *iNOS* no presentó variación, (Figura 21).

Estos resultados en su conjunto muestran que la flagelina de *H.seropedicae* tiene una capacidad reducida de inducir un programa de expresión génica en pulmón, en comparación con la flagelina de *S.Typhimurium*. Además, cabe destacar que la administración intranasal de dicha flagelina sola, fue capaz de generar inducción en los genes evaluados, este resultado concuerda con trabajos previos de nuestro laboratorio [57] [88].

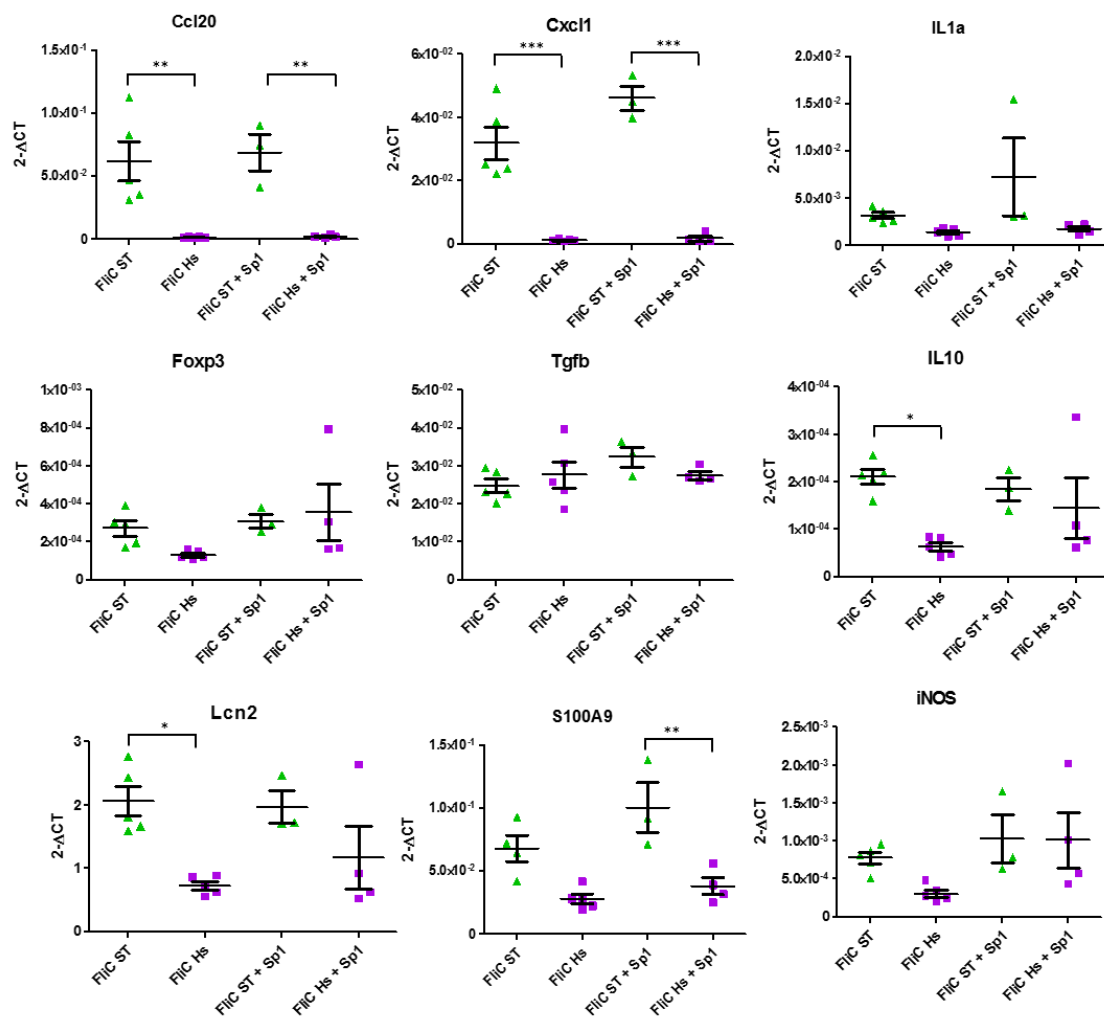


Figura 21. Análisis por qRT-PCR del perfil transcripcional de los pulmones estimulados con las flagelinas durante 24 hs. Ratones Balb/c de entre 8-12 semanas de edad, fueron estimulados con 1  $\mu\text{g}$  de flagelina de *S.Typhimurium* (FliC ST, verde) o con 0.7<sup>#</sup>  $\mu\text{g}$  de flagelina de *H.seropedicae* (FliC Hs, violeta). # Se tuvo en cuenta la diferencia de peso molecular de ambas flagelinas para administrar la misma cantidad de moléculas de flagelinas/animal. Los niveles de ARNm se normalizaron con los del gen beta actina (*ACTB*) y se expresó en forma de 2- $\Delta\text{CT}$  cada muestra, (5 animales por grupo). En paralelo, se co-administró 1  $\mu\text{g}$  (FliC ST) o .0.7  $\mu\text{g}$  (FliC Hs) con la mínima dosis letal de *S.pneumoniae* serotipo 1 ( $2 \times 10^4$  ufc/50  $\mu\text{l}$ ), los pulmones fueron extraídos 24 hs post administración y el análisis transcripcional se realizó de igual manera. En ambas condiciones, se aplicó el test estadístico ANOVA  $p < 0,05$ . (\*)  $p < 0,01$ , (\*\*)  $p < 0,0005$ , y (\*\*\*)  $p < 0,0001$ .



### 3.2.6 Curva de dosis respuesta de la flagelina de *H.seropedicae* en las líneas reporteras para TLR5 humana y murina.

Considerando lo sustancial de la diferencia encontrada entre las respuestas de los animales a la flagelina de *H.seropedicae* y la de *S.Typhimurium*, se realizó una curva de dosis respuesta para ambas flagelinas en la línea reportera TLR5 con el fin de evaluar si la estimulación por ambas flagelinas podrían variar dependiendo de la concentración y/o la especie (humana/murina), y por ende darle un explicación a las diferencias observadas entre los ensayos con la línea reportera TLR5, la línea epitelial A549 y el ensayo de protección en el modelo murino de infección respiratoria.

Las curvas de dosis respuesta en las líneas celulares (humana y murina) demuestran que ambas flagelinas fueron capaces de estimular el receptor TLR5 en ambas líneas, aunque se observó un mayor nivel de respuesta en la línea humana para todas las concentraciones (Figura 22).

Por otro lado, se pudo comprobar que ambas flagelinas señalizan por TLR5 en forma diferencial. FliC Hs señaló con igual intensidad que FliC ST a concentraciones iguales o mayores a 2 nM. Sin embargo en concentraciones menores a 2 nM los niveles de expresión génica son significativamente mayores en respuesta a la estimulación con flagelina de *S. Typhimurium*. Este resultado podría sugerir una menor afinidad por el receptor TLR5 de la flagelina de *H.seropedicae* respecto a la de *S.Typhimurium* (Figura 22).

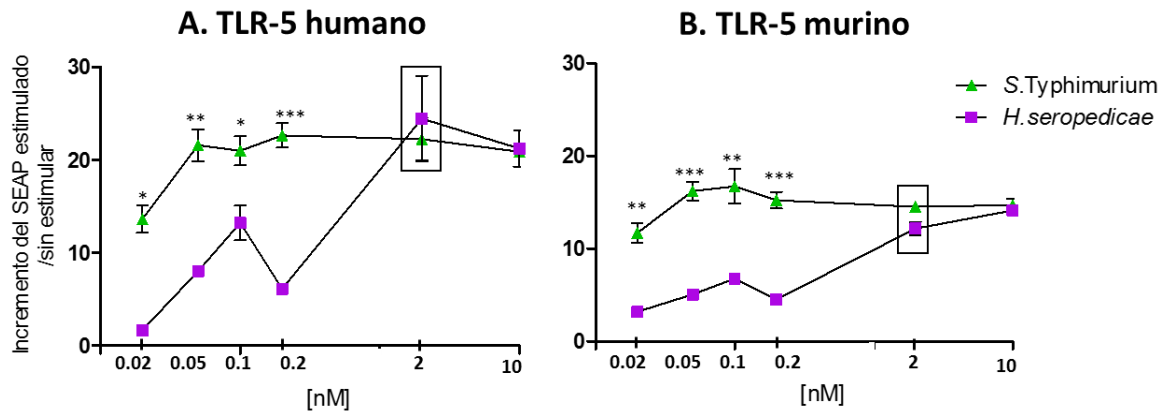


Figura 22. **A)** Dosis respuesta de la línea humana reportera para TLR5 estimulada con concentraciones crecientes de flagelina de *S. Typhimurium* (FliC *S.T.*, verde), o de *H. seropedicae* (FliC *Hs.*, violeta). Se representa el incremento en unidades relativas de la producción de la fosfatasa embrionica alcalina secretada (SEAP) en las células estimuladas con las flagelinas, respecto a las células sin estimular. Las barras representan la media  $\pm$  SEM para  $n=3$  de dos experimentos independientes, unpair t test,  $p < 0,05$ . (\*)  $p < 0,01$ , (\*\*)  $p < 0,001$ , y (\*\*\*)  $p < 0,0004$ . El  $\square$  representa la concentración 2 nM, ésta es la concentración que se utilizó en todos los ensayos previos *in vitro*. **B)** Dosis respuesta de la línea murina reportera para TLR5 en las mismas condiciones que las descritas para la línea humana.

### 3.3 Construcción de un sistema de expresión en *E. coli* con actividad endotóxica reducida.

#### 3.3.1 Inactivación del gen *msbB* por recombinación homóloga.

La correcta inserción del gen de resistencia al cloranfenicol en sustitución del gen *msbB*, que codifica para la enzima responsable del último paso de la síntesis del lípido A de la endotoxina (LPS), según protocolo descrito en Materiales y Métodos, se verificó por tres reacciones de PCR usando cebadores especialmente diseñados. El primer par de cebadores se diseñó para que hibride con parte del gen de resistencia al cloranfenicol y parte del gen adyacente (H1), el segundo par de cebadores con otra parte del gen de resistencia al cloranfenicol y parte del otro gen adyacente (H2). Y por último se amplificó todo el gen de resistencia a cloranfenicol con ambas regiones H1 y H2, (Figura 24). Como se observa en el gel de agarosa, cuando se usó ADN total de la cepa salvaje (WT) como molde de la PCR, no se amplificó ningún fragmento que contuviera el gen de resistencia a cloranfenicol, mientras que a partir de la construcción ( $\Delta msbB$ ) se amplificaron productos con los tamaños esperados para cada par de cebadores, (Figura 24).

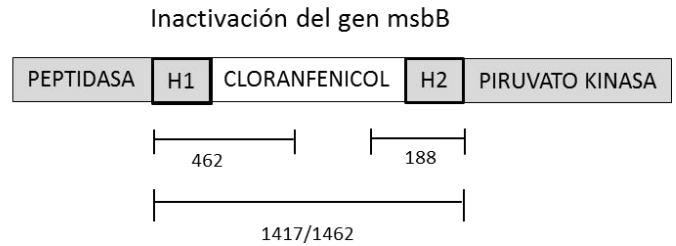
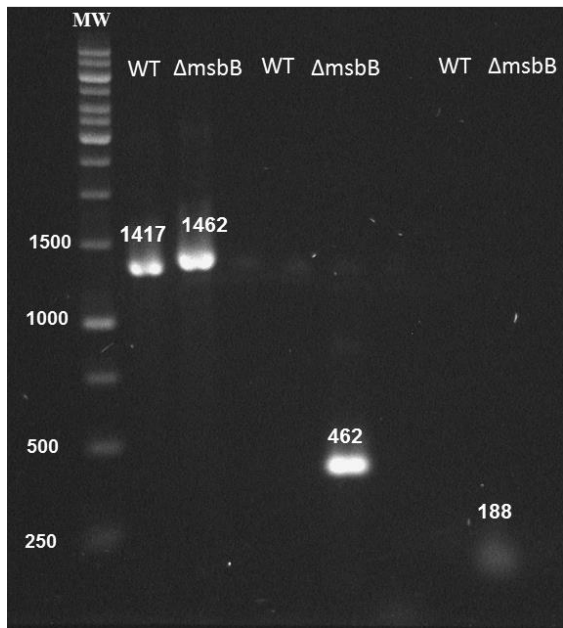


Figura 24- PCRs para verificar la construcción del mutante  $\Delta msbB$ . El gen *msbB* se inactivó por recombinación homóloga con el gen de resistencia al antibiótico cloranfenicol. Los fragmentos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 0,8 %. MW (marcador de peso molecular 1Kb, fermentas). WT *wild type*, cepa salvaje MC1061 y la cepa MC1061 mutada en el gen *msbB* ( $\Delta msbB$ ).

### 3.3.2 Análisis de la actividad proinflamatoria de la cepa $\Delta msbB$ *in vitro*.

Una vez verificada la construcción del mutante ( $\Delta msbB$ ) se realizaron curvas de crecimiento de la cepa salvaje MC1061 y la cepa mutante MC1061 $\Delta msbB$  en paralelo, (Figura 25A). Los resultados muestran que el mutante es viable pero tiene un crecimiento más lento que la cepa salvaje. A su vez, ambas cepas se inactivaron en fase exponencial para comparar por ensayos de dosis respuesta en una línea reportera para TLR4 (receptor que reconoce específicamente al LPS). En todas las concentraciones evaluadas se observaron diferencias significativas entre la señal generada por la cepa salvaje y la MC1061 $\Delta msbB$ , siendo esta última menor (Figura 25B).

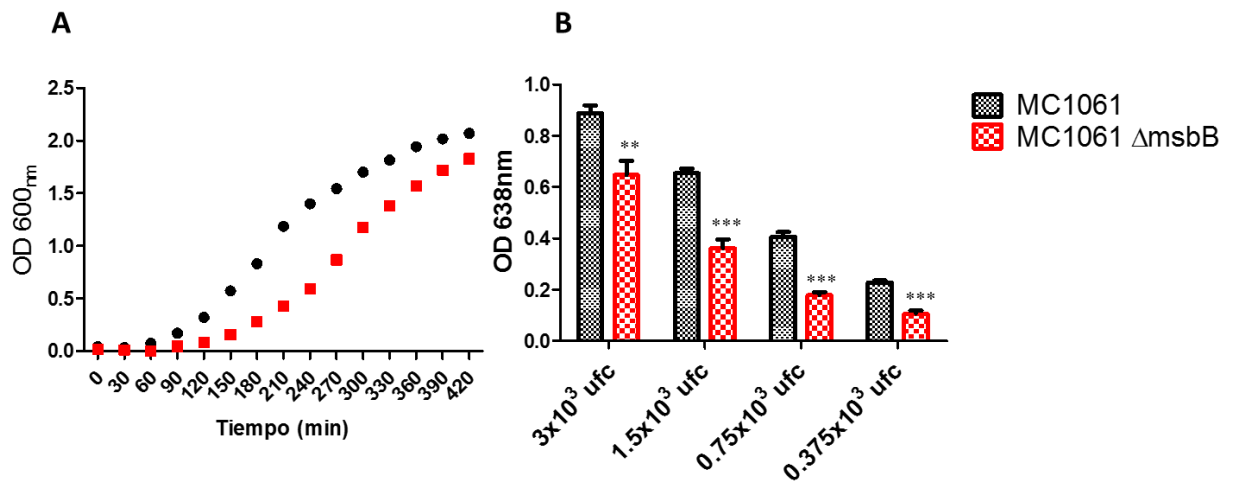


Figura 25- **A**) Curva de crecimiento de la cepa MC1061 WT y MC1061  $\Delta$ msbB en caldo LB. **B**) Dosis respuesta de la línea reportera TLR4 murina con ambas cepas. Las barras representan la media  $\pm$  SEM para un n=3, test estadístico unpar t test  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0.002$ , y (\*\*\*)  $p < 0.0001$ .

A su vez, se evaluó la actividad proinflamatoria de la cepa mutante en una línea celular de macrófagos humanos (THP1). La interacción del LPS con su receptor TLR4 genera una alta expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL6, IL1 $\alpha$ ; por lo cual se esperaba que la construcción con la modificación en el LPS generase menor expresión de estas citoquinas. Efectivamente, el ensayo mostró que los niveles de ARNm de las citoquinas mencionadas anteriormente fueron menores en la cepa mutante MC1061 $\Delta$ msbB con respecto a la cepa salvaje. La MC1061 $\Delta$ msbB indujo 2,2 veces menos expresión de ARNm para Tnfa, 9.6 veces menos para IL6 y 4.2 veces menos para IL1 $\alpha$ , comparado con la cepa salvaje MC1061 WT (Figura 26). Este resultado junto con el de la línea reportera para TLR4, verifican la menor capacidad proinflamatoria que presenta la cepa construida en este trabajo.

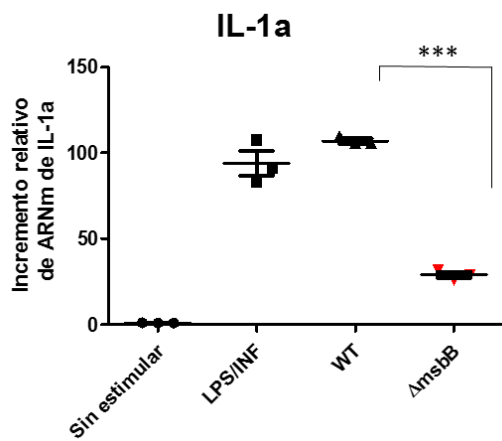
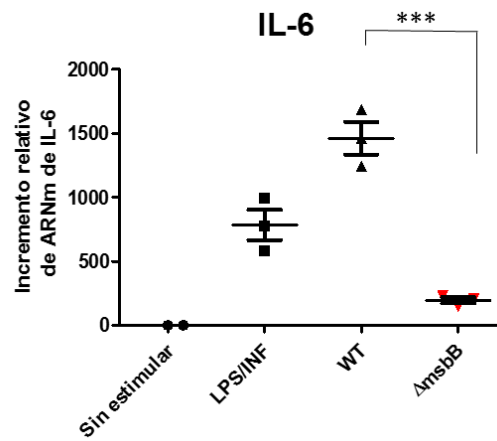
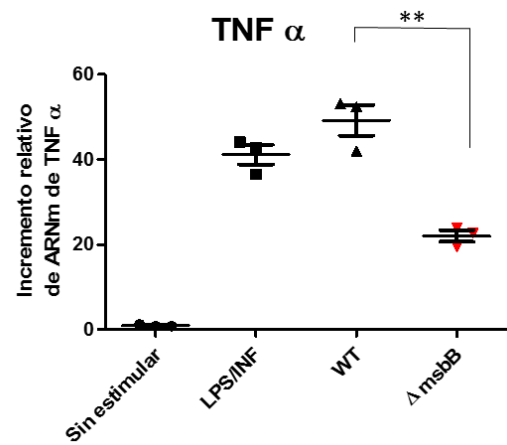


Figura 26- Actividad proinflamatoria de la cepa MC1061 $\Delta msbB$  en la línea de macrófagos humanos (THP-1). Los macrófagos se estimularon con las cepas MC1061 salvaje (WT) y la MC1061  $\Delta msbB$  en una relación 10:1 durante 2 y 4 horas. Los niveles de ARNm de *Tnfa* e *IL1a* se midieron a las 2 hs e *IL6* a las 4hs. La cuantificación relativa del ARNm se normalizó con el gen 2-beta microglobulina y se relativizó con la condición sin estimular, cada muestra por triplicado, test estadístico unpair t test  $p < 0,05$ . , (\*\*\*)  $p < 0.002$ , y (\*\*\*)  $p < 0.0001$ . El LPS (200 ng/ $\mu$ l) e  $IFN\gamma$  (4000 U/ml) se utilizaron como control positivo.

### 3.3.3 Análisis de la expresión de proteínas heterólogas en la cepa $\Delta msbB$ .

Una vez verificada la reducción de la actividad proinflamatoria de la cepa  $\Delta msbB$ , con respecto a la cepa MC1061 WT, se procedió a determinar la capacidad de la cepa  $\Delta msbB$  de producir proteínas heterólogas en comparación con la cepa WT. Para ello se utilizaron plásmidos de expresión conteniendo los genes para tres proteínas de diferentes especies (proteína de *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum* y una proteína priónica de ciervos). A nivel cualitativo se observó menor intensidad de banda para las tres proteínas producidas en el mutante respecto a la cepa parental, sin embargo los niveles de proteínas heterólogas obtenidos en el mutante son muy buenos. Este resultado verifica que la cepa MC1061 $\Delta msbB$  es capaz de producir distintas proteínas heterólogas en buenas cantidades (Figura 27). Cabe mencionar que en los geles se cargaron cantidades constantes de extractos proteicos totales de cada condición.

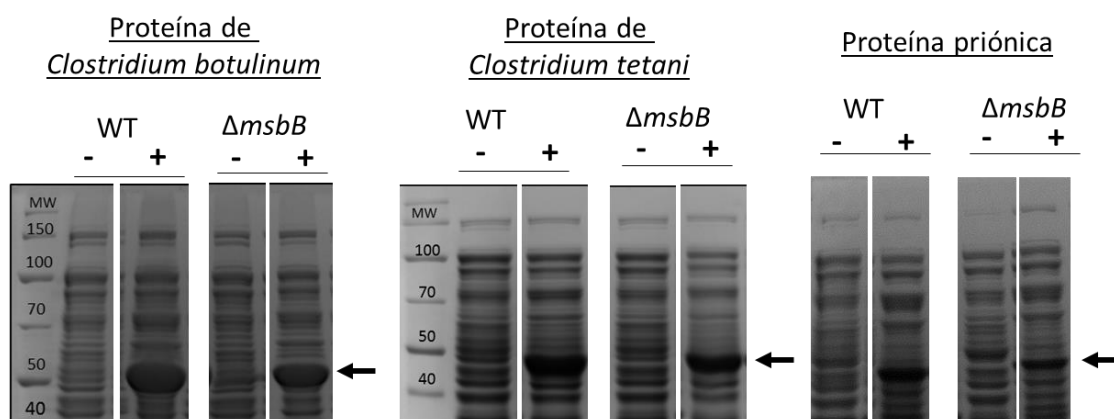


Figura 27- Análisis del nivel de expresión de proteínas heterólogas en la cepa  $\Delta msbB$ . Se expresaron las proteínas de *Clostridium botulinum*, *tetani* y una proteína priónica, en la cepa salvaje MC1061 y en la cepa mutante  $\Delta msbB$ . Todos los cultivos se indujeron en fase exponencial con 0.2% de arabinosa durante 3 hs. y se analizaron en geles de acrilamida/bisacrilamida al 10%. (-/+), condición sin inducir/inducida.

La construcción de esta cepa con actividad endotóxica reducida permitió expresar la flagelina de *Herbaspirillum seropedicae* para este trabajo, pero además es una cepa que queda disponible para futuros trabajos de expresión de proteínas recombinantes con aplicaciones para uso terapéutico.



## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Estudio comparativo de distintas flagelinas de origen gammaproteobacteria.

*Salmonella* es una bacteria gram negativa y pertenece a la clase  $\gamma$ -proteobacteria, el flagelo representa uno de los determinantes importantes en la patogenicidad de esta bacteria. Su principal componente, la flagelina, puede ser reconocida por receptores de la inmunidad innata y desencadenar cascadas de señalización para producir citoquinas/quimioquinas al igual que péptidos antimicrobianos. Dentro de la especie *Salmonella enterica* se encuentran aproximadamente 50 serovares que son patógenos de humanos y animales. La flagelina del serovar Typhimurium ha sido ampliamente estudiada para aplicaciones terapéuticas (adyuvante, carrier de vacunas e inmunoestimulante).

Dentro de nuestro grupo de trabajo se han comparado a nivel genómico las diferencias entre los serovares: Enteritidis y Dublin de *Salmonella enterica*. Estos se encuentran estrechamente relacionados a nivel genómico pero presentan claras diferencias en la patogenicidad y epidemiología, siendo Dublin mucho más invasivo tanto en humanos como en el modelo murino, mientras que a nivel epidemiológico Enteritidis es mucho más prevalente que Dublin en humanos. Ambos serovares comparten 3771 secuencias codificadoras (CDS, del inglés coding sequence), aunque 33 son exclusivas de Enteritidis y 87 están presentes solo en Dublin. A su vez, presentan diferencias en la cantidad de pseudogenes (genes inactivos), 177 están presentes en Dublin mientras que esos mismos están activos en Enteritidis [91].

Más allá de estas claras evidencias a nivel genómico que podrían explicar en parte el comportamiento diferencial de ambos serovares, hasta el momento no se ha evaluado si determinantes moleculares como la flagelina, que presentan ciertas diferencias entre ellas a nivel aminoacídico en la región variable, pueden inducir una respuesta inmune diferencial que contribuya a explicar las diferencias a nivel patogénico y epidemiológico entre ambos serovares.

A su vez, previamente en nuestro grupo de trabajo se evaluó la protección generada por la administración intranasal de FliC de *S.Typhimurim* en un modelo de infección letal con *Streptococcus pneumoniae*. En este estudio, se observó una fuerte respuesta proinflamatoria en pulmones, con reclutamiento de neutrófilos y protección frente a la infección letal en ratones que recibieron dicha flagelina, protección que se anula si se administra una flagelina mutante que carece de los aminoácidos claves para la señalización por TLR5 (89-96). Este resultado subraya la importancia de la señalización por TLR5 en la protección observada inicialmente [57]. Estos antecedentes sentaron las bases de este trabajo para comenzar un estudio comparativo y más detallado de las flagelinas de los serovares Enteritidis y Dublin.

Por un lado, en la línea epitelial de intestino humano CacoCCL20-Luc reportera para el gen *Ccl20*, tanto la flagelina de *S.Dublin* como la de *S.Enteritidis*, produjeron similares niveles de estimulación inclusive comparables a los de la flagelina de *S.Typhimurium*. Además, en la línea epitelial pulmonar humana A549 ambas flagelinas (FliC SD y FliC SE) generaron niveles similares tanto en la expresión de genes proinflamatorios (*Ccl20*, *Cxcl1*, *Cxcl8*) como del péptido antimicrobiano (*Lcn2*) y el regulador del factor de transcripción NF-κB (*A20*).

Por otro lado, se probaron en el modelo murino de infección con *S.pneumoniae*, y ambas fueron capaces de generar protección al igual que la flagelina de *S.Typhimurium*. Todos estos resultados sugieren que a pesar de que la flagelina es un factor determinante en la patogenicidad de *Salmonella*, no estaría implicada en las diferencias observadas entre los serovares Dublin y Enteritidis.

Varios trabajos han evaluado a la flagelina como inmunomoduladora en distintos modelos de infección. El pretratamiento intranasal con flagelina de *Pseudomonas aeruginosa* ( $\gamma$ -proteobacteria) generó protección en un modelo de neumonía con una dosis letal de la misma bacteria [92]. A su vez, en otro trabajo se demostró la protección inducida por administración de flagelina de *S.Typhimurium* ( $\gamma$ -proteobacteria) en un modelo de colitis provocada por *Clostridium difficile*. La administración intraperitoneal de la flagelina generó protección y redujo la pérdida de células epiteliales, manteniendo así la integridad del intestino durante la infección [93]. Otro estudio destaca la protección por parte de flagelina de *S.Typhimurium* no solo en infecciones bacterianas, sino también frente a químicos, virus y radiación [94].

Estas evidencias junto con la protección demostrada en este trabajo en el modelo murino de neumonía usando FliC de otros serovares de *Salmonella* (Dublin, Enteritidis) afirman el potencial que presenta la flagelina de bacterias pertenecientes a la clase  $\gamma$ -proteobacterias como inmunoprotectora en un modelo de infección respiratorio.

En ese sentido, cabe destacar que también evaluamos la flagelina de otra  $\gamma$ -proteobacteria (*P.mirabilis*) y presentó similar nivel protector que las flagelinas del género *Salmonella*. Sin embargo el grupo de Scavone y colaboradores, previamente evaluaron dicha flagelina tanto como antígeno protector y como adyuvante en la co-inmunización con MrpA (una subunidad estructural de la fimbria de *P.mirabilis*) en un modelo de infección del tracto

urinario. En dicho trabajo la administración intranasal de flagelina de *P.mirabilis* sola o combinada con MrpA no fue capaz de generar protección ni títulos de anticuerpos anti-FliC detectables en suero y orina. Además, la administración de flagelina en conjunto con MrpA neutralizó el rol protector generado por MrpA sola en el modelo de infección urinaria ascendente. Lo interesante fue que observaron niveles altos de IL10 (citoquina antiinflamatoria) en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos, obtenidos 7 días luego de la última inmunización de los animales con la flagelina, y estimulados *in vitro* con dicha proteína, lo que según los autores podría dar indicios de un rol inmunosupresor de esta flagelina [60]. Cabe mencionar que debido a que en nuestro modelo murino la flagelina de *P.mirabilis* confirió protección, no se determinaron niveles de ARNm del gen *IL10* en pulmones. A su vez en la línea epitelial de pulmón A549 ya había antecedentes de nuestro grupo, en los cuales no se logró detectar ARNm para *IL10* ni en condiciones basales ni frente a la estimulación con FliC ST, [88]. Considerando estos datos en conjunto con los obtenidos en este trabajo podemos sugerir que la actividad protectora de la flagelina de *P. mirabilis* depende fuertemente del modelo de patología empleado.

## 4.2 Estudio comparativo de flagelinas de especies bacterianas pertenecientes a las clases $\alpha$ y $\beta$ -Proteobacteria.

Luego de evaluar las flagelinas de *Salmonella* y *Proteus*, todas de la clase  $\gamma$ -Proteobacterias, y habiéndose observado similares comportamientos tanto *in vitro* como *in vivo*, se decidió evaluar otras clases de bacterias como *Mesorhizobium* ( $\alpha$ -proteobacteria), *Ralstonia*, *Delftia* y *Herbaspirillum* ( $\beta$ -proteobacterias) en la línea reportera para TLR5. *Mesorhizobium* no señaló significativamente con respecto a la condición sin estimular, este resultado es esperable si se tiene en cuenta que la secuencia de flagelina en dicha bacteria carece de los residuos clave para el reconocimiento por TLR5. *Ralstonia*, a pesar de ser una  $\beta$ -Proteobacteria al igual que *Delftia* y poseer los residuos clave para el reconocimiento por TLR5, no señaló significativamente con respecto a la condición sin estimular en comparación con *Delftia*, que estimuló la línea reportera de forma similar a *Salmonella* (Figura 15). Cabe destacar que a nivel de secuencia la flagelina de *Ralstonia* presenta mayor divergencia en la región 89-114 respecto a la de *S.Typhimurium* que la de *Delftia* (Figura 12).

La estimulación de la línea reportera para TLR5 con la bacteria *Herbaspirillum seropedicae* inactivada, presentó una diferencia significativa con respecto a las células sin estimular y menor señal que la observada en las células estimuladas con la cepa de *Salmonella*. Cabe mencionar que en este ensayo, si bien se agregaron las mismas cantidades de ufc (inactivadas) de cada cepa, no se cuantificó la cantidad de flagelina presente en cada una de ellas por carecerse de anticuerpos específicos, por lo tanto la diferencia de señal que se observa puede ser debida a la cantidad de flagelina producida en cada cepa en ese momento. En la bacteria *Herbaspirillum* está descrita la presencia de uno a tres flagelos en uno o ambos polos, mientras que *Salmonella* es una bacteria que

posee múltiples flagelos (un promedio de seis por célula) peritrico [80] [95]. De todos modos, este resultado sirvió para demostrar que la flagelina de *H.seropedicae* era capaz de estimular la línea reportera para TLR5, lo que resulta esperable ya que presenta los aminoácidos importantes para el reconocimiento por TLR5, pero no generó el mismo nivel de estimulación que *Salmonella* en esas condiciones. En base a este resultado, se inició la extracción de la flagelina de *Herbaspirillum*, de manera similar a como se habían extraído las flagelinas de *Salmonella*, para poder así evaluarla en comparación con la flagelina de *Salmonella* Typhimurium. Se utilizó el mismo protocolo de extracción que el usado para preparar flagelina de *Salmonella*, pero la cepa *H.seropedicae* presenta menor cantidad de flagelos lo que dificultó su extracción en cantidad y pureza similares a las obtenidas con la flagelina de *Salmonella* [80] [95]. En base a este resultado, se decidió clonar el gen *fliCHs* en vectores de expresión para producirla de forma recombinante. Se realizaron dos construcciones, una en la cual la proteína se expresa fusionada a una cadena de Histidina en el extremo N-terminal y la otra en la que se expresa como fusión a GST (Glutation-S-Transferasa). En ambas construcciones la proteína recombinante se produjo en buena cantidad pero se presentaron problemas en la purificación con GST, como se mencionó anteriormente, por lo cual se prosiguió con la otra construcción.

Tanto en la línea reportera humana para TLR5 como en la línea epitelial de pulmón A549, la estimulación con flagelinas de ambas especies generó respuestas similares a una concentración de 2 nM (esta concentración fue la utilizada en los ensayos con las otras flagelinas, sección 3.1), indicando que FliC Hs es reconocida por este receptor, altamente conservado en los vertebrados. Este resultado es muy interesante, considerando que *H.seropedicae*, es una bacteria endófito de plantas fijadora de nitrógeno, y en plantas nose ha descrito la presencia de receptores tipo TLR5. Este resultado es interesante ya que las

plantas no presentan receptores tipo TLR5. Se ha reportado que en plantas, el receptor de defensa FLS2 (receptor tipo quinasa) que presenta un repetido de Leucinas es capaz de reconocer a la flagelina bacteriana, aunque lo hace a través de una región distinta a la de reconocimiento por TLR5 [96].

Sin embargo el resultado más llamativo se presentó en los ensayos de protección en el modelo de infección con *S.pneumoniae*, donde la flagelina de *H.seropedicae* no fue capaz de proteger como la de *S.Typhimurium* a la misma dosis, a pesar de ser reconocida por TLR5. Realizando una curva de dosis respuesta en las líneas reporteras para TLR5 humana y murina, se observó una mayor señal en las células estimuladas con la flagelina de *S.Typhimurium*, en ambas líneas y en todas las concentraciones menores a 2 nM. Este resultado nos permite hipotetizar que la flagelina de *H.seropedicae* posee menor afinidad por TLR5 que FliC ST y explicar así lo observado *in vivo*. Hipotetizamos que, quizás aumentando la dosis de FliC Hs, se podría obtener una respuesta inflamatoria protectora en el pulmón que resulte en protección. Este análisis queda como perspectiva de este trabajo.

En trabajos de mutagénesis dirigida, Smith y colaboradores determinaron los aminoácidos claves de FliC de *S. Typhimurium* para su reconocimiento por TLR5: Leucina (L<sub>88</sub>), Glutamina (Q<sub>89</sub>), Arginina (R<sub>90</sub>), Leucina (L<sub>94</sub>), Glutamina (Q<sub>97</sub>), Asparagina (N<sub>100</sub>) Ácido glutámico (E<sub>114</sub>), todos se localizan dentro de las dos  $\alpha$ -hélices del dominio D1, (Figura 3) [49]. Además, este mismo grupo ha estudiado la capacidad de flagelinas de distintas especies bacterianas para ser sensadas por TLR5 [59]. En ese trabajo determinaron que flagelinas de bacterias pertenecientes a la clase de las  $\gamma$ -Proteobacterias generaban señales al estimular las células CHO (del inglés *Chinese Hamster Ovary*) reporteras para TLR5, mientras que otro grupo de bacterias pertenecientes a las  $\epsilon$ -Proteobacterias como el caso de *Campylobacter jejuni*

*Helicobacter pylori*, no eran capaces de activar dicha línea reportera. Más en detalle, observaron que estas diferencias eran principalmente consecuencia de algunos cambios de aminoácidos en el dominio D1. Mientras que la secuencia consenso de las  $\beta/\gamma$ -Proteobacterias  ${}_{88}\text{LQRIRELAVQA}_{98}$ , en las  $\epsilon$ -Proteobacterias cambia por  ${}_{88}\text{LDTIKTKATQA}_{98}$ . La región (89-114) en el dominio D1 del extremo N-terminal es esencial para la activación del TLR5, sin embargo los autores también resaltaron la importancia que tiene el dominio D0-D1 del extremo C-terminal y la región hipervariable (D2 y D3) en el correcto reconocimiento para la activación. Para ello, llevaron a cabo construcciones quimeras de los dominios de las flagelinas de *S.Typhimurium* y *H.pylori*. En dicho trabajo, la quimera conteniendo el dominio D0-D1 N- y C- terminal de FliC de *S.Typhimurium* y la región hipervariable D2-D3 de la flagelina de *H.pylori*, activó TLR5, pero se requirió una dosis mayor respecto a la flagelina salvaje de *S.Typhimurium* para generar la misma señal de inducción [59]. Esto demuestra que, si bien los residuos que interaccionan directamente con el receptor se encuentran en las regiones constantes, la identidad de la región hipervariable también ejerce influencia sobre dicha unión.

Es importante destacar que los aminoácidos claves para el reconocimiento por TLR5 también participan en las interacciones moleculares entre monómeros de flagelina para formar el filamento flagelar, esencial para la motilidad bacteriana, por tanto esa región necesariamente estará conservada. Consecuentemente, las flagelinas de bacterias de las clases  $\alpha$  y  $\epsilon$ - Proteobacteria, en las cuales los residuos descritos como esenciales para el reconocimiento por TLR5 no se conservan respecto a las  $\gamma$ -Proteobacterias y por tanto no son reconocidas por este receptor, presentan a su vez cambios aminoacídicos compensatorios en otra región (I<sub>411</sub>, K<sub>58</sub>, G<sub>59</sub>), que en la estructura tridimensional de la proteína se encuentran cercanos a los primeros, manteniendo así la función de motilidad [59].



Teniendo en cuenta el alineamiento de FliC Hs y FliC ST, se puede observar que en la región de reconocimiento por TLR5 hay diez cambios aminoacídicos en la secuencia de FliC Hs respecto a la de *S.Typhimurium* (Figura 28). Estos son treonina por alanina (T<sub>77</sub>→A), ácido glutámico por treonina (E<sub>83</sub>→T), asparagina por glicina (N<sub>85</sub>→G), asparagina por ácido aspártico (N<sub>86</sub>→G), serina por alanina (S<sub>98</sub>→A), serina por glicina (S<sub>101</sub>→G), glutamina por alanina (Q<sub>105</sub>→A), serina por glutamina (S<sub>106</sub>→Q), leucina por arginina (L<sub>108</sub>→R), ácido aspártico por lisina (D<sub>109</sub>→K), alanina por ácido aspártico (A<sub>113</sub>→D). Esos cambios drásticos en las propiedades de los aminoácidos, aunque no sean en los residuos claves para la interacción con TLR5 descritos previamente (marcados con \*), podrían sin embargo llegar a modificar a nivel estructural la región de reconocimiento y por tanto cambiar la afinidad de FliC Hs por el receptor TLR5. Asimismo se han reportado otros aminoácidos importantes en el extremo C-terminal del dominio D1 de FliC ST (I<sub>411</sub>, D<sub>412</sub>, L<sub>415</sub>, T<sub>420</sub>, L<sub>425</sub>, R<sub>431</sub>) que contribuyen en el correcto reconocimiento por TLR5 [49]. En la secuencia de FliC Hs los aminoácidos equivalentes no representan grandes cambios (en comparación con lo observado en la región 89-114) en las propiedades de los aminoácidos que pueda sugerir a priori un cambio estructural de la proteína, y como consecuencia una mayor/menor contribución en cuanto a la afinidad de FliC Hs por TLR5 (\*, aminoácidos importantes en el C-terminal del D1, Figura 29). En este sentido, el análisis de la constante de afinidad entre TLR5 y las respectivas flagelinas purificadas (ST o Hs) podría brindar mayor información.

```

                                     90  94  97  100                                114
                                     .....*****.....
gi|16765297 |S.Typhimurium  GISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEI
gi|502999079 |H. seropedicae GISMAQTAEGALSTVGDNLQRMRELAVQAANGTNSAQDRKTLNDEYTQLSQEV

```

Figura 28- Alineamiento de la región de reconocimiento por TLR5 Nt-(88-114) de las flagelinas de *S.Typhimurium* y *H.seropedicae*. Ambas secuencias presentan los aminoácidos necesarios para la activación de TLR5 (\*, aminoácidos descritos para la activación de TLR5). Sin embargo, hay 10 aminoácidos que cambian sustancialmente en la flagelina de *H.seropedicae*. Las secuencias fueron alineadas en ProbCons y Clustal Omega.

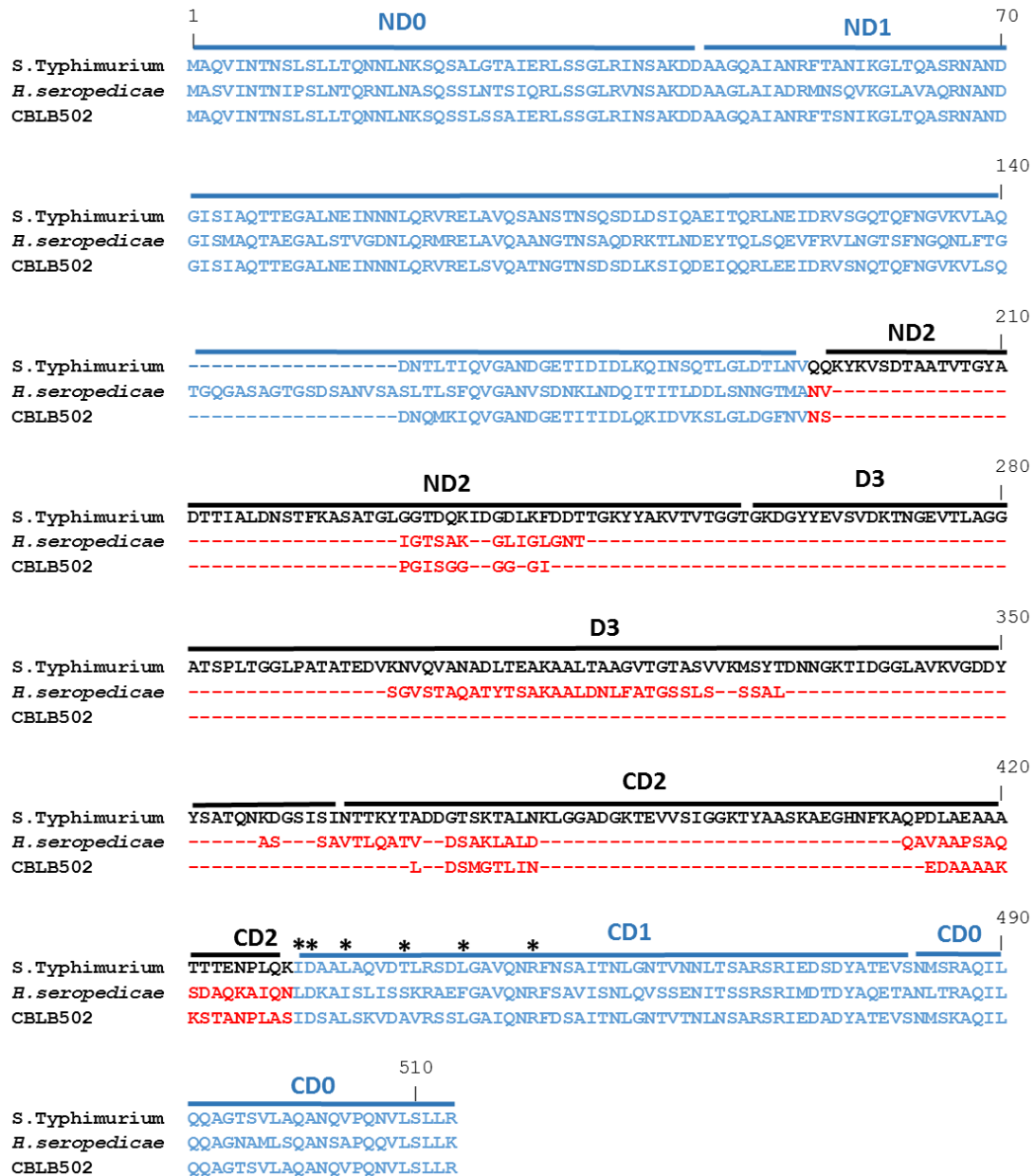
El reconocimiento entre flagelina y TLR5 se da con la formación del complejo TLR5:FliC que subsecuentemente dimeriza con otro complejo TLR5:FliC en una relación estequiométrica 2:2. Recientemente se ha reportado que el receptor TLR11, presente solo en murinos, también es capaz de reconocer a la flagelina de *S.Typhimurium* [97], [98]. Esta posibilidad de combinación entre ambos receptores quizás pueda explicar lo observado *in vivo*, en donde rearrreglos de los receptores (homo y heterodímeros) disminuyan y/o aumenten la afinidad dependiendo del tipo de flagelina. Asimismo el glicolípido asialoGM1, ha sido propuesto como receptor inicial en el reconocimiento de la flagelina de *Pseudomonas aeruginosa* en la línea epitelial de pulmón [99], [100]. Según los autores esta interacción inicial de AsialoGM1 con flagelina activaría las vías MAPK y NF-κB en las células epiteliales para la movilización del receptor TLR5 a la superficie apical, y así amplificaría aún más la respuesta. Estos datos podrían apoyar la hipótesis de que la flagelina de *H.seropedicae* presentara una menor afinidad por esta molécula reportada o inclusive por otros co-receptores que aún no hayan sido descritos, que justifiquen la menor respuesta a la administración de flagelina de *H.seropedicae* observada en el modelo *in vivo*.

Existen varios reportes de PAMPs que pueden actuar de forma específica dependiendo de la especie del hospedero, como es el caso del TLR2 humano que puede distinguir entre péptidos tripalmitoilados y trilauroilados, pero su homólogo murino no es capaz de distinguir entre esas dos estructuras, [101]. A su vez el TLR4 humano distingue entre la estructura penta- y hexacylada del lípido A de *P.aeruginosa*, mientras que el TLR4

murino no es capaz de dicha discriminación [102]. Otro ejemplo se observa en el TLR9 murino y humano, los cuales reconocen distintos motivos sintéticos CpG [103]. Estas evidencias demuestran que es posible observar diferencias en el reconocimiento por parte de receptores de tipo toll de humano y murino. La flagelina de *H.seropedicae* no presenta gran parte de la región hipervariable, eso genera de por si una diferencia de peso molecular de 13 KDa con respecto a la flagelina de *S.Typhimurium*, y eso también puede influir a nivel espacial en el preciso reconocimiento por parte del receptor TLR5 murino y/o posibles co-receptores asociados.

La flagelina se ha estudiado como adyuvante, inmunostimulante, carrier de vacunas, y generalmente se han utilizado flagelinas pertenecientes a especies patógenas de humanos de la clase  $\gamma$ -proteobacterias (*Salmonella Typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio vulnificus*). En este trabajo se analizaron flagelinas de otras especies, no evaluadas hasta el momento en modelos animales, como la  $\beta$ -proteobacteria *H.seropedicae*, en donde se observó una diferencia a nivel *in vivo* en la capacidad de generar respuesta inflamatoria y protección frente a un patógeno respiratorio. Además, datos obtenidos *in vitro*, sugieren que esta proteína tiene capacidad de ser sensada por TLR5, pero con menor afinidad que la de *S. Typhimurium*. En base a todos estos resultados, queda la perspectiva de profundizar en la flagelina de *H.seropedicae* para aplicarla a otros usos terapéuticos, en los cuales puede ser necesaria la generación de un entorno inflamatorio menos intenso que el generado por FliC de ST. En la literatura se han reportado varios trabajos realizados con una flagelina de *S.Dublin* modificada a la cual se le quitó la región hipervariable (denominada CBLB502 por la Biofarmacéutica Cleveland BioLabs, Inc), y se evaluó su potencial uso como radioprotector y en inmunoterapias aplicadas al cáncer en modelos murinos y primates [32]–[34], [104]–[107]. Remarcablemente, el alineamiento de secuencia de la proteína

CBLB502 con la flagelina de *H.seropedicae* muestra una gran similitud, inclusive se puede observar la falta de la región hipervariable en ambas (D2 y D3), (Figura 29). Esto es interesante, dado que la región hipervariable está relacionada con el reconocimiento antigénico y la activación de la inmunidad adaptativa, y se considera la región más tóxica para la utilización de flagelina como molécula terapéutica en vacunas o adyuvante.



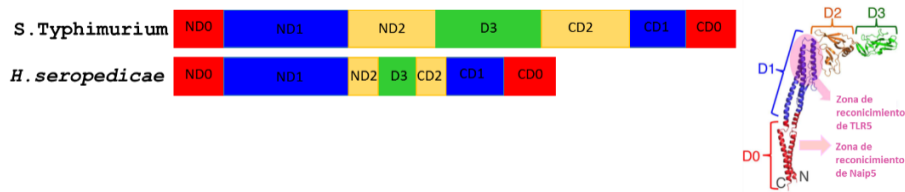


Figura 29- Alineamiento de las secuencias de flagelinas de *S. Typhimurium*, *H. seropedicae* y CBLB502 y esquema representativo de las regiones (D0/D1/D2/D3) de cada flagelina. Dentro del alineamiento, en azul se muestran las regiones conservadas N- y C-terminal (D0 y D1) y en rojo la similitud de la región hipervariable (D2 y D3) entre *H. seropedicae* y CBLB502.

### 4.3 Construcción de un sistema de expresión en *E. coli* con actividad endotóxica reducida

En paralelo al trabajo realizado con las flagelinas, se construyó una cepa modificada en el LPS con menor actividad endotóxica.

Por un lado sirvió para producir la flagelina de *H. seropedicae*, que por problemas de cantidad y pureza no se podía obtener de la propia cepa como se había logrado con las demás flagelinas. Cabe mencionar que toda la construcción del mutante fue realizada en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  y que luego se intentó la transducción con el fago P1 a la cepa *E. coli* BL21. Una de las razones fue para evitar posibles mutaciones adicionales que se hayan generado en la cepa inicial por tener la recombinasa del fago lambda. Y la otra razón para tener este mutante en la cepa BL21 que es donde se produce la mayoría de las proteínas recombinantes con fines terapéuticos. Se hicieron varios intentos para hacer la transducción a las cepas *E. coli* BL21 y *E. coli* MC1061 y solo se logró transferir a la cepa MC1061.

Con respecto a la reducción de la actividad proinflamatoria en la cepa MC1061 $\Delta$ *msbB* se observaron menores niveles de expresión de *Tnfa*, *IL6*, *IL1a* y una menor señalización en la línea reportera para TLR4. La modificación del lípido A hexacilado a pentacilado generó una disminución en el reconocimiento del receptor TLR4, resultado similar a lo que ya se ha observado en otros trabajos con otras modificaciones en el lípido A, [69-72].

La producción de proteínas recombinantes en sistemas de expresión de bacterias como la *E.coli* es de gran interés en la industria biofarmacéutica, por los bajos costos y con altos rendimientos de producción. Sin embargo una importante desventaja es la presencia del LPS en las muestras, ya que la eliminación del mismo requiere tratamientos de purificación que encarecen los costos a nivel industrial y a veces no son aplicables a todas las proteínas recombinantes purificadas. Inclusive ningún tratamiento es totalmente efectivo y las trazas de LPS, no son detectadas por los sistemas de cuantificación como el LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*). Por lo tanto la estrategia de generar cepas que produzcan proteínas recombinantes de uso terapéutico con trazas de LPS pero con menor actividad endotóxica es interesante para mejorar la seguridad en esas muestras en uso terapéutico.

## 5. CONCLUSIONES

### 5.1 Estudio comparativo de distintas flagelinas de origen gammaproteobacteria.

En el contexto de este trabajo se intentó caracterizar tanto *in vitro* como *in vivo*, flagelinas de la misma especie y distintos serovares como el caso de *Salmonella* u otra especie como *Proteus mirabilis*. En la literatura ya habían varios trabajos principalmente de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium como adyuvante, inmunoestimulante y carrier de vacunas. Sin embargo en este trabajo era interesante comparar flagelinas de otros serovares como Dublin y Enteritidis, que presentan una patogenicidad y epidemiología diferente.

A nivel *in vitro* en la línea reportera CacoCCL20-Luc, todas las flagelinas (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Dublin, Enteritidis; y *Proteus mirabilis*) presentaron niveles similares de estimulación. De la misma forma que en la línea epitelial de pulmón humana A549, todas generaron similares niveles de ARNm para citoquinas proinflamatorias (*Ccl20*, *Cxcl1*, *Cxcl8*), péptido antimicrobiano (*Lcn2*) y regulador del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (*A20*) dentro del curso temporal evaluado (2, 4, 6, 12, 24 horas). A nivel *in vivo*, en el modelo de neumonía con *S.pneumoniae* todas las flagelinas fueron capaces de proteger entre un 80-100%.

En conclusión, en base a estas similitudes observadas, todas las flagelinas evaluadas tienen el potencial de utilizarse como inmunoestimulantes al igual que la de *S.Typhimurium*.

## 5.2 Estudio comparativo de flagelinas de especies bacterianas pertenecientes a las clases $\alpha$ y $\beta$ -Proteobacterias.

La comparación entre las flagelinas de distintas clases bacterianas, *S.Typhimurium* ( $\gamma$ -proteobacteria) y *H.seropedicae* ( $\beta$ -proteobacteria), generó similar respuesta en la línea epitelial A549 pero presentaron diferencias en la estimulación *in vivo* en el modelo de neumonía. La flagelina de *H.seropedicae* no fue capaz de proteger, antes este resultado llamativo, hipotetizamos que la diferencia puede estar en su afinidad por el receptor TLR5 y/o el TLR11 que solo está presente en murino. Además, encontramos diferencias a nivel de las secuencias, en donde se observan cambios importantes de aminoácidos cercanos a los aminoácidos claves para el correcto reconocimiento con TLR5. Asimismo, también observamos que la flagelina de *H.seropedicae* carece casi por completo de la región hipervariable (D2/D3), la cual está más relacionada con el reconocimiento antigénico y la activación de la inmunidad adaptativa, inclusive se considera la región más tóxica para la utilización de flagelina como terapéutica en vacunas o adyuvante.

En conclusión, en este trabajo se obtuvo y caracterizó a nivel de su capacidad de sensor a través de TLR5 una flagelina de una bacteria perteneciente a la clase de las  $\beta$ -proteobacterias (*H.seropedicae*), dato no reportado hasta el momento, la cual a pesar de poseer la zona de reconocimiento por TLR5, que a pesar de tener la zona de reconocimiento al TLR5, presenta diferencias en la estimulación *in vivo* comparada con la flagelina de *S.Typhimurium*. Más allá de que dicha flagelina no fue capaz de generar un entorno proinflamatorio suficiente para proteger en un modelo de neumonía, estos resultados generan mayor interés por caracterizarla y evaluarla en otros modelos como por ejemplo los asociados con procesos de inflamación crónica (alergias, asma). A su vez,



la similitud de secuencia que presenta con la flagelina CBLB502 parece ser interesante como punto de partida para ampliar conocimientos en otras patologías, por ejemplo en las inmunoterapias contra el cáncer y/o como terapia radioprotectora en síndrome de irradiación aguda.

### 5.3 Construcción de un sistema de expresión con actividad endotóxica reducida.

Se obtuvo una cepa *E.coli* modificada en el LPS de modo que presenta actividad endotóxica reducida. Se hicieron controles para verificar la actividad endotóxica reducida con la línea de macrófagos humano THP-1. Allí se observó disminuida la expresión de los marcadores de estimulación de genes proinflamatorios (*Tnfa*, *IL6*, *IL1a*) en dicha cepa. Finalmente se verificó que como sistema de expresión, la cepa presenta la misma capacidad de producir proteínas heterólogas.

En conclusión, se produjo un sistema de expresión de proteínas heterólogas con menor actividad endotóxica, esta cepa permitió expresar la flagelina de *H.seropedicae*. Además esta cepa queda disponible como uso para futuras proteínas que se expresen en esta construcción con fines terapéuticos y/o investigación básica dentro del laboratorio.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. D. Bateman, S. S. Hurd, P. J. Barnes, J. Bousquet, J. M. Drazen, M. FitzGerald, P. Gibson, K. Ohta, P. O'Byrne, S. E. Pedersen, E. Pizzichini, S. D. Sullivan, S. E. Wenzel, and H. J. Zar, "Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary," *Eur. Respir. J.*, vol. 31, no. 1, pp. 143–178, 2008.
- [2] K. F. Rabe, S. Hurd, A. Anzueto, P. J. Barnes, S. A. Buist, P. Calverley, Y. Fukuchi, C. Jenkins, R. Rodriguez-Roisin, C. van Weel, and J. Zielinski, "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 176, no. 6, pp. 532–555, 2007.
- [3] "WHO | The top 10 causes of death," *WHO*, 2017.
- [4] M. Bafadhel, S. McKenna, S. Terry, V. Mistry, C. Reid, P. Haldar, M. McCormick, K. Haldar, T. Kebabze, A. Duvoix, K. Lindblad, H. Patel, P. Rugman, P. Dodson, M. Jenkins, M. Saunders, P. Newbold, R. H. Green, P. Venge, D. A. Lomas, M. R. Barer, S. L. Johnston, I. D. Pavord, and C. E. Brightling, "Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: Identification of biologic clusters and their biomarkers," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 184, no. 6, pp. 662–671, 2011.
- [5] G. De Serres, N. Lampron, J. La Forge, I. Rouleau, J. Bourbeau, K. Weiss, B. Barret, and G. Boivin, "Importance of viral and bacterial infections in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations," *J. Clin. Virol.*, vol. 46, no. 2, pp. 129–133, 2009.
- [6] G. Mackenzie, "The definition and classification of pneumonia," *Injury*, vol. 8, no. 14, pp. 1–5, 2016.
- [7] R. E. W. Hancock, A. Nijnik, and D. J. Philpott, "Modulating immunity as a therapy for bacterial infections," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 10, no. 4, pp. 243–254, 2012.
- [8] M. I. Restrepo, E. M. Mortensen, J. A. Velez, C. Frei, and A. Anzueto, "A comparative study of community-acquired pneumonia patients admitted to the ward and the ICU,"

*Chest*, vol. 133, pp. 610–617, 2008.

- [9] M. A. Kinnebrew, C. Ubeda, L. A. Zenewicz, N. Smith, A. Richard, and E. G. Pamer, “Bacterial flagellin stimulates TLR5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection,” vol. 201, no. 4, pp. 534–543, 2010.
- [10] R. Porte, D. Fougeron, N. Muñoz-Wolf, J. Tabareau, A. F. Georgel, F. Wallet, C. Paget, F. Trottein, J. A. Chabalgoity, C. Carnoy, and J. C. Sirard, “A toll-like receptor 5 agonist improves the efficacy of antibiotics in treatment of primary and influenza virus-associated pneumococcal mouse infections,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 10, pp. 6064–6072, 2015.
- [11] M. Karin, T. Lawrence, and V. Nizet, “Innate immunity gone awry: Linking microbial infections to chronic inflammation and cancer,” *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 823–835, 2006.
- [12] E. J. Hennessy, A. E. Parker, and L. A. J. O’Neill, “Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. 4, pp. 293–307, Apr. 2010.
- [13] J. K. Dowling and A. Mansell, “Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development,” *Clin. Transl. Immunol.*, vol. 5, no. 5, p. e85, 2016.
- [14] H. Kumar, T. Kawai, and S. Akira, “Pathogen Recognition by the Innate Immune System,” *Int. Rev. Immunol.*, vol. 30, no. 1, pp. 16–34, 2011.
- [15] O. Takeuchi and S. Akira, “Pattern Recognition Receptors and Inflammation,” *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 805–820, 2010.
- [16] K. J. Drachenberg, A. W. Wheeler, P. Stuebner, and F. Horak, “A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections.,” *Allergy*, vol. 56, no. 6, pp. 498–505, 2001.
- [17] G. Boland, J. Beran, M. Lievens, J. Sasadeusz, P. Dentico, H. Nothdurft, J. N. Zuckerman,

- B. Genton, R. Steffen, L. Loutan, J. Van Hattum, and M. Stoffel, "Safety and immunogenicity profile of an experimental hepatitis B vaccine adjuvanted with AS04," *Vaccine*, vol. 23, no. 3, pp. 316–320, 2004.
- [18] M. S. Mitchell, W. Harel, R. A. Kempf, E. Hu, J. Kan-Mitchell, W. D. Boswell, G. Dean, and L. Stevenson, "Active-specific immunotherapy for melanoma," *J. Clin. Oncol.*, 1990.
- [19] N. Bhatla, V. Suri, P. Basu, S. Shastri, S. K. Datta, D. Bi, D. J. Descamps, and H. L. Bock, "Immunogenicity and safety of human papillomavirus-16/18 AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine in healthy Indian women," *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, vol. 36, no. 1, pp. 123–132, 2010.
- [20] G. L. Morefield, L. D. Hawkins, S. T. Ishizaka, T. L. Kissner, and R. G. Ulrich, "Synthetic toll-like receptor 4 agonist enhances vaccine efficacy in an experimental model of toxic shock syndrome," *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 14, no. 11, pp. 1499–1504, 2007.
- [21] E. Monnet, G. Lapeyre, E. van Poelgeest, P. Jacqmin, K. de Graaf, J. Reijers, M. Moerland, J. Burggraaf, and C. de Min, "Evidence of NI-0101 pharmacological activity, an anti-TLR4 antibody, in a randomized phase I dose escalation study in healthy volunteers receiving LPS," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 101, no. 2, pp. 200–208, 2017.
- [22] A. Abbott, "Lyme disease: Uphill Struggle," *Nature*, vol. 439, no. 7076, p. 524, 2006.
- [23] A. Vitiello, G. Ishioka, H. M. Grey, R. Rose, P. Famess, R. Lafond, L. Yuan, F. V Chisari, J. Furze, R. Bartholomeuz, and R. W. Chesnut, "Development of a Lipopeptide-based Therapeutic Vaccine to Treat Chronic HBV Infection 1 . Induction of a Primary Cytotoxic T Lymphocyte Response in Humans," vol. 95, no. January, pp. 341–349, 1995.
- [24] M. Murata, "Activation of Toll-like receptor 2 by a novel preparation of cell wall skeleton from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo (SMP-105) sufficiently enhances immune responses against tumors," *Cancer Sci.*, vol. 99, no. 7, pp. 1435–1440, 2008.
- [25] T. Ichinohe, A. Aina, M. Tashiro, T. Sata, and H. Hasegawa, "PolyI:polyC12U adjuvant-

- combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants,” *Vaccine*, vol. 27, no. 45, pp. 6276–6279, 2009.
- [26] Y. M. Murad, T. M. Clay, H. K. Lyerly, and M. a Morse, “CPG-7909 ( PF-3512676 , agonist in cancer therapy,” *Cancer*, vol. 7909, no. September 2016, pp. 1257–1266, 2007.
- [27] H. Tang, Z. Fang, G. P. Saborío, and Q. Xiu, “Efficacy and Safety of OM-85 in Patients with Chronic Bronchitis and/or Chronic Obstructive Pulmonary Disease,” *Lung*, vol. 193, no. 4, pp. 513–519, 2015.
- [28] N. Fukuzawa, M. Petro, W. M. Baldwin, A. V. Gudkov, and R. L. Fairchild, “A TLR5 Agonist Inhibits Acute Renal Ischemic Failure,” *J. Immunol.*, vol. 187, no. 7, pp. 3831–3839, 2011.
- [29] C. B. Turley, R. E. Rupp, C. Johnson, D. N. Taylor, J. Wolfson, L. Tussey, U. Kavita, L. Stanberry, and A. Shaw, “Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults,” *Vaccine*, vol. 29, no. 32, pp. 5145–5152, 2011.
- [30] D. N. Taylor, J. J. Treanor, C. Strout, C. Johnson, T. Fitzgerald, U. Kavita, K. Ozer, L. Tussey, and A. Shaw, “Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI),” *Vaccine*, vol. 29, no. 31, pp. 4897–4902, 2011.
- [31] L. G. Burdelya, V. I. Krivokrysenko, T. C. Tallant, E. Strom, A. S. Gleiberman, D. Gupta, O. V Kurnasov, F. L. Fort, A. L. Osterman, J. A. Didonato, E. Feinstein, and A. V Gudkov, “An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models.,” *Science*, vol. 320, no. 5873, pp. 226–30, 2008.
- [32] L. G. Burdelya, C. M. Brackett, B. Kojouharov, I. I. Gitlin, K. I. Leonova, A. S. Gleiberman, S. Aygun-Sunar, J. Veith, C. Johnson, G. J. Haderski, P. Stanhope-Baker, S. Allamaneni, J. Skitzki, M. Zeng, E. Martsen, A. Medvedev, D. Scheblyakov, N. M.

- Artemicheva, D. Y. Logunov, A. L. Gintsburg, B. S. Naroditsky, S. S. Makarov, and A. V. Gudkov, "Central role of liver in anticancer and radioprotective activities of Toll-like receptor 5 agonist," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 20, pp. E1857–E1866, 2013.
- [33] C. M. Brackett, B. Kojouharov, J. Veith, K. F. Greene, L. G. Burdelya, S. O. Gollnick, S. I. Abrams, and A. V. Gudkov, "Toll-like receptor-5 agonist, entolimod, suppresses metastasis and induces immunity by stimulating an NK-dendritic-CD8<sup>+</sup> T-cell axis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 7, pp. E874–E883, 2016.
- [34] H. Yang, C. M. Brackett, V. M. Morales-tirado, Z. Li, Q. Zhang, M. W. Wilson, C. Benjamin, W. Harris, K. Waller, A. V. Gudkov, L. G. Burdelya, and H. E. Grossniklaus, "The toll-like receptor 5 agonist entolimod suppresses hepatic metastases in a murine model of ocular melanoma via an NK cell-dependent mechanism," *Oncotarget*, vol. 7, no. 3, pp. 1–15, 2015.
- [35] H. C. Ramos, M. Rumbo, and J. C. Sirard, "Bacterial flagellins: Mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa," *Trends Microbiol.*, vol. 12, no. 11, pp. 509–517, 2004.
- [36] Q. Duan, M. Zhou, L. Zhu, and G. Zhu, "Flagella and bacterial pathogenicity," *J. Basic Microbiol.*, vol. 53, no. 1, pp. 1–8, 2013.
- [37] F. F. V. Chevance and K. T. Hughes, "Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 6, pp. 455–465, 2008.
- [38] F. Hayashi, K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem, "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5," *Nature*, vol. 410, no. 6832, pp. 1099–1103, 2001.
- [39] T. Tallant, A. Deb, N. Kar, J. Lupica, M. J. de Veer, and J. A. DiDonato, "Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and

- proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells.," *BMC Microbiol.*, vol. 4, p. 33, 2004.
- [40] M. A. Moors, L. Li, and S. B. Mizel, "Activation of interleukin-1 receptor-associated kinase by gram-negative flagellin," *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 7, pp. 4424–4429, 2001.
- [41] M. C. Berin, A. Darfeuille-Michaud, L. J. Egan, Y. Miyamoto, and M. F. Kagnoff, "Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappaB and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8.," *Cell. Microbiol.*, vol. 4, no. 10, pp. 635–648, 2002.
- [42] F. Sierro, B. Dubois, A. Coste, D. Kaiserlian, J. P. Kraehenbuhl, and J. C. Sirard, "Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 24, pp. 13722–7, 2001.
- [43] F. H. Guo and S. C. Erzurum, "Characterization of inducible nitric oxide synthase expression in human airway epithelium," *Env. Heal. Perspect.*, 1998.
- [44] A. M. Dittrich, H. A. Meyer, and E. Hamelmann, "The role of lipocalins in airway disease," *Clinical and Experimental Allergy*. 2013.
- [45] Y. Kobayashi, "The role of chemokines in neutrophil biology.," *Front. Biosci.*, 2008.
- [46] T. Bergsbaken, S. L. Fink, and B. T. Cookson, "Pyroptosis: host cell death and inflammation.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 2, pp. 99–109, 2009.
- [47] Y. Zhao and F. Shao, "The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type III secretion apparatus," *Immunol. Rev.*, vol. 265, no. 1, pp. 85–102, 2015.
- [48] E. A. Miao, E. Andersen-Nissen, S. E. Warren, and A. Aderem, "TLR5 and Ipaf: Dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system," *Semin. Immunopathol.*, vol. 29, no. 3, pp. 275–288, 2007.



- [49] K. D. Smith, E. Andersen-Nissen, F. Hayashi, K. Strobe, M. a Bergman, S. L. R. Barrett, B. T. Cookson, and A. Aderem, “Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility.,” *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 12, pp. 1247–1253, 2003.
- [50] K. L. Lightfield, J. Persson, S. W. Brubaker, C. E. Witte, J. von Moltke, E. A. Dunipace, T. Henry, Y. H. Sun, D. Cado, W. F. Dietrich, D. M. Monack, R. M. Tsolis, and R. E. Vance, “Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin,” *Nat Immunol*, vol. 9, no. 10, pp. 1171–1178, 2008.
- [51] S. Yoon, O. Kurnasov, V. Natarajan, M. Hong, A. V Gudkov, A. L. Osterman, and I. A. Wilson, “Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling.,” *Science*, vol. 335, no. 6070, pp. 859–64, 2012.
- [52] S. B. Mizel and J. T. Bates, “Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential.,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 10, pp. 5677–82, 2010.
- [53] E. T. Weimer, H. Lu, N. D. Kock, D. J. Wozniak, and S. B. Mizel, “A fusion protein vaccine containing OprF epitope 8, OprI, and type A and B flagellins promotes enhanced clearance of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*,” *Infect. Immun.*, vol. 77, no. 6, pp. 2356–2366, 2009.
- [54] D. Y. Bargieri, J. A. Leite, S. C. P. Lopes, M. E. Sbrogio-Almeida, C. J. M. Braga, L. C. S. Ferreira, I. S. Soares, F. T. M. Costa, and M. M. Rodrigues, “Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of *Salmonella Typhimurium*,” *Vaccine*, vol. 28, no. 16, pp. 2818–2826, 2010.
- [55] A. Kajikawa, L. Zhang, J. Long, S. Nordone, L. Stoeker, A. LaVoy, S. Bumgardner, T. Klaenhammer, and G. Dean, “Construction and immunological evaluation of dual cell surface display of HIV-1 Gag and *Salmonella enterica* serovar typhimurium FliC in

- Lactobacillus acidophilus for vaccine delivery,” *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 19, no. 9, pp. 1374–1381, 2012.
- [56] O. Pino, M. Martin, and S. M. Michalek, “Cellular Mechanisms of the Adjuvant Activity of the Flagellin Component FljB of Salmonella enterica Serovar Typhimurium To Potentiate Mucosal and Systemic Responses Cellular Mechanisms of the Adjuvant Activity of the Flagellin Component FljB of Salmonella,” vol. 73, no. 10, pp. 6763–6770, 2005.
- [57] N. Muñoz, L. Van Maele, J. M. Marqués, A. Rial, J. C. Sirard, and J. A. Chabalgoity, “Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection,” *Infect. Immun.*, vol. 78, no. 10, pp. 4226–4233, 2010.
- [58] N. Muñoz-Wolf, A. Rial, D. Fougeron, J. Tabareau, J.-C. Sirard, and J. A. Chabalgoity, “Sublingual flagellin protects against acute pneumococcal pneumonia in a TLR5-dependent and NLRC4-independent fashion.,” *Future Microbiol.*, vol. 11, pp. 1167–77, 2016.
- [59] E. Andersen-Nissen, K. D. Smith, K. L. Strobe, S. L. Barrett, B. T. Cookson, S. M. Logan, and A. Aderem, “Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 26, pp. 9247–9252, 2005.
- [60] P. Scavone, A. Umpiérrez, A. Rial, J. A. Chabalgoity, and P. Zunino, “Native flagellin does not protect mice against an experimental Proteus mirabilis ascending urinary tract infection and neutralizes the protective effect of MrpA fimbrial protein,” *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 105, no. 6, pp. 1139–1148, 2014.
- [61] H. Zeng, A. Q. Carlson, Y. Guo, Y. Yu, L. S. Collier-Hyams, J. L. Madara, A. T. Gewirtz, and A. S. Neish, “Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic Salmonella,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 7, pp. 3668–74, 2003.
- [62] S. Uzzau, D. J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, J. Casadesús, D. J.

- Platt, and J. E. Olsen, "Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*," *Epidemiol. Infect.*, vol. 125, no. 2, pp. 229–255, 2000.
- [63] T. F. Jones, L. A. Ingram, P. R. Cieslak, D. J. Vugia, M. Tobin-D'Angelo, S. Hurd, C. Medus, A. Cronquist, and F. J. Angulo, "Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype.," *J. Infect. Dis.*, vol. 198, no. 1, pp. 109–14, 2008.
- [64] G. C. Langridge, J. Wain, and S. Nair, "Invasive Salmonellosis in Humans.," *EcoSal Plus*, vol. 5, no. 1, pp. 1–21, 2012.
- [65] G. Walsh, "Biopharmaceutical benchmarks 2010," *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 9, pp. 917–924, 2010.
- [66] G. Walsh, "Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals," *Drug Discov. Today*, vol. 15, no. 17–18, pp. 773–780, 2010.
- [67] C.-J. Huang, H. Lin, and X. Yang, "Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 3, pp. 383–399, 2012.
- [68] D. Petsch and F. B. Anspach, "Endotoxin removal from protein solutions," *J. Biotechnol.*, vol. 76, no. 2–3, pp. 97–119, 2000.
- [69] S. J. Wakelin, I. Sabroe, C. D. Gregory, I. R. Poxton, J. L. R. Forsythe, O. J. Garden, and S. E. M. Howie, "'Dirty little secrets'-Endotoxin contamination of recombinant proteins," *Immunol. Lett.*, vol. 106, no. 1, pp. 1–7, 2006.
- [70] Y. Li, Z. Wang, J. Chen, R. K. Ernst, and X. Wang, "Influence of lipid acylation pattern on membrane permeability and innate immune stimulation," *Mar. Drugs*, vol. 11, no. 9, pp. 3197–3208, 2013.
- [71] B. D. Needham, S. M. Carroll, D. K. Giles, G. Georgiou, M. Whiteley, and M. S. Trent, "Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin,"

*Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 4, pp. 1464–1469, 2013.

- [72] X. Wang, A. A. Ribeiro, Z. Guan, S. N. Abraham, and C. R. H. Raetz, “Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 10, pp. 4136–41, 2007.
- [73] I. Cognet, A. B. De Coignac, G. Magistrelli, P. Jeannin, J. P. Aubry, K. Maisnier-Patin, G. Caron, S. Chevalier, F. Humbert, T. Nguyen, A. Beck, D. Velin, Y. Delneste, M. Malissard, and J. F. Gauchat, “Expression of recombinant proteins in a lipid A mutant of *Escherichia coli* BL21 with a strongly reduced capacity to induce dendritic cell activation and maturation,” *J. Immunol. Methods*, vol. 272, no. 1–2, pp. 199–210, 2003.
- [74] J. E. Somerville, L. Cassiano, B. Bainbridge, M. D. Cunningham, and R. P. Darveau, “A novel *Escherichia coli* lipid A mutant that produces an antiinflammatory lipopolysaccharide,” *J. Clin. Invest.*, vol. 97, no. 2, pp. 359–365, 1996.
- [75] P. Zunino, L. Geymonat, A. G. Allen, C. Legnani-Fajardo, and D. J. Maskell, “Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection,” *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 29, no. 2, pp. 137–143, 2000.
- [76] K. J. Livak and T. D. SchLivak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262mittgen, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.,” *Methods (San Diego, Calif.)*. 2001.
- [77] K. Katoh, K. Misawa, K. Kuma, and T. Miyata, “MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 14, pp. 3059–3066, 2002.
- [78] W. Li and A. Godzik, “Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of

- protein or nucleotide sequences,” *Bioinformatics*, 2006.
- [79] A. Rambaut, “FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees.,” *Inst. Evol. Biol. Univ. Edinburgh*, 2009.
- [80] J. I. Baldani, V. L. D. Baldani, L. Seldin, and J. Dobereiner, “Characterization of *Herbaspirillum srope dicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium,” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 36, no. 1, pp. 86–93, 1986.
- [81] M. A. Morel, M. C. Ubalde, V. Braña, and S. Castro-Sowinski, “*Delftia* sp. JD2: A potential Cr(VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity,” *Arch. Microbiol.*, vol. 193, no. 1, pp. 63–68, 2011.
- [82] R. Guarischi-Sousa, M. Puigvert, N. S. Coll, M. I. Siri, M. J. Pianzola, M. Valls, and J. C. Setubal, “Complete genome sequence of the potato pathogen *Ralstonia solanacearum* UY031,” *Stand. Genomic Sci.*, vol. 11, no. 1, p. 7, 2016.
- [83] D. Hanahan, “Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids,” *J. Mol. Biol.*, 1983.
- [84] M. J. Casadaban and S. N. Cohen, “Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*,” *J. Mol. Biol.*, 1980.
- [85] K. Datsenko and B. L. Wanner, “One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products,” *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 97, no. 12, pp. 6640–6645, 2000.
- [86] L. M. Guzman, D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith, “Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter,” *J. Bacteriol.*, 1995.
- [87] L. C. Thomason, N. Costantino, and D. L. Court, “*E. coli* Genome Manipulation by P1 Transduction,” *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, no. July, p. 1.17.1-1.17.8, 2007.

- [88] N. Muñoz-Wolf, “Patrones moleculares asociados a patógenos ( PAMPs ) como base para nuevas inmunoterapias contra *Streptococcus pneumoniae*,” UdelaR, 2013.
- [89] S. J. Clough, a B. Flavier, M. a Schell, and T. P. Denny, “Differential Expression of Virulence Genes and Motility in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* during Exponential Growth.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 3, pp. 844–850, 1997.
- [90] B. Science, O. Article, J. G. Frye, M. McClelland, R. M. Harshey, M. McClelland, and R. M. Harshey, “Gene expression patterns during swarming in,” *Mol. Microbiol.*, vol. 52, pp. 169–187, 2004.
- [91] L. Betancor, “Genomic Comparison of the Closely Related *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Dublin,” *Open Microbiol. J.*, vol. 6, no. 1, pp. 5–13, 2012.
- [92] N. Fu-shin Yu, M. D. Cornicelli, S. Gao, S. Gi Yoon, R. L. Gallo, T. J. Michael W Newstead, X. Zeng, A. Kumar, M. A. Kovach, F. Yu, M. W. Newstead, N. Gao, and T. J. Standiford, “Flagellin Stimulates Protective Lung Mucosal Immunity: Role of Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide,” *DC1.html J. Immunol. Univ. Michigan July J. Immunol.*, vol. 185, no. 185, pp. 1142–1149, 2016.
- [93] I. Jarchum, M. Liu, L. Lipuma, and E. G. Pamer, “Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis,” *Infect. Immun.*, vol. 79, no. 4, pp. 1498–1503, 2011.
- [94] M. Vijay-Kumar, J. D. Aitken, C. J. Sanders, A. Frias, V. M. Sloane, J. Xu, A. S. Neish, M. Rojas, and A. T. Gewirtz, “Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation.,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 12, pp. 8280–8285, 2008.
- [95] J. D. Partridge and R. M. Harshey, “More than motility: *Salmonella* flagella contribute to overriding friction and facilitating colony hydration during swarming,” *J. Bacteriol.*, vol. 195, no. 5, pp. 919–929, 2013.
- [96] L. Gómez-Gómez and T. Boller, “Flagellin perception: A paradigm for innate immunity,”

*Trends Plant Sci.*, vol. 7, no. 6, pp. 251–256, 2002.

- [97] H. Hatai, A. Lepelley, W. Zeng, M. S. Hayden, and S. Ghosh, “Toll-like receptor 11 (TLR11) Interacts with flagellin and profilin through disparate mechanisms,” *PLoS One*, vol. 11, no. 2, pp. 1–13, 2016.
- [98] R. Mathur, H. Oh, D. Zhang, S. G. Park, J. Seo, A. Koblansky, M. S. Hayden, and S. Ghosh, “A mouse model of salmonella typhi infection,” *Cell*, vol. 151, no. 3, pp. 590–602, 2012.
- [99] N. McNamara, M. Gallup, A. Sucher, I. Maltseva, D. McKemy, and C. Basbaum, “AsialoGM1 and TLR5 cooperate in flagellin-induced nucleotide signaling to activate Erk1/2,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 34, no. 6, pp. 653–660, 2006.
- [100] R. Adamo, S. Sokol, G. Soong, M. I. Gomez, and A. Prince, “Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 30, no. 5, pp. 627–634, 2004.
- [101] A. Grabcic, G. Meng, S. Fichte, W. Bessler, H. Wagner, and C. J. Kirschning, “Human but not murine toll-like receptor 2 discriminates between tri-palmitoylated and tri-lauroylated peptides,” *J. Biol. Chem.*, 2004.
- [102] A. M. Hajjar, R. K. Ernst, J. H. Tsai, C. B. Wilson, and S. I. Miller, “Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications,” *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 4, pp. 354–359, 2002.
- [103] G. Hartmann and a M. Krieg, “Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells,” *J. Immunol.*, 2000.
- [104] F. M. de Melo, C. J. Braga, F. V Pereira, J. T. Maricato, C. S. Origassa, M. F. Souza, A. C. Melo, P. Silva, S. L. Tomaz, K. P. Gimenes, J. A. Scutti, M. a Juliano, D. S. Zamboni, N. O. Câmara, L. R. Travassos, L. C. Ferreira, and E. G. Rodrigues, “Anti-metastatic immunotherapy based on mucosal administration of flagellin and immunomodulatory

- P10.,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 93, no. 1, pp. 86–98, 2015.
- [105] X. Ding, G. Bian, N. D. Leigh, J. Qiu, P. L. McCarthy, H. Liu, S. Aygun-Sunar, L. G. Burdelya, A. V. Gudkov, and X. Cao, “A TLR5 Agonist Enhances CD8<sup>+</sup> T Cell-Mediated Graft-versus-Tumor Effect without Exacerbating Graft-versus-Host Disease,” *J. Immunol.*, vol. 189, no. 10, pp. 4719–4727, 2012.
- [106] V. I. Krivokrysenko, I. A. Toshkov, A. S. Gleiberman, P. Krasnov, I. Shyshynova, I. Bespalov, R. K. Maitra, N. V. Narizhneva, V. K. Singh, M. H. Whitnall, A. A. Purmal, A. N. Shakhov, A. V. Gudkov, and E. Feinstein, “The toll-like receptor 5 agonist entolimod mitigates lethal acute radiation syndrome in non-human primates,” *PLoS One*, vol. 10, no. 9, pp. 1–30, 2015.
- [107] B. M. Kojouharov, C. M. Brackett, J. M. Veith, C. P. Johnson, I. I. Gitlin, I. A. Toshkov, A. S. Gleiberman, A. V. Gudkov, and L. G. Burdelya, “Toll-like receptor-5 agonist Entolimod broadens the therapeutic window of 5-fluorouracil by reducing its toxicity to normal tissues in mice,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 3, pp. 802–814, 2014.
- [108] Y. Lu and J. R. Swartz, “Functional properties of flagellin as a stimulator of innate immunity.,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. January, p. 18379, 2016.