



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Estudio de una Ser/Thr kinasa de
*Listeria monocytogenes***

Nº 268

María Julia Marchissio

Tutores: Gustavo E. Schujman y
Silvia A. González

Departamento de Investigaciones
Agosto 2009

Índice

Índice	3
Dedicatoria	5
Agradecimientos	5
I - Abreviaturas	5
II - Resumen	6
1. Introducción	6
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	6
1.2. Listeriosis	9
1.3. Ser/Thr kinasas bacterianas	10
2. Objetivos	12
3. Materiales y Métodos	12
4. Resultados y Discusión	19
4.1. Deleción de <i>Lmo1820</i>	19
4.2. Electroporación de <i>L. monocytogenes</i>	21
4.3. Curvas de crecimiento	21
4.4. Expresión y purificación de <i>Lmo1820c</i>	22
4.5. Cuantificación de <i>Lmo1820c</i> purificada.	25
4.6. MALDI-TOF de <i>Lmo1820c</i>	26
5. Conclusiones	27
6. Referencias Bibliográficas	28

Dedicatoria

A mis padres,
por su apoyo y amor incondicionales,
por nunca decirme “no vas a poder”.

Agradecimientos

Al Dr. Diego de Mendoza, por abrirme las puertas del IBR y darme la oportunidad de trabajar en un grupo que superó mis expectativas y me dio incontables satisfacciones.

Al Dr. Gustavo Schujman por sus enseñanzas diarias, paciencia y buen humor. Gustavo, me diste las herramientas para ser independiente y convertirme en una mejor científica.

A la Dra. Silvia González, mi tutora, directora de carrera y mentora. Fue un ejemplo a seguir desde el primer día y le agradezco su confianza en mí y el apoyo que me brindó todo este tiempo.

A mis profesores y compañeros de la UB, porque hicieron de los 4 años de cursada una de las mejores épocas de mi vida. Junto a Uds. crecí como persona y como futura profesional, aprendí miles de cosas y me divertí como nunca.

A mi familia... mis padres María Rosa y Arterio, mi abuela María, mis primas Laura y Roxana, las ‘tías postizas’ Norma y Beba y a todos los demás, estén presentes hoy o no. Uds. me contuvieron, acompañaron y me dieron innumerables muestras de amor durante estos años.

A mis compañeros en Micro del IBR, especialmente a mis “compañeritos de box”, Mariano, Geor, Vero, Katie Rose, Lu... quienes tanto me enseñaron, miles de veces me sacaron las papas del horno... o las placas de la estufa y con quienes compartimos más de una buena fiesta. A Nati, Lara, Dani, Mariana, la Turca y la gente de otros laboratorios con quienes pude compartir... en fin, a todos. Sin Uds. este año no habría sido ni la mitad de enriquecedor y divertido.

A la Lic. Analía Lima del Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay, por su colaboración en este proyecto y los días entretenidos que compartimos.

Y, por último pero no por ello menos importantes, a todos mis amigos de la vida... especialmente a Lau, Lucre, Lore y Marco. Gracias por acompañarme y quererme como sólo Uds. saben hacerlo.

I - Abreviaturas

'	Minutos
”	Segundos
°C	Grados Centígrados
A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GTE	Glucosa-Tris-EDTA
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
KDa	Kilodaltons
L	Litros
M	Molar
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3N-Morfolino propanosulfónico
mseg	Milisegundos
ng	Nanogramos
Ni-NTA	Níquel-ácido nitrilotriacético
p/v	Peso en volumen
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoruro
R	Resistente
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida, condiciones desnaturalizantes
STPK	Ser/Thr-proteín-kinasa
TAE	Tris-acetato-EDTA
Tris	N-Tris-(hidroximetil)-aminoetano
V	Voltios
X-gal	5 bromo-4 cloro-3 indolil β -D galactopiranosido
λ	Longitud de onda
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
μ M	Micromolar

II - Resumen

Listeria monocytogenes es un patógeno alimenticio de gran importancia médica y económica. Es una bacteria Gram positiva y dentro de este tipo de microorganismos, las Ser/thr kinasas son pobremente entendidas, pese a que se les atribuyen roles regulatorios de gran importancia. En este trabajo se comenzó la caracterización de una de ellas, Lmo1820, una kinasa transmembrana de *Listeria monocytogenes* similar a las encontradas en *Mycobacterium tuberculosis* y *Bacillus subtilis*.

Resultados previos han demostrado que una cantidad importante de STPKs bacterianas contienen segmentos transmembrana, a diferencia de sus pares eucariotas. Esto sugiere que podrían actuar como moléculas receptoras involucradas directamente en la interacción con ligandos extracelulares. Más aún, la existencia de este tipo de kinasas con dominios extracelulares PASTA, tales como Lmo1820, implica su rol en rutas de señalización conservadas entre diversas especies de bacterias Gram positivas.

Como primer paso para un mayor entendimiento de esta kinasa, se iniciaron las construcciones necesarias para obtener una cepa mutante por delección del gen *lmo1820*; así se podría estudiar *in vivo* el rol fisiológico de la STPK. Además, se construyó un vector para expresar la subunidad catalítica de Lmo1820 y se ajustaron las condiciones para la purificación de dicho dominio en *Escherichia coli*. Esto permitirá llevar a cabo ensayos *in vitro* que provean mayor información sobre su mecanismo de acción y sustrato fisiológico.

1. Introducción

1.1. *Listeria monocytogenes*.

El género *Listeria* spp. presenta bacilos psicrótrofos Gram-positivos, cuyo ADN posee un bajo contenido de guanina-citosina, entre 36% y 38%. Cortos y regulares, suelen disponerse de forma individual o en cadenas cortas no ramificadas. No son esporulados ni encapsulados y poseen un metabolismo aerobio-anaerobio facultativo. El género se encuentra emparentado con *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*.

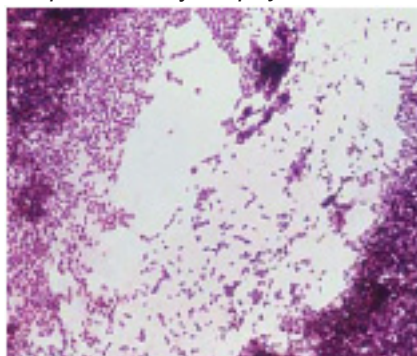


Figura 1: Tinción de Gram de *Listeria monocytogenes*.

Son bacterias móviles a 25-28°C, que presentan entre 1 y 5 flagelos peritricos. A 37°C, sin embargo, los flagelos se inactivan y la bacteria pierde su movilidad.



Figura 2: ME de barrido mostrando los flagelos de *Listeria monocytogenes*.

Son organismos muy resistentes por cuanto toleran concentraciones de hasta 25,5% de NaCl, proliferan a amplios rangos de pH (5,0-9,6), se desarrollan entre 0.4 y 45 °C, por lo tanto, pueden crecer a temperatura de refrigeración, y son resistentes a la desecación.

El hábitat principal de *Listeria* spp. es el suelo y la materia vegetal en descomposición, donde se desarrolla saprófitamente. Sin embargo, son bacterias ubicuas que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Se han aislado de aguas residuales, del tracto digestivo de animales y humanos y de gran cantidad de alimentos, especialmente lácteos o aquellos procesados listos para consumir sin cocción previa.

De las diferentes especies incluidas en el género, *Listeria innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* y *L. monocytogenes*, todas pueden contaminar alimentos, pero sólo esta última se relaciona con patologías humanas.

Listeria monocytogenes es un parásito intracelular facultativo que constituye el agente etiológico de **listeriosis**, una patología transmitida por alimentos de alto riesgo para la salud pública. Esto se debe a que se trata de una enfermedad grave, de elevados costos médicos y causante de pérdidas en la industria agroalimentaria.

Reino:	Bacteria
División:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Listeriaceae
Género:	<i>Listeria</i>
Especie:	<i>L. monocytogenes</i>

Tabla 1: Clasificación científica de la especie *Listeria monocytogenes*.

La especie *Listeria monocytogenes* puede dividirse en tres grupos evolucionarios: los linajes I, II y III. Potencialmente, los tres subgrupos pueden causar enfermedad en humanos, pero no es lo usual para todos.

Los linajes I y II son comúnmente aislados de varias fuentes, siendo el I el más común en humanos, mientras que el II se considera un linaje adaptado ambientalmente, ya que se encuentra mayormente en el medio ambiente, granjas y alimentos. Por último, el linaje III se considera no virulento o atenuado para humanos. Es más frecuente en animales, por lo tanto se le atribuye especificidad de huésped de mamíferos no primates. Constituye un linaje con características fenotípicas únicas dentro de sus propios subgrupos que indican nichos ecológicos diferentes y distintas vías de transmisión.

Dentro de cada linaje se pueden aislar distintos serotipos; 4b, 1/2b y 1/2a son aquellos más comunes en patologías humanas. Además, el primero representa el 70% de los aislamientos en Argentina. Estos se encuentran en una estructura de grupos clonales que presentan distinta virulencia, preferencia por huéspedes, diferencias en el tropismo patogénico y muestras de adaptación diversas.

El hecho de que no todas las cepas de *L. monocytogenes* sean patógenas para humanos se debe a que existen genes presentes en cepas virulentas que no están en aquellas que no lo son. Ellos incluyen internalinas y reguladores transcripcionales, entre otros

Listeria monocytogenes posee 19 factores de virulencia. Entre ellos caben mencionarse:

Listeriolisina O (LLO): toxina cito y hemolítica codificada por el gen *hly*; esta proteína es producida en el interior del fagolisosoma, bajo condiciones de pH ácido y concentraciones reducidas de hierro. Una vez secretada, se fija al colesterol y rompe la membrana fagolisosomal. También se secreta para escapar a la bicapa que la engulle durante su pasaje a otras células.

Fosfolipasas: PlcA (hidrolasa de fosfatidilinositol) y PlcB (lecitinasa). La bacteria las secreta para asistir a LLO en la ruptura del fagosoma, para evitar su degradación y escapar al citoplasma celular.

ActA: proteína de superficie esencial para la patogenicidad. Actúa reclutando hacia la bacteria la maquinaria de nucleación de actina necesaria para su polimerización y formación de las “colas de cometa” que propulsan al parásito al citosol y lo ayudan a invadir células vecinas.

Internalinas: InlA e InlB se consideran las primeras invasinas descritas en bacterias Gram positivas implicadas en la internalización en células que no son usualmente fagocíticas, tales como células epiteliales, endoteliales y hepatocitos. Otras internalinas que actúan como factores de virulencia son: InlC, expresada en citoplasma, posee un rol en la diseminación de la infección e InlJ, descubierta recientemente.

PrfA es el mayor regulador de la expresión de genes relacionados con la virulencia de *Listeria monocytogenes*. Puede actuar como represor o activador, directamente o asociado a distintos factores Sigma. Activa todos los genes del grupo de virulencia (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*), como también la expresión de *inlA*, *inlB*, *inlC* (en sus respectivas islas de internalinas), y de *hpt*.

Al ser ingerida, la bacteria pasa por el estómago para luego adherirse al intestino delgado superior, atravesar la mucosa intestinal y entrar a la cavidad intraperitoneal. A partir de allí puede seguir distintos caminos:

Fagocitosis por macrófagos circulantes.

Viaje por linfa o sangre, hacia nódulos mesentéricos, bazo, hígado (considerado el primer órgano blanco), útero (donde, de estar grávido, cruza la barrera placentaria), cerebro, células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales y nerviosas, como neuronas.

Su ciclo como parásito intracelular comienza con la adhesión a la superficie de la célula eucariota y su posterior internalización por envoltura dentro de dicha célula a través de un mecanismo de cierre; en este proceso la bacteria es asistida por su amplio repertorio de internalinas y proteínas de superficie. Durante esta invasión, *Listeria monocytogenes* queda rodeada por una vacuola fagocítica; de ésta escapa por ruptura de la membrana, por acción de su listeriolisina y fosfolipasas. Una vez en el citosol, la bacteria se multiplica rápidamente y, por acción de ActA, es encapsulada por filamentos de actina de la célula huésped, formando las conocidas “colas de cometa de actina”. Cada una de ellas está compuesta por dos poblaciones de filamentos de actina entrecruzados y ensamblados polarmente; esto le permite a la bacteria moverse y pasar de célula a célula, formando protrusiones similares a dedos que penetran en las células vecinas.



Figura 3: Pasos en la invasión y proliferación intracelular de *Listeria monocytogenes* y factores de virulencia asociados.

La movilidad de *Listeria monocytogenes* ocurre por un mecanismo de *step-like motion*; en éste, la existencia de filamentos de actina más cortos que otros, acoplada al movimiento Browniano, permite la inserción de monómeros en los filamentos que generan una fuerza y un tipo de movimiento similar a pasos.

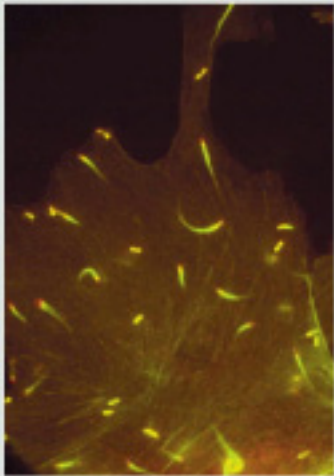


Figura 4: Filamentos de actina ensamblados por *Listeria monocytogenes* dentro de una célula humana.

1.2. Listeriosis

La infección por *Listeria monocytogenes* es considerada una enfermedad grave, con una tasa de mortalidad general entre 20% y 30% si es tratada; de no serlo, esta tasa se eleva hasta un 70%. Se estima que causa 2500 casos por año solamente en EEUU y cuenta con una tasa de incidencia anual de 4 a 8 casos por un millón de personas (FAO, 2001). Si bien este número ha disminuido en los últimos años, aún ocurren brotes asociados a alimentos contaminados. Lo interesante es que su incidencia resulta mayor en países industrializados que en aquellos en vías de desarrollo. En los primeros se generan condiciones favorables para el desarrollo de *Listeria monocytogenes* debido al gran progreso de la industria agroalimentaria, los cambios acelerados en los hábitos alimentarios y el mayor desarrollo de la cadena de frío.

En América del Sur no se han descrito brotes causados por *Listeria monocytogenes*, mientras que en Argentina la listeriosis no es una enfermedad de notificación obligatoria y no se poseen datos epidemiológicos de la misma.

La listeriosis se considera una infección oportunista, ya que la mayor parte de los individuos saludables no desarrollan síntomas. Las llamadas complicaciones de la enfermedad son generalmente sus expresiones clínicas, que se presentan en individuos vulnerables. Esto se refleja claramente en que la listeriosis en adultos no grávidos se asocia en un 75% de los casos a individuos inmunocomprometidos. Entonces, si bien la ingestión de *Listeria monocytogenes* es común y existe cierta tolerancia adquirida hacia el patógeno, la enfermedad puede presentarse ante la ingestión de comida altamente contaminada o en individuos particularmente susceptibles.

La enfermedad puede presentarse como casos aislados o en epidemias; en ambos casos, se asocia en un 90% al consumo de **alimentos contaminados, producidos industrialmente, refrigerados y listos para consumir sin cocción ni calentamiento prolongado previos**. Luego de un período de incubación de 7 a 30 días, la enfermedad comienza su curso con síntomas semejantes a los de un cuadro gripal, acoplado o no a diarrea. Luego pueden progresar hacia fiebre alta, migrañas severas y rigidez del cuello.

La listeriosis presenta tres tipos de cuadro con determinados síndromes clínicos:

invasivo, el más frecuente, que incluye meningitis neonatal, hepatitis, meningoencefalitis en adultos, abscesos hepáticos, romboencefalitis, bacteremia en infantes o adultos (1/3 de los casos), endocarditis, peritonitis bacteriana espontánea y neumonía.

gastroentérico, con manifestaciones de gastroenteritis febril.

localizado, que carece de bacteremia previa y se caracteriza por infección cutánea.

Como se mencionó anteriormente, al ser ésta una infección oportunista, son particularmente susceptibles los individuos de edad avanzada o con patologías tales como neoplasias, trasplantes de órganos, colagenosis y SIDA. Las mujeres embarazadas son 20 veces más propensas que otro adulto saludable a sufrir bacteremia por *L. monocytogenes* y representan hasta una tercera parte de los casos reportados. Si el feto resulta infectado, puede ser causa de aborto espontáneo, o dar lugar a un parto prematuro de un neonato septicémico o al nacimiento de un niño sin vida.

Si bien *Listeria monocytogenes* se encuentra mayormente protegida de la rama humoral del sistema

inmune por su invasión directa de células vecinas, induce una respuesta potente, protectora y de larga duración mediada por células CD8⁺ y también una respuesta inflamatoria no específica. Los macrófagos son los responsables de defender al organismo contra una infección sistémica al matar al patógeno y lidiar con los hepatocitos infectados para así detener la infección.

Generalmente, los aislamientos de *Listeria monocytogenes* o de otras *Listerias* son susceptibles a un amplio rango de antibióticos, exceptuando las fluorquinolonas actuales, las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y la fosfomicina. Su patrón de sensibilidad incluye penicilina, ampicilina, gentamicina, tetraciclinas, vancomicina, rifampicina, eritromicina y cotrimoxazol. La mayoría de estos antibióticos se muestran bacteriostáticos frente al patógeno, aunque también se ha observado actividad bactericida en los aminoglucósidos, y cotrimoxazol, principalmente.

Actualmente, el tratamiento más usual para la listeriosis es el de ampicilina o penicilina asociadas a gentamicina por 2 ó 3 semanas. La combinación de trimetoprim y sulfametoxazol ha sido una opción exitosa en el caso de pacientes alérgicos a penicilinas y hoy en día se considera la terapia principal en esta circunstancia.

Sin embargo, la emergencia de resistencia a antibióticos es un problema creciente. La primera reportada en el caso de *Listeria monocytogenes* fue a tetraciclina, en 1988, y también en ese año se encontró la primer cepa multirresistente. Con el correr del tiempo, más cepas se han vuelto resistentes a agentes antimicrobianos y, aunque en este momento no se observa resistencia a los antibióticos utilizados rutinariamente para tratar infecciones por *Listeria monocytogenes*, ésta sí se ha reportado en *L. innocua*; ello aumenta la posibilidad de que *L. monocytogenes* adquiera dicho fenotipo.

Lo anteriormente mencionado demuestra la importancia de monitorear las nuevas clases de resistencia a antimicrobianos y los genes y mecanismos asociados a ellos, así como el constante desarrollo de nuevas moléculas contra estos patógenos.

1.3. Ser/Thr kinasas bacterianas.

La fosforilación reversible de proteínas posee un papel fundamental en una amplia gama de procesos celulares, tales como regulación de rutas metabólicas, diferenciación celular y transducción de señales. Este último proceso, referido a la fosforilación de residuos de Histidina y Aspartato en sistemas de dos componentes, así como al sistema PTS, se encuentra bien caracterizado en bacterias, tanto Gram positivas como negativas. Sin embargo, residuos de Serina, Treonina y Tirosina son blancos importantes y dominantes para la fosforilación reversible en estos organismos, al igual que en eucariotas, con kinasas altamente conservadas.

La primer Ser/Thr kinasa, homóloga a sus pares eucariotas, reportada en bacterias fue Pkn1, de *Myxococcus xanthus*, una proteína relacionada con el desarrollo de los cuerpos fructíferos. En años recientes y gracias a la secuenciación de diversos genomas bacterianos, se han encontrado en estos organismos gran cantidad de Ser/Thr kinasas homólogas a eucariotas. Si bien se sabe que en ellos se encuentran involucradas en el desarrollo o la patogenicidad, aún resta develar el mecanismo de acción, sustrato fisiológico específico y rol preciso de muchas de ellas.

En el genoma de *Bacillus subtilis* hay genes que codifican para tres kinasas putativas de tipo eucariota. PrkC es una de ellas, y se le ha asociado un rol en la esporulación y la formación de *biofilms*. Consiste en una Ser/Thr kinasa de 648 aminoácidos con propiedades enzimáticas y una organización estructural capaz de formar dímeros, que se halla unida a la membrana de la bacteria.

El dominio N-terminal de PrkC se encuentra en el citoplasma y es una kinasa altamente conservada. Esta región de 329 aminoácidos posee cuatro residuos fosforilables (Thr162, Thr163, Thr165 y Thr167) en su *loop* de activación. Se continúa con un dominio transmembrana de 28 residuos y una porción C-terminal citosólica con 3 dominios PASTA. Estos son dominios asociados a Ser/Thr kinasas bacterianas y a proteínas de unión a penicilina; poseen un rol presumiblemente sensor y en la biosíntesis de la pared celular.

La organización estructural de PrkC es muy similar a la de receptores eucariotas con función de proteína-kinasas, tal como el TGFβ, una Ser/Thr kinasa. Es importante hacer hincapié en que esta organización relativa es diferente a aquella de los receptores-kinasas eucariotas, puesto que en ellos el dominio catalítico es C-terminal al dominio externo.

PrkC y PrpC, su fosfatasa asociada, se encuentran codificadas en dos genes adyacentes y cotranscritos. La mutación de estos tiene efectos pleiotrópicos en células en fase estacionaria, sugiriendo un rol regulatorio importante, aunque no sean esenciales para el desarrollo de la bacteria. El gen *prpC* se superpone por tres nucleótidos con *prkC* y a éste lo sigue el gen *yloQ*, que codifica para una GTPasa de función desconocida pero esencial para el desarrollo bacteriano bajo condiciones específicas.

Ya que el dominio catalítico de kinasas como PrkC se encuentra más distribuido que el C-terminal, sólo se han podido encontrar verdaderos ortólogos de toda la secuencia de *prkC* en Gram positivas con bajo contenido de G+C. Éste es el caso de Lmo1820 de *Listeria monocytogenes*, cuyo dominio C-terminal posee un 35% de identidad con el de PrkC. Este hecho indica que ambas podrían poseer roles regulatorios equivalentes.

Codificada en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* se encuentra PknB, una Ser/Thr kinasa homóloga a PrkC que también posee similitudes conformacionales y mecánicas con sus pares eucariotas. Es una proteína de 626 aminoácidos que cuenta con un dominio N-terminal de 331 residuos; los primeros 279 se consideran parte del dominio catalítico e intracelular que es la verdadera STPK, mientras que su dominio C-terminal de 276 aminoácidos es extracelular y posee 4 dominios PASTA; por ello es considerado un sensor de señales. Además, este dominio también es homólogo al de varias STPKs bacterianas, incluyendo a Lmo1820 de *Listeria monocytogenes*, por lo que podrían responder a un tipo similar de señal.

PknB es una proteína esencial para el crecimiento bacteriano y posee dos residuos (Thr171 y Thr173) en la *loop* de activación de su subunidad catalítica que son blanco para la autofosforilación y la reversión de este proceso por PstP, su fosfatasa asociada. Se le han encontrado tres sustratos fisiológicos: PknA (otra Ser/Thr kinasa), Wag31 (una proteína esencial, clave para la división y morfología celular) y Rv1422 (una proteína hipotética, similar a otras no caracterizadas). Teniendo en cuenta estas características, se cree que PknB regula la morfología celular, síntesis de peptidoglicano y, posiblemente, también la división celular en *Mycobacterium tuberculosis*.

Utilizando la gran cantidad de datos obtenidos durante la secuenciación del genoma de *Listeria monocytogenes* EGD-e (Glaser et al, 2001), se pudo ver que en éste existen genes que codifican para 16 sistemas de dos componentes putativos, 4 Tyr-fosfatasas putativas, 3 Ser/Thr-kinasas putativas y 2 Ser/Thr-fosfatasas putativas. Dentro de las tres posibles kinasas se encuentra Lmo1820, una proteína de 655 aminoácidos y 72 KDa con un 49% de homología con PrkC y un 41% con PknB. Análisis de la secuencia de Lmo1820 reveló que ésta contiene 3 dominios PASTA en su porción extracelular, además de regiones conservadas que la ubican en la familia de STPKs eucariotas. Es una kinasa RD, vale decir, que posee un residuo de Arginina precediendo directamente al Aspartato catalítico de gran importancia para la actividad de la enzima. También cuenta con dos residuos de Glicina conservados dentro del motivo Gly-*loop* de su familia; se ha demostrado que éste posee un rol en la unión a ATP.



Figura 5: Dominios previstos para Lmo1820.

El gen codificante para Lmo1820, junto con *lmo1821*, que codifica para la fosfatasa Stp, forman parte de un operón putativo. El codón de inicio de *lmo1821* se superpone por tres nucleótidos con el de terminación de *lmo1820*, sugiriendo transcripción y traducción acopladas, y que codifican para proteínas producidas a niveles similares en la célula. Inmediatamente corriente abajo de *lmo1820*, y conformando una tríada similar a la encontrada en *Bacillus subtilis*, *lmo1819* codifica para EngC1, una probable GTPasa.

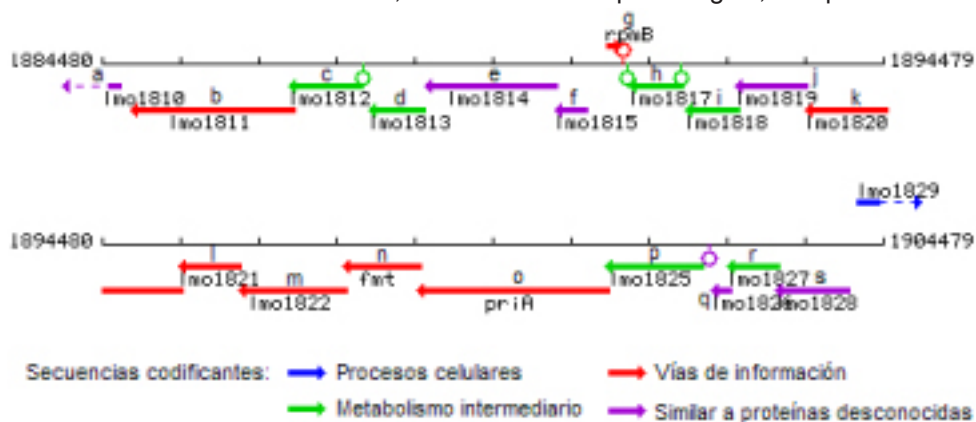


Figura 6: Región de *lmo1820* dentro del genoma de *L. monocytogenes*. a) similar a proteína desconocida, b) similar a ADN helicasa ATP-dependiente RecG, c) similar a L-serina deshidrogenasa, d) similar a fosfoglicerato deshidrogenasa, e)-f) similares a proteínas desconocidas, g) proteína ribosomal, h) débilmente similar a tiamina pirofosfoquinasa, i) similar a ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa, j) probable GTPasa EngC, k) similar a putativa Ser/Thr kinasa, l) fosfoproteína fosfatasa Stp, m) similar a proteína Sun de unión a ARN, n) similar a metionil-RNA-fosfotransferasa, o) similar al factor Y de replicación primosomal, p) similar a homóloga de flavoproteína de metabolismo de pantotenato, q) no caracterizada, r) similar a guanilato kinasa, s) similar a proteína hipotética conservada.

Además, la fosfatasa Stp ya se ha caracterizado (Archambaud et al, 2005). Posee 252 aminoácidos y se localiza en el citoplasma, aunque vinculada a la membrana plasmática. Es necesaria para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en modelos murinos y si bien no es esencial, se cree que posee un rol en la supervivencia del patógeno en el huésped infectado.

Su primer sustrato fisiológico caracterizado es EF-Tu, un factor de elongación durante la traducción de proteínas. Su forma activa (acoplado a GTP) media la correcta unión del ARNt amino-acilado al sitio aceptor en el ribosoma. Se ha podido comprobar que la fosforilación post-transcripcional de Ef-Tu impide su unión al ARNt amino-acilado; esto podría facilitar su liberación del ribosoma. La regulación de la síntesis proteica por fosforilación de este factor puede ser importante para la adaptación de *Listeria monocytogenes* a los ambientes adversos que encuentra en el huésped.

Por lo anteriormente mencionado, se tiene especial interés en caracterizar a Lmo1820. Una de las cuestiones principales es determinar si ésta es esencial para el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Se debe tener en cuenta que la estrategia actual de diseño de drogas contra patógenos consiste en identificar productos de genes que sean esenciales para su supervivencia y patogénesis. Si Lmo1820 fuese esencial para el desarrollo de *Listeria monocytogenes*, un inhibidor de esta kinasa podría representar un compuesto atractivo para su desarrollo como agente anti-listeriosis. Además, la determinación de sus sustratos fisiológicos aportará al conocimiento de la fisiología de este patógeno y, eventualmente, al diseño de drogas que impidan la interacción STPK-proteína blanco.

En el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, se han encontrado varias proteínas esenciales en este organismo. Ellas se encuentran involucradas en regulación de la proliferación celular, síntesis de la pared bacteriana, generación de energía y entrada y persistencia en el huésped. Estas proteínas, que incluyen STPKs, y sus vías asociadas se consideran blancos promisorios para drogas antituberculosis.

Por ejemplo, el inhibidor de proteín-quinasas 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H7) inhibe el crecimiento de *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette Guerin y *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. En el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, concentraciones micromolares de H7 inducen una disminución significativa en la actividad de PknB; esto resulta incompatible con el crecimiento micobacteriano. También mitoxantrona, un derivado de antraquinona utilizado en tratamientos contra el cáncer, es un inhibidor de PknB capaz de evitar el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis*. Incluso, varios inhibidores de proteínas esenciales y específicos de este patógeno ya se encuentran protegidos por patentes. Sería de máxima relevancia determinar si tal estrategia puede aplicarse a *Listeria monocytogenes*.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue ensayar estrategias que sirvan como base para la caracterización de la STPK Lmo1820 de *Listeria monocytogenes*. Para ello se procuró:

Obtener las construcciones necesarias para la mutación del gen *lmo1820* y así abrir el camino para determinar el rol fisiológico de la kinasa *in vivo* como un primer paso para el posible desarrollo de un nuevo agente anti-listeriosis.

Poner a punto un protocolo para la producción y purificación de su subunidad catalítica como proteína soluble, para estudios estructurales, mecanísticos y reconocimiento de posibles sustratos fisiológicos.

3. Materiales y métodos

Materiales y Métodos

Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	secuencia	Restricción
1820UU	GACAGGG <u>T</u> CGACGTTTTGAAAATAAAGATAA	<i>Sall</i>
1820UL	CGCCGCGAATTCCATGTA ^{3'} AAATCTTATATC	<i>EcoRI</i>
1820LU	TTCTCCC <u>C</u> ATGGCTATAAAATTATCAGTTGAT	<i>NcoI</i>
1820LL	GTTTCAAGATCTAAGTCATCCCATTCGATAGA	<i>BglII</i>
1820CU	GATGCTGGATCCTGATTGGTAAGCGATT	<i>BamHI</i>
1820CL	AACAATGTCGACCTATTTCTTTTCTTGCTCAT	<i>Sall</i>

Tabla 2: Oligonucleótidos diseñados. La secuencia se encuentra indicada desde el extremo 5' al 3'. Las bases subrayadas corresponden al sitio de restricción generado en el oligonucleótido.

Plásmidos y cepas bacterianas de interés para este trabajo.

PLÁSMIDO	Genotipo / características	referencia
pMAD	Ori termosensible para Gram positivas (Ori pE194 ^{ts}), Ori pBR325, <i>ermC</i> , <i>bgaB</i> , <i>pclpB</i> , SCM. Amp ^R	Arnaud et al, 2004
pQE32	Vector de expresión. PT5, lacO, RBS, ATG, secuencia para cola de 6xHis, SCM, codones de terminación en los tres marcos de lectura, Ori ColE1, <i>lacIq</i> . Amp ^R	The Qiaexpressionist Handbook
pTOPO	Vector para clonado de productos de PCR con extremos romos. Plac, <i>lacZα</i> , <i>ccdB</i> , Ori pUC, SCM, sitios de anillado del promotor SP6 y M13 FWD y REV. Amp ^R Zeo ^R	Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit Manual
pGES309	5'3' <i>fapR</i> _{Lmo} ::pMad <i>BamHI/Sall</i> Amp ^R Tet ^R	G. Schujman, comunicación personal
pMJ1	<i>lmo1820</i> ₁₋₃₃₈ ::pQE32 <i>BamHI/Sall</i> Amp ^R Tet ^R	Este trabajo
pMJ2	<i>lmo1820</i> ₂₇₉₆₋₃₅₇₅ ::pMAD <i>NcoI/BglII</i> Amp ^R	Este trabajo
pMJ3	<i>lmo1820</i> ₁₋₁₁₅₀ ::pBlueScript <i>XhoI/PstI</i> Amp ^R	Este trabajo
pMJ4	<i>lmo1820</i> ₁₉₇₋₉₅₈ ::pTOPO Kan ^R	Este trabajo

Tabla 3: Plásmidos utilizados.

CEPA	Genotipo	referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F ⁻ , φ80d <i>lacZΔM15</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac F'</i> [<i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Bullock et al, 1987
M15	Derivada de <i>E. coli</i> K12 [pREP4]	The Qiaexpressionist Handbook
<i>Listeria monocytogenes</i>		
EGD-e	Serotipo 1/2a – wt	Glaser et al, 2001

Tabla 4: Cepas utilizadas.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador My Cycler (Bio-Rad) y en la siguiente mezcla de reacción: Deep Vent pol (Invitrogen) 0,5 U, Buffer TermoPol (Invitrogen), dNTPs (Invitrogen) 0,3 mM c/u, oligonucleótidos (Sigma-Aldrich) 1 μM c/u. El molde fue DNA cromosomal o plasmídico de *Listeria monocytogenes*, según el caso, y la mezcla se llevó a volumen final de 25 μl con Agua MilliQ (Millipore).

FASE	TEMPERATURA	TIEMPO	
Desnaturalización inicial	94°C	45''	
Desnaturalización	94°C	30''	35 ciclos
Anillado	58°C (<i>lmo1820u</i> y <i>lmo1820l</i>)	40''	
	60°C (<i>lmo1820c</i>)		
Extensión	72°C	1'10''	
Extensión final	72°C	5'	

Tabla 5: Ciclado para la amplificación de los fragmentos de interés.

Electroforesis en geles de agarosa.

La separación de moléculas de ADN de interés se realizó por electroforesis en geles de agarosa utilizando el sistema tipo submarino (Sambrook et al, 1989). Se usaron concentraciones de agarosa de 1,5%, 1,1% y 0,8% p/v en buffer TAE 1X (TAE 50X: Tris-acetato 2M pH=8,0, EDTA 50mM pH 8,0). Las muestras se sembraron mezcladas en una proporción 9:1 con solución de siembra 10X para ADN (Azul de bromofenol 0,25% p/v, Xilene cianol 0,25% p/v, Glicerol 30% v/v). Los marcadores de peso molecular fueron λ HindIII, λ BstE, 100bp ladder y 400bp ladder (PB-L). La corrida se llevó a cabo en buffer TAE a 90 V y por el tiempo que fuese necesario, teniendo en cuenta que el azul de bromofenol del buffer de siembra corre como 300 bp y el xylene cianol FF como 4 Kb (en geles de agarosa entre 0,5 y 1,4%). Los geles se tiñeron posteriormente en el mismo tipo de buffer adicionado con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) durante 15'. La visualización por fluorescencia se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo M-20, potencia 48 W), $\lambda=302$ nm. La imagen se digitalizó con el equipo Gel Doc 1000 utilizando el programa Molecular Analyst 1.5 (BioRad).

Purificación de ADN.

Para purificar bandas de ADN a partir de geles de agarosa o fragmentos a partir de soluciones, se empleó el sistema comercial Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Obtención de ADN plasmídico.

Para las preparaciones de ADN plasmídico se utilizó el *kit* Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) según las indicaciones de su proveedor, a partir de 5 ml de cultivo saturado. Los plásmidos purificados se conservaron a -20°C . También se hizo uso de la técnica de lisis alcalina (Birnboim, Doly, 1979). Brevemente, se partió de 3 ml de cultivo saturado que fue centrifugado durante 1' a máxima velocidad y temperatura ambiente en centrífuga Spectrafuge 16M (Labnet). Las bacterias se resuspendieron en 200 μ l de buffer GTE (Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM. pH=8) y se agregaron 300 μ l de NaOH 0,2 N/1% SDS. Se mezcló por inversión suave e incubó en hielo por 5'. La reacción se neutralizó por adición de 300 μ l de acetato de potasio 3 M (pH=4,8), y se incubó en hielo durante 5'. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación 10' a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le agregaron 2 μ l de RNAsa A (10 μ g/ml), libre de DNAsas, y fue incubado a 37°C por 20'. Luego, se extrajo el sobrenadante dos veces con 400 μ l de cloroformo y de la capa acuosa se precipitó el DNA total por agregado de un volumen igual de isopropanol 100%. El tubo se centrifugó inmediatamente por 10' a temperatura ambiente y el pellet fue lavado con 500 μ l de etanol 70% y secado bajo vacío por 10' a 60°C para luego disolverlo en 30 μ l de agua MilliQ y conservarlo a -20°C .

Cuando fue necesario, el ADN plasmídico se cuantificó por absorbancia de luz UV a 260 nm en cubetas de cuarzo rectangulares de 1 cm y utilizando los espectrofotómetros DU640 (Beckman) o Jasco 5000 (Jasco).

Manipulación de ADN con enzimas de biología molecular.

El ADN fue digerido con enzimas de restricción siguiendo las recomendaciones de sus proveedores. Los fragmentos de ADN fueron ligados a sus respectivos vectores con T4 ADN ligasa, también de acuerdo a las indicaciones de su proveedor (Promega).

Medios y condiciones de cultivo.

Las cepas de *E. coli* fueron mantenidas en placas de Petri en medio LB y se repicaron cada 7-10 días a placas frescas. Stocks de cada cepa se conservaron por duplicado a -70°C en medio LB líquido conteniendo 15% glicerol. La cepa de *L. monocytogenes* descrita fue almacenada en placas de Petri en medio BHI y se repicó cada 15-20 días a medio fresco. Stocks de la misma fueron guardados a -70°C en BHI líquido con glicerol 15%.

Cuando fue necesario se agregaron a las placas o medios líquidos los siguientes antibióticos: Kanamicina (25-50 mg/ml), Tetraciclina (10 mg/ml), Eritromicina (5 mg/ml), o Ampicilina (100 mg/ml) y también X-Gal (40 mg/ml).

Los medios utilizados se describen a continuación:

Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al, 1989). Para crecimiento de *E. coli* en medio líquido.

Triptona	10,0 g/l
Extracto de levadura	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l

LB Agar. Para crecimiento de *E. coli* en medio sólido.

LB suplementado con 15,0 g/l de agar para bacteriología.

Medio de recuperación. Para la recuperación de células después de la electroporación.

LB suplementado con:

MgCl ₂	1,175 g/l
MgSO ₄	3,075 g/l
Glucosa	4,000 g/l

BHI (OXOID). Para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en medio líquido.

Infusión de cerebro de ternero	200,0 g/l
Infusión de corazón de buey	250,0 g/l
Peptona proteasa	10,0 g/l
Glucosa	2,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Hidrogenofosfato disódico anhidro	2,5 g/l
Medio de tiol	3,0 g/l

BHI Agar. Para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en medio sólido.

BHI suplementado con 15,0 g/l de agar.

HTM (Tsai, Hodgson, 2003). Para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en medio mínimo.

MOPS pH=7,4	100,00 mM
KH ₂ PO ₄	4,82 mM
Na ₂ HPO ₄	11,55 mM
MgSO ₄	1,70 mM
Citrato férrico	2,00 µg/ml
Glucosa	55,00 mM
Tiamina	2,96 µM
Riboflavina	1,33 µM
Biotina	2,05 µM
Ácido lipoico	24,00 pM
Cisteína	0,10 mg/ml
Metionina	0,10 mg/ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,60 mg/ml

Transformaciones.

Química.

Células competentes de *E. coli* fueron preparadas usando el procedimiento de cloruro de calcio (Sambrook et al, 1989). En pocas palabras, ya que para cada ensayo de transformación se necesitan 1,5 ml de cultivo inicial, se inoculó la dicha cantidad de LB con 1 colonia de *E. coli* DH5α o XL1-Blue proveniente de una placa fresca. Se incubaron las células con agitación a 37°C hasta una densidad de 5x10⁷ cél/ml (DO₆₀₀=0,5). Ésta se cuantificó en cubetas de cuarzo rectangulares de 1 cm y utilizando el espectrofotómetro DU640 (Beckman). Las células se recuperaron por centrifugación en equipo Biofuge 15R con rotor 3743 (Heraeus Sepatech) durante 4' a 7100 rpm a 4°C. El pellet se lavó una vez con 500 µl de solución 1 (MOPS 10 mM, KCl 10 mM. pH=7) estéril y fría y una vez con 500 µl de solución 2 (MOPS 100 mM, CaCl₂ 50 mM, KCl 10 mM. pH=6,5) estéril y fría, dejando las células 15' en hielo luego del agregado de la solución 2. Luego de recuperar las células por una centrifugación igual a la anteriormente mencionada, se resuspendieron las células en 100 µl de solución 2.

A estas células competentes se les agregó 1-200 ng de DNA del plásmido correspondiente en un volumen de 5 µl y se colocaron hielo por 30' para luego transferirlas a un baño de agua a 43-44°C por 30" y pasarlas a hielo durante 2'. Las células se recuperaron en 900 µl de LB durante 60' a 37°C con agitación y se sembraron en placas de Petri 90x15 (MASSOBACT) en medio LBA selectivo y se incubaron a 37°C por 18 hs.

Electroporación.

Se prepararon células electrocompetentes de *E. coli* según el protocolo recomendado por el fabricante del electroporador (Ausubel, 1987; Miller and Nickoloff, 1995) con algunas modificaciones. Brevemente, se inoculó 1 L de medio LB suplementado con $MgCl_2$ 10 mM y precalentado durante 30' a 37°C con un preinóculo 1/100 de células de *E. coli* DH5 α o XL1-Blue. El cultivo se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600} = 0,5-0,8. Se dejó el cultivo en hielo durante 30' para luego centrifugarlo en una Sorvall con rotor GS3 (Thermo Scientific) durante 10' a 4000 rpm a 4°C. Las células se lavaron dos veces, primero con un volumen igual de agua MilliQ estéril fría y luego con la mitad del volumen. Posteriormente se realizó un lavado con 20 ml de glicerol 10% frío, seguido por la resuspensión de las células en 2 ml del mismo glicerol. Las células se alicuotaron de a 80 μ l, se congelaron con N_2 y se conservaron a -70°C.

Alícuotas de 38 μ l de estas bacterias electrocompetentes se mezclaron con 1-5 μ l del plásmido correspondiente en cubetas de 0,2 cm de hendidura (Bio-Rad) y fueron transformadas por electroporación usando el equipo MicroPulser (BioRad). El pulso eléctrico fue de 2,5 V y una constante de tiempo de aproximadamente 5 mseg. A las células se les permitió recuperarse en 900 μ l de medio de recuperación formulado en el laboratorio precalentado a 37°C durante 60' a 37°C con agitación. La selección de transformantes se realizó en medio LB sólido con el antibiótico apropiado, incubando las placas a 37°C durante 18 hs.

Además, se calculó la eficiencia de transformación de ambos tipos de células utilizando el plásmido pMAD, de concentración determinada por absorbancia.

Identificación de transformantes.

Las cantidad de colonias obtenidas luego de incubar las placas de transformaciones por 18 hs se compararon entre la transformación con vector conteniendo inserto y el control de religación. Las colonias de interés fueron sometidas a PCR de colonia con los cebadores adecuados para amplificar el fragmento esperado. De aquellas que resultaron positivas se obtuvo el ADN plasmídico y se lo digirió con las enzimas apropiadas, de modo de comprobar efectivamente la presencia del inserto mediante una electroforesis en gel de agarosa.

Construcción de plásmidos.

Para la mutación de *lmo1820*

La construcción para eliminar el gen *lmo1820* se realizó utilizando el plásmido pMAD (Arnaud et al, 2004). Al mismo se le deben clonar en tándem fragmentos de aproximadamente 800 pb flanqueantes al gen de interés; éste luego permitirá la integración de dichos fragmentos, por dos eventos simples de recombinación homóloga, en el locus del *lmo1820*, generando mutantes nulas para dicho gen.

Se comenzó por realizar construcciones independientes de cada fragmento clonado en el pMAD. Al plásmido así obtenido luego se le agregaría el fragmento faltante. Para obtener la porción corriente arriba de *lmo1820*, se amplificó por PCR un fragmento de 762 pb (*lmo1820u*), utilizando los oligonucleótidos 1820UU y 1820UL, a partir de ADN cromosomal de la cepa silvestre EGD-e. El fragmento generado fue purificado y digerido con las enzimas *SalI* y *EcoRI* y ligado con el vector pMAD digerido en iguales condiciones. Cepas de *E. coli* DH5 α y XL1-Blue fueron transformadas químicamente y por electroporación con dicho plásmido.

Para obtener la construcción con el fragmento corriente abajo de *lmo1820*, se utilizó la reacción de PCR con ADN cromosomal de la cepa EGD-e como molde y los oligonucleótidos 1820LU y 1820LL. El fragmento generado, de 780 pb (*lmo1820l*), se purificó y digirió con las enzimas *NcoI* y *BglII* para luego clonarlo en el mismo sitio del vector, obteniéndose el plásmido MJ2. La cepa de *E. coli* DH5 α fue transformada con ese plásmido para conservarlo y propagarlo.

Teniendo en cuenta que no fue posible obtener el plásmido pMAD conteniendo el fragmento *lmo1820u*, se intentó clonar el mismo fragmento en los vectores pBlueScript II SK(+) (Fermentas) y pJM114 (Perego, 1993) por el mismo método. También se ensayó clonar a *lmo1820u* como producto de PCR con extremos romos en el vector pTOPO Zero Blunt (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor; así se obtuvo el plásmido MJ4. Se verificó la orientación del inserto respecto del promotor SP6 del plásmido, con las enzimas *BamHI*, *SalI* y *EcoRV* y luego se utilizó dicho plásmido para transformar células DH5 α de *E. coli* y así conservarlo. También fue enviado a secuenciar con el cebador SP6 a la Universidad de Maine, EEUU.

Para la expresión de la subunidad catalítica de la kinasa

El dominio catálico de *lmo1820* fue definido por el alineamiento de su secuencias con la kinasa homóloga de *Bacillus subtilis*, PrkC. Sabiendo que en ésta dicha subunidad comprende los primeros 329 aminoácidos, se seleccionaron los aminoácidos 1 a 338 de *lmo1820*, correspondientes a los nucleótidos 1 a 1038.

Se amplificó por PCR dicho fragmento (*lmo1820c*) empleando los cebadores 1820CU y 1820CL y

ADN cromosomal de la cepa silvestre EGD-e como molde. El producto de amplificación fue purificado y digerido con las enzimas *Sall* y *BamHI* y se clonó en los mismo sitios del plásmido pQE32 (Qiagen), construyéndose el plásmido MJ1. Éste contiene el promotor fuerte del fago T5 bajo represión de dos secuencias operadoras *lac* y expresión dependiente de IPTG. Además, permite expresar la proteína de interés con una cola de 6xHistidina para su posterior purificación por cromatografía de afinidad. El plásmido fue utilizado para transformar células XL1-Blue de *E. coli* y la cepa de expresión M15-[pREP4] del mismo organismo; también fue enviado a secuenciar con los cebadores pQE30FWD y pQE30REV a la Universidad de Maine, EEUU.

Con el objetivo de comprobar que la construcción MJ1 se encuentra efectivamente en fase, se digirió una alícuota del plásmido MJ1 con las enzimas de restricción *XhoI* y *PstI* para obtener y purificar un producto de 1150 pb, que contiene 1037 pb de lmo1820c y 113 pb correspondientes al plásmido, para asegurar mayor fidelidad en la secuenciación al comienzo del gen. Este fragmento se clonó en los mismo sitios del plásmido pBlueScript, obteniéndose el plásmido MJ3. El mismo fue utilizado para transformar células DH5 α de *E. coli* y se envió a secuenciar con los cebadores M13FWD y M13REV a la Universidad de Maine, EEUU.

Curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Las curvas de crecimiento se realizaron con el propósito principal de ensayar el medio HTM y en un futuro utilizarlo para caracterizar el crecimiento de la cepa mutante a obtener. Se inoculó dicho medio, llevándolo a una $DO_{600} \approx 0,1$, con un cultivo de *Listeria monocytogenes* EGD-e previamente saturado. El cultivo se incubó en baño termostático a 37°C con agitación de 210 rpm. También se ensayó el medio HTM suplementado con cas-aminoácidos 1% p/v. El crecimiento bacteriano fue monitoreado midiendo la DO_{600} a intervalos de tiempo lo más regulares posibles.

Preparación de *Listeria monocytogenes* electrocompetentes.

Se prepararon células electrocompetentes de *L. monocytogenes* según el método estándar del laboratorio (Park, Stewart, 1990, con modificaciones). En resumen, se inocularon 100 ml de medio BHI con un preinóculo 1/50 de células de *Listeria monocytogenes* EGD-e de un cultivo saturado. Se incubaron las células a 37°C con agitación a 210 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,2$; luego se les agregó Penicilina G a una concentración final de 0,08 $\mu\text{g/ml}$ y se continuó la incubación bajo las mismas condiciones por 2 hs. Las células se recuperaron por centrifugación durante 20' a 4000 rpm a 4°C y se lavaron tres veces, con volúmenes de 1, 2/3 y 1/3 del volumen inicial, de buffer de electroporación para *Listeria* (Sacarosa 816 mM, MgCl_2 1 mM. pH=6,5-7). Finalmente, se resuspendieron las células en 1 ml del mismo buffer y se alicuotaron de a 100 μl para guardarlas de inmediato a -70°C.

Estas bacterias se mezclaron con 5-10 μl del plásmido necesario en cubetas de 0,2 cm de hendidura (Bio-Rad) y fueron transformadas por electroporación usando el equipo MicroPulser (BioRad). El pulso eléctrico fue de 2,5 V y la constante de tiempo de aproximadamente 5 mseg. A las células se las dejó recuperando con 900 μl de medio BHI previamente calentado a 37°C durante 3 hs a 37°C con agitación. La selección de transformantes se realizó en medio BHI selectivo sólido, incubando las placas por 48 hs a 30°C.

También se calculó la eficiencia de transformación de estas células utilizando el plásmido control pGES309, cuya concentración fue determinada por absorbancia.

Expresión de Lmo1820c.

La inducción de la expresión de Lmo1820c se realizó en la cepa madre (XL1-Blue) y en la cepa de expresión M15[pREP4]. Como control se utilizaron cepas conteniendo el vector pQE32. Para estos experimentos, el protocolo fue el siguiente:

5 ml de medio LB suplementado con los antibióticos necesarios se inocularon con una colonia de la cepa correspondiente y el cultivo se dejó crecer a 37°C con agitación hasta una $DO_{600} = 0,6-0,8$. Se alicuotó 1 ml del mismo y se lo centrifugó durante 2' a máxima velocidad y el pellet fue almacenado a -20°C como control no inducido. Al mismo tiempo, a 2 ml del cultivo original se les agregó IPTG para obtener una concentración final 0,5-1 mM y se incubó a 37°C con agitación durante 3-4 hs para luego centrifugarlo por 2' a velocidad máxima y almacenar el pellet a -20°C. Posteriormente, ambos pellets se resuspendieron en buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8), 180 μl por unidad de DO y por ml centrifugado para igualar las cantidades de proteína a sembrarse y poder realizar comparaciones posteriores. Las muestras así obtenidas se resolvieron en geles de poliacrilamida.

Purificación de Lmo1820c.

Se ensayó la purificación de la subunidad catalítica de la kinasa a partir de la cepa de expresión por dos métodos diferentes: en lote bajo condiciones desnaturizantes y en columna en condiciones nativas. Para ello, se partió, en cada caso, de 100 ml de medio LB selectivo, que fue inoculado con una ansada de la cepa MJ5. Este cultivo se dejó creciendo a 37°C con agitación hasta una $DO_{600}=0,6-0,8$ y luego se siguieron los protocolos de lisis y purificación correspondientes, a partir del manual The Qiaexpressionist (Qiagen). Las muestras que se obtuvieron fueron analizadas por SDS-PAGE.

En lote.

Brevemente, el pellet obtenido se resuspendió en buffer B (5 ml/gr) y se dejó agitando suavemente en un agitador oscilatorio durante 60'. Mientras tanto, 200 μ l de resina se equilibraron en un tubo eppendorf, mediante lavados con 500 μ l de agua MilliQ y con 500 μ l de buffer B (Urea 8M, pH=8). A la resina se le agregó luego el sobrenadante del lisado y se los dejó interaccionar durante 60' en el mismo agitador. Posteriormente, y por centrifugaciones sucesivas, se fueron recogiendo *flow-through* y las fracciones correspondientes a los 2 lavados con buffer C (Urea 8M, pH=6,3), 4 eluciones con buffer D (Urea 8M, pH=5,9) y 4 eluciones con buffer E (Urea 8M, pH=4,5).

En columna en condiciones nativas.

Para esta purificación, el pellet del cultivo inducido fue incubado 15' en hielo. Luego se le agregó el buffer de lisis (Imidazol 10mM, pH=8) y se lo sonicó por 4 ciclos de 30" cada uno a 40Hz intercalados con 1' de descanso en equipo Vibra Cell (Sonicos and Materials INC). El lisado se centrifugó posteriormente durante 20' a 10000 g a 4°C, mientras se le agregaban 500 μ l más de resina a la columna ya preparada y se equilibraba con 5 ml de buffer de lisis. La resina luego se recogió y, se dejó ligando con el sobrenadante de la lisis durante 60' en agitador magnético. Esta mezcla se colocó en la columna y, luego de recolectar el *flow-through*, se realizaron dos lavados con buffer para ese fin (Imidazol 20mM, pH=8) y se eluyó cuatro veces con buffer de elución (Imidazol 250mM, pH=8), obteniéndose las fracciones correspondientes a cada caso.

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida para el análisis y separación de proteínas en condiciones desnaturizantes se llevó a cabo con el equipo MiniProtean System (Bio-Rad). Se prepararon geles de 8,5 x 8,5 cm y 0,75 mm de espesor y una concentración de acrilamida del 12%.

Reactivo	gel de corrida	gel separador
Solución A	1,2 ml	0,4 ml
Solución B	0,75 ml	-
Solución C	-	0,5 ml
H ₂ O	1,05 ml	1,1 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l
PSA 10%	15 μ l	30 μ l

Tabla 6: Formulación de los geles para SDS-PAGE.

Las muestras se mezclaron con 5 μ l de buffer para muestras proteicas 5X (60 mM Tris-HCl, 25% p/v glicerol, 2% p/v SDS, 14,4 mM β -mercaptoetanol, 0,1% p/v azul de bromofenol) y se hirvieron a 98°C por 7'. Luego se sembraron en el gel, junto con el marcador de peso molecular, SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low-Range (Bio-Rad). La corrida se llevó a cabo en buffer de corrida desnaturizante 1X (25 mM Tris-HCl, 0,1% p/v SDS, 192 mM Gly. pH \approx 8,3) durante 60' a 190 V y los geles se fijaron durante 10' con ácido acético 10% y se tiñeron posteriormente con Coomassie Blue R (Sigma-Aldrich) durante 30' en agitador oscilatorio. Para desteñirlos, se los hirvió en agua durante 10'. La imagen se digitalizó con scanner fijo y el programa Adobe PhotoShop 7.0.

Solución A: 30% p/v Acrilamida, 0,8% p/v Bis-acrilamida.

Solución B (4X buffer para gel de corrida): 1,5 M Tris-HCl, 0,4% p/v SDS. pH=8,8.

Solución C (4X buffer para gel concentrador): 0,5 M Tris-HCl, 0,4% p/v SDS. pH=6,8.

Cuantificación de Lmo1820c purificada.

Para determinar la concentración de proteína Lmo1820c purificada bajo condiciones desnaturizantes se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). En resumen, se prepararon 5 diluciones (en 300 µl) por duplicado de un estándar de seroalbúmina bovina cuantificada por absorbancia (0,75 mg/ml) que cubre las cantidades de 2 a 15 µg de proteína. Además, se preparó un blanco conteniendo agua solamente. A todas se les agregó 300 µl de Coomassie Blue G-250 (Sigma-Aldrich) y se las incubó a temperatura ambiente por 10'. Sus absorbancias, medidas a 595 nm en espectrofotómetro DU640 (Beckman), fueron analizadas y se utilizaron para generar una curva estándar en el programa SigmaPlot. Las distintas fracciones que revelaron poseer proteína en el SDS-PAGE se mezclaron y de allí se tomaron 2 y 10 µl para preparar diluciones en 300 µl por triplicado. A éstas se les agregó 300 µl de Coomassie Blue G-250 y luego de incubarlas a temperatura ambiente por 10' se midieron sus absorbancia a 595 nm. Los datos obtenidos se compararon con la curva patrón y también se realizó una regresión lineal en SigmaPlot, ambos para calcular la cantidad de proteína purificada.

Herramientas bioinformáticas.

Se utilizaron los programas EditSeq, MapDraw y Seqman del paquete DNASTar para realizar los alineamientos de secuencias y determinar sitios de restricción. Mediante SigmaPlot y Microsoft Excel se realizó la curva estándar del método de Bradford para la purificación de Lmo1820c y su cuantificación. Además, se contó con la base de datos KinG para la predicción de subdominios dentro de la secuencia de esta kinasa y el servidor de proteómica ExPASy para un análisis más a fondo de la misma.

4. Resultados y discusión

4.1. Delección de *lmo1820*.

Con el objetivo de generar una cepa de *Listeria monocytogenes* mutante por inactivación del gen *lmo1820*, que codifica para la Ser/Thr kinasa de interés, se utilizó el vector termosensible pMAD. Éste es específico para bacterias Gram positivas de bajo contenido de G+C, no competentes naturalmente.

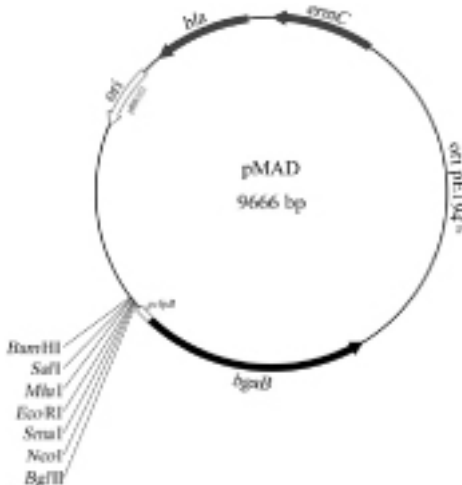


Figura 7: Mapa del plásmido pMAD. Se indican los sitios únicos de restricción.

La estrategia se basa en generar una construcción donde, dentro del sitio de clonado múltiple del vector, se encuentren clonados en tándem fragmentos de aproximadamente 800 pb flanqueantes al gen de interés.

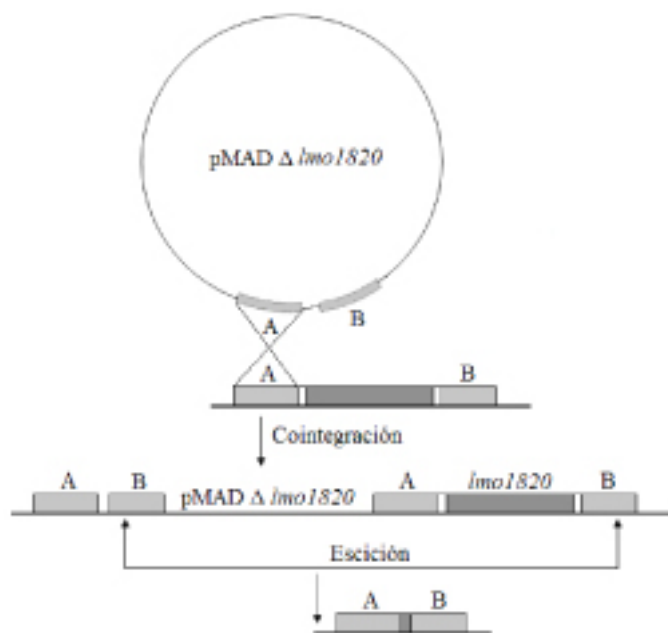


Figura 8: Mecanismo de acción del pMAD para la mutación de *lmo1820*. A: *lmo1820u*, B: *lmo1820l*.

Con esta construcción se debe electroporar *Listeria monocytogenes* e incubar las células a la temperatura permisiva para la replicación del plásmido. Posteriormente, se fuerza la integración del mismo al cromosoma bacteriano mediante un simple evento de recombinación; los clones se seleccionan por crecimiento a la temperatura no permisiva, mientras se mantiene presión selectiva. Los cointegrantes se crecen luego a la temperatura permisiva y tiene lugar el segundo evento de recombinación, que resulta en la escisión del plásmido del cromosoma bacteriano. La identificación de clones donde la segunda recombinación fue eficiente (la pérdida del vector es concomitante con la delección del gen de interés) se lleva a cabo por análisis colorimétrico, ya que la remoción del vector lleva a la pérdida del gen *bgaB* que codifica para una β -galactosidasa.

Se comenzó por amplificar fragmentos corriente arriba y abajo de *lmo1820*, teniendo en cuenta que estos debían contener sólo unos pocos pares de bases de dicho gen y el resto debían pertenecer a los genes flanqueantes a *lmo1820*. Se obtuvieron los fragmentos *lmo1820u* y *lmo1820l*, que fueron ligados por separado en pMAD y electroporados o transformados químicamente en *E. coli*, como se mencionó en Materiales y Métodos.

Se logró obtener el plásmido MJ2 que contenía al fragmento corriente abajo de *lmo1820* y mantenerlo en *E. coli* DH5 α . Esta construcción demostró que el fragmento no es tóxico en ese organismo. Sin embargo, la existencia de sitios de restricción para *EcoRI* y *Sall* en *lmo1820l* imposibilita el clonado de *lmo1820u* en este plásmido; esto se debe a que son los mismos sitios presentes en los extremos del fragmento corriente arriba.

La estrategia diseñada dependía de obtener un plásmido que contuviese a *lmo1820u* en pMAD para luego incorporar *lmo1820l*. Pese a que se realizaron múltiples intentos, esto no fue posible. Se ensayaron diversos métodos y se realizaron numerosos controles, ya sea de digestión, ligación o presencia de los fragmentos luego de su purificación. En todos los casos, se obtuvo una mayor cantidad de colonias en el control de religación (vector pMAD digerido con *EcoRI* y *Sall*) y de aquellas con inserto ninguna dio positiva. Para intentar sobrepasar este inconveniente, y asegurarse de que el problema no fuese el vector, se intentó clonar el fragmento en otros plásmidos, pBlueScript SK + y pJM114, con la esperanza de poder luego subclonarlo al pMAD; estas estrategias tampoco rindieron frutos.

Por último, se decidió utilizar el vector pTOPO para clonar a *lmo1820u* como producto de PCR con extremos romos en 5'. El plásmido se encuentra linealizado y posee la Topoisomerasa I del virus Vaccina unida covalentemente al extremo 3' de cada hebra mediante una unión fosfo-tirosil. Ésta puede ser atacada por el grupo hidroxilo del extremo 5' de la cadena original, revirtiendo la reacción y liberando la topoisomerasa. La selección de transformantes es directa, por la disrupción del gen *ccdB*, cuyo producto es letal para *E. coli*.

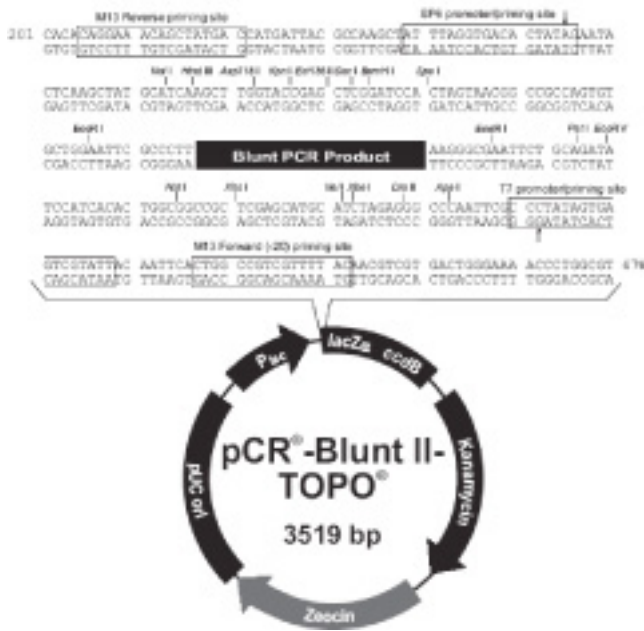


Figura 9: Mapa del vector pTOPO.

En este caso fue posible obtener transformantes positivas y así contar con el plásmido MJ4. Éste contiene al fragmento corriente arriba de *lmo1820* en orientación invertida respecto al promotor del vector. La secuenciación del inserto contenido confirmó que los sitios *EcoRI* y *SalI* estaban presentes en los extremos del fragmento y que la secuencia era idéntica a la depositada en los bancos de datos.

A partir de esta construcción se intentó liberar a *lmo1820u* con las enzimas de restricción cuyos sitios le son propios, para luego clonarlo en el pMAD. Pese a que el fragmento era liberado, y era el correcto según su secuencia, no se logró el clonado. También se ensayó el clonado con otras enzimas y con el fragmento en las 2 orientaciones para averiguar si éste resultaba tóxico, pero los resultados no fueron concluyentes.

Si bien la eficiencia de las células competentes preparadas resultó baja, 10^3 transformantes/ μg DNA para químicas y 10^6 para electrocompetentes, esto justifica la imposibilidad de realizar el clonado, considerando que se obtuvieron colonias en el control de religación. Cabría pensar que el fragmento es tóxico y, para confirmar esta idea, se debería repetir el experimento pero ligando el fragmento en sus dos orientaciones posibles.

4.2. Electroporación de *L. monocytogenes*.

Aunque no fue posible obtener la construcción necesaria para la mutación de la cepa, se ensayó la electroporación con el plásmido MJ2 de *Listeria monocytogenes* EGD-e electrocompetentes preparadas de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. También se calculó su eficiencia de transformación y si bien ésta fue en extremo baja, 10^2 transformantes/ μg DNA contra los 4×10^6 óptimos, se pudieron obtener clones positivos para el fragmento corriente abajo de *lmo1820*. Esto demuestra que la estrategia es válida, siempre y cuando sea posible obtener las construcciones necesarias.

4.3. Curvas de crecimiento.

Si bien el medio complejo BHI es útil para cultivar *Listeria monocytogenes*, no es la mejor alternativa para experimentos donde es necesario un medio de cultivo reproducible, ya que se desconoce su composición exacta y ésta cambia entre lotes. Por ello, resulta preferible utilizar medios químicamente definidos. Más aún, para determinar si un gen es o no esencial, lo adecuado es utilizar medio mínimo, para evitar que los nutrientes del medio enmascaren la esencialidad del gen estudiado.

Con el objetivo de ensayar un medio mínimo para cultivar la cepa de *Listeria monocytogenes lmo1820* a obtener, se probó con el medio HTM, el más simple formulado hasta ahora. Éste contiene Metionina y Cisteína como únicos aminoácidos, ya que se considera que son los únicos necesarios para el crecimiento de ciertas cepas de *L. monocytogenes* (Tsai, Hodgson, 2003). Además, cuenta con las vitaminas esenciales, riboflavina y ácido lipoico, y con biotina y tiamina, que son necesarias para la formación normal de colonias.

En nuestro laboratorio no fue posible crecer la cepa EGD-e en las condiciones descritas, pese a los múltiples intentos que se realizaron en este trabajo y en otros previos. Sólo se obtuvo desarrollo bacteriano al suplementar el medio con cas-aminoácidos 1%. Bajo estas condiciones, se realizó por duplicado una curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes*. En ésta puede observarse una pronunciada muerte bacteriana relacionada con la adaptación al medio.

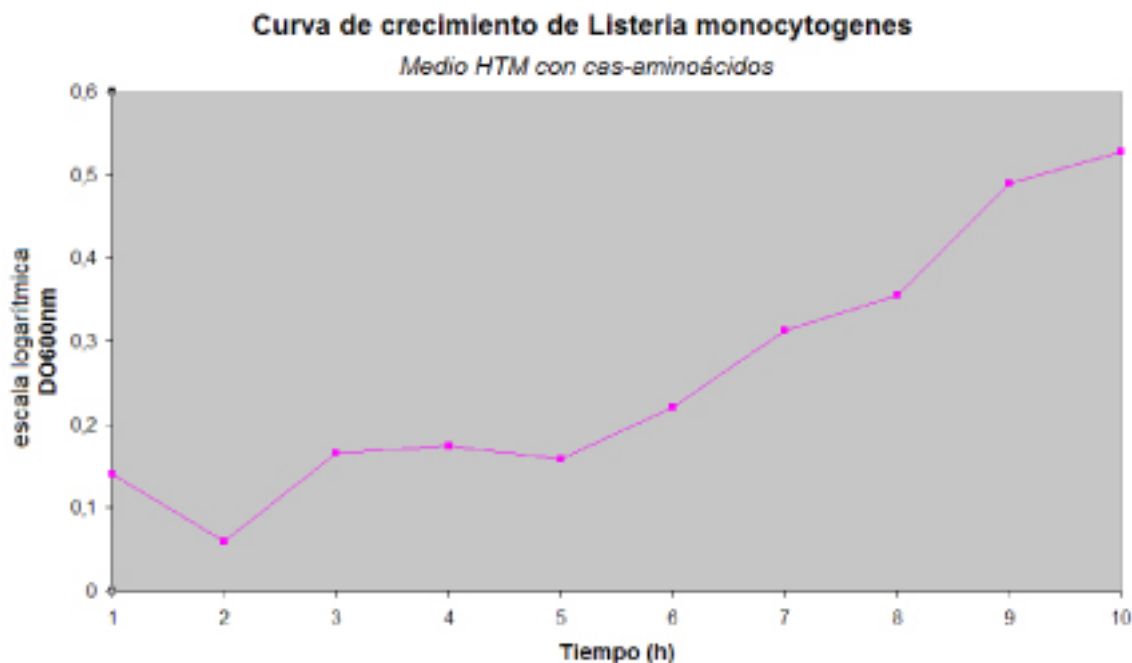


Figura 10: Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

La falta de crecimiento bacteriano en el medio HTM reportado lleva a pensar que éste carece de algún otro aminoácido también esencial, al menos para la cepa EGD-e de *Listeria monocytogenes*. Se ha reportado que la misma no requiere necesariamente Metionina (Tsai, Hodgson, 2003), pero sí Leucina, Valina y Cisteína para su desarrollo (Tsai, Hodgson, 2003; Wouters et al, 2005). Estos aminoácidos se encuentran presentes en los medios IMM (Phan-Thanh, Gormon, 1997), el de elección en la mayor parte de la literatura, y en el medio Premaratne (Premaratne et al, 1991). Estos son mucho más complejos que HTM, pero incorporan efectivamente Leucina y Valina, entre otros. Por lo tanto, estos podrían ser los aminoácidos faltantes en la formulación del medio HTM que resulta en su incompatibilidad con el crecimiento de *Listeria monocytogenes* EGD-e bajo las condiciones ensayadas en nuestro laboratorio.

4.4. Expresión y purificación de Lmo1820c.

A fin de obtener la subunidad catalítica de la kinasa como proteína recombinante pura, se utilizó el sistema The Qiaexpressionist (Qiagen). Éste se basa en generar construcciones para la expresión de proteínas con cola de 6x(His) para su posterior purificación por cromatografía de afinidad.

En *E. coli* se obtiene un alto nivel de expresión de la proteína recombinante utilizando los vectores pQE, de bajo número de copias, que están basados en el sistema de transcripción-traducción del promotor fuerte del fago T5. Brevemente, poseen un elemento promotor-operador proveniente de dicho fago, que es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli* y dos secuencias operadoras *lac* que aseguran la represión de dicho promotor en ausencia del inductor IPTG. Además, cuentan con los nucleótidos codificantes para la generación de una cola de 6x(His) (CATCAC)₃ y codones de terminación.

La expresión de proteínas codificadas dentro del vector se induce rápidamente por la adición de IPTG, que se une a la proteína represora LacI y la inactiva para que la ARN polimerasa pueda transcribir las secuencias corriente abajo del promotor T5, y luego sean traducidas como proteína recombinante. La purificación de la misma se realiza por afinidad con la resina Ni-NTA; ésta es una matriz de níquel-ácido nitrilotriacético acoplada a Sepharosa CL6B, que se utiliza para biomoléculas que hayan sido fusionadas a una etiqueta de seis residuos consecutivos de Histidina.

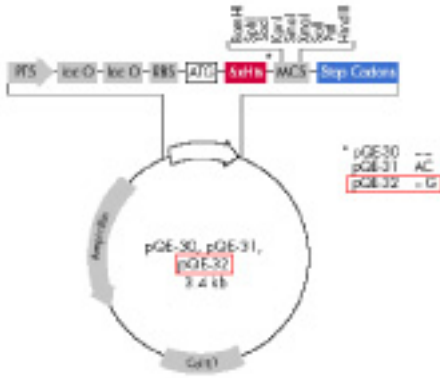


Figura 11: Mapa de los vectores pQE. Se indica con rojo lo correspondiente al pQE32.

Análisis bioinformáticos sugieren que la kinasa no es soluble, sino que se halla anclada a la membrana celular de *Listeria monocytogenes*. Los estudios mecanísticos y estructurales que requieran su alta producción y purificación deben enfocarse, por lo tanto, en su subunidad catalítica. Ésta, al carecer del dominio transmembrana, puede ser purificada como proteína recombinante soluble.

Como se describe en Materiales y Métodos, se procedió a identificar la subunidad catalítica de Lmo1820 por homología con dicho dominio en PrkC de *Bacillus subtilis*. Luego se seleccionó el vector pQE32 para que el fragmento inicial 5' de lmo1820c quedara en fase y tuviese el 6x(His) N-terminal. Asimismo, se eliminaron el sitio de unión a ribosomas y el ATG del inserto para evitar obtener productos sin 6x(His). El fragmento se clonó en el vector y la construcción fue electroporada en *E. coli* XL1-Blue de modo de contener el plásmido denominado MJ1.

Aunque la cepa XL1-Blue es ideal para contener y propagar los vectores pQE por poseer la mutación *lacI^q* y también como huésped de expresión de proteínas no tóxicas, pretendimos asegurarnos un mayor control de la expresión de la proteína. Para ello, se transformó el plásmido MJ1 en la cepa de expresión de *E. coli* M15[pREP4]. Ésta contiene al vector pREP4 (Invitrogen), un plásmido de alto número de copias que contiene al gen *lacI* y permite regular y reprimir con altísima eficiencia la alta tasa de transcripción del promotor T5 del plásmido pQE.

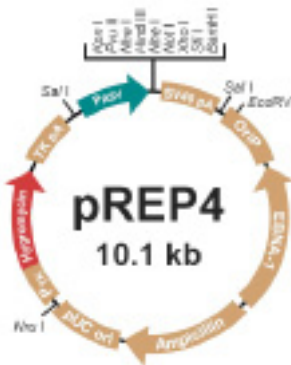


Figura 12: Mapa del plásmido pREP4.

Expresión de Lmo1820c.

Luego de iniciar el cultivo de las células XL1-Blue que contenían al plásmido MJ1 y realizar la inducción y preparación de las muestras como se describió en Materiales y Métodos, los pellets de interés fueron sometidos a una SDS-PAGE.

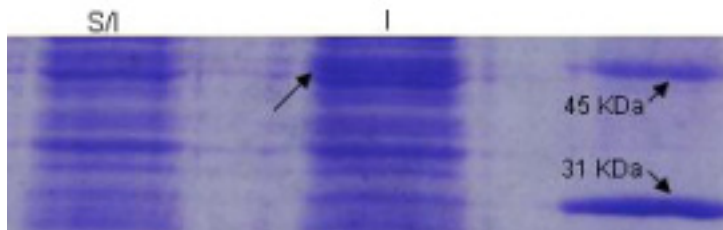


Figura 13: SDS-PAGE de la expresión de Lmo1820c en XL1-Blue. Calle 1: cultivo sin inducción, Calle 3: cultivo inducido, Calle 5: marcador de Pm.

Se pudo observar la aparición de una banda nueva cercana a los 45 KDa, indicada con una flecha en la figura. Si bien el peso predicho por la estructura primaria del dominio y los aminoácidos agregados al fragmento sería de 40,1 KDa, está claro que esta banda representa la proteína de interés. Esto puede concluirse ya que además de la diferencia de expresión en cultivos inducidos y sin inducir, al compararse la expresión en esta cepa contra una que sólo posee al vector pQE32 se obtiene diferencialmente esta banda.

También se ensayó la inducción de la expresión de Lmo1820c a partir de la cepa de expresión M15[pREP4] y el SDS-PAGE arrojó un resultado similar al anterior, donde se observa la aparición de una banda nueva entre otras dos, cercana a los 45 KDa.

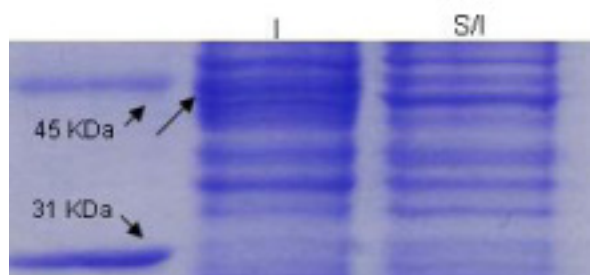


Figura 14: SDS-PAGE de la expresión de Lmo1820c en cepa M15[pREP4]. Calle 1: marcador de Pm, Calle 2: cultivo inducido, Calle 3: cultivo sin inducción.

Posteriormente, se realizó una comparación en paralelo de la expresión de Lmo1820c entre la cepa madre y la de expresión, con el objetivo de verificar si existe expresión diferencial de la proteína en alguna de ellas, o si en la primera se observan indicios de toxicidad.

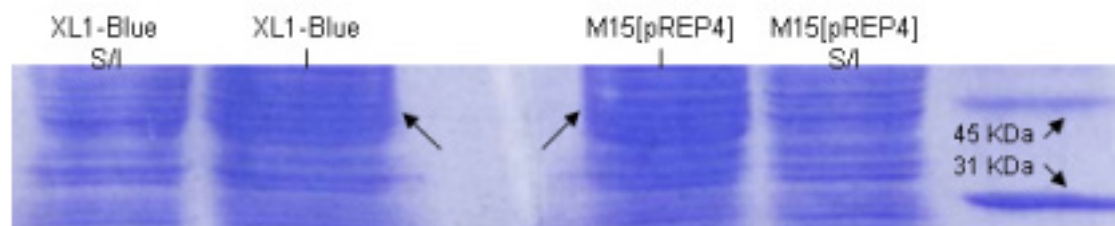


Figura 15: SDS-PAGE mostrando los perfiles de expresión de Lmo1820c en XL1-Blue y M15[pREP4]. Calle 1: cultivo de XL1-Blue sin inducción, Calle 2: cultivo de XL1-Blue inducido, Calle 4: cultivo de M15[pREP4] inducido, Calle 5: cultivo de M15[pREP4] sin inducción, Calle 6: marcador de Pm.

Como puede observarse, la banda correspondiente a Lmo1820c está presente en ambos extractos y no difiere mucho en intensidad entre cepa y cepa. Además, el crecimiento de los cultivos fue semejante. Esto lleva a pensar que la proteína no es tóxica ni requiere condiciones especiales para su expresión.

Purificación de Lmo1820c.

Al observarse que la proteína puede en efecto ser expresada, se continuó con el objetivo inicial del trabajo, que era ensayar su purificación por cromatografía de afinidad.

Como un primer acercamiento a la purificación de esta proteína, se procedió a su purificación en lote, un método rápido y sencillo y bajo condiciones desnaturizantes, ya que se desconocía la solubilidad de la proteína. En este procedimiento, se mezclan la resina de Ni-NTA y por centrifugaciones y lavados sucesivos en condiciones cada vez más rigurosas, se obtiene la proteína pura.

Luego de la purificación, las fracciones se sometieron a SDS-PAGE, que reveló dos bandas no muy intensas alrededor de 45 KDa que eluyen con buffer D, (pH=5,9), el esperado para la elución de monómeros.

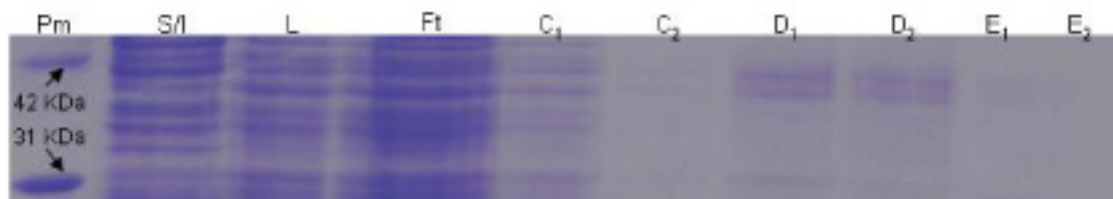


Figura 16: SDS-PAGE de la purificación de Lmo1820c en lote bajo condiciones desnaturalizantes. Calle 1: marcador de Pm, Calle 2: cultivo de M15[pREP4] sin inducción, Calle 3: lisado, Calle 4: flow-through, Calle 5: primer lavado, Calle 6: segundo lavado, Calle 7: primer elución con buffer D, Calle 8: segunda elución con buffer D, Calle 9: primer elución con buffer E, Calle 10: segunda elución con buffer E.

Esto demuestra que es posible purificar la subunidad catalítica de la kinasa como monómero, aunque en baja cantidad, posiblemente debido al bajo nivel de inducción observado.

Con el objetivo de poner a punto un protocolo definitivo para la purificación de Lmo1820c y cuantificar la cantidad obtenida por ese método, se procedió a purificar la proteína en columna armada con resina Ni-NTA; el experimento se realizó bajo condiciones nativas para así obtener la proteína en su conformación original; además, se realizó una inducción más fuerte. En este procedimiento se pasa la muestra por la columna y luego de permitir su unión a la resina, se realizan lavados y eluciones sucesivas con concentraciones crecientes de imidazol en la solución, de modo de aumentar el rigor de las condiciones.

Las fracciones eluidas fueron sometidas a SDS-PAGE y se pudo observar muy buena cantidad de proteína, con alto grado de pureza.

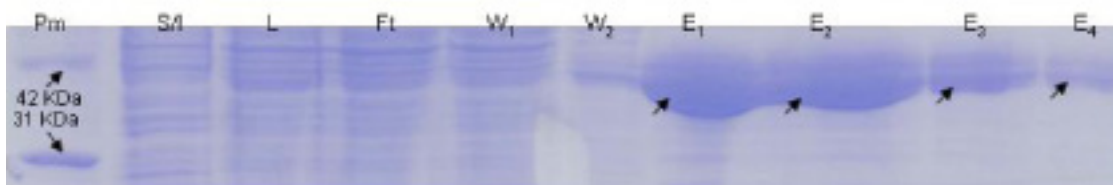


Figura 17: SDS-PAGE de la purificación de Lmo1820c en columna bajo condiciones nativas. Calle 1: marcador de Pm, Calle 2: cultivo de M15[pREP4] sin inducción, Calle 3: lisado, Calle 4: flow-through, Calle 5: primer lavado, Calle 6: segundo lavado, Calles 7-10: fracciones de elución.

Estos resultados prueban que este método es útil para la purificación de Lmo1820c. Considerando que en purificaciones bajo condiciones nativas es mayor el porcentaje de proteínas con residuos de Histidina que se unen inespecíficamente a la resina, sería conveniente aumentar las concentraciones de imidazol en los buffers de lavado (≈ 30 mM) y de elución (>250 mM) para así obtener la proteína de interés con mayor pureza.

En caso de que los contaminantes se encontrasen asociados a Lmo1820c, debería considerarse la opción de agregar β -mercaptoetanol para reducir los puentes disulfuro que pudieran haberse formado o adicionar etanol o glicerol al buffer de lavado para romper las interacciones inespecíficas.

4.5. Cuantificación de Lmo1820c purificada.

Para determinar la concentración de proteína Lmo1820c purificada bajo condiciones nativas se utilizó el método de Bradford.

Luego de realizar la curva de calibración para el método, se procedió a comparar el valor de absorbancia obtenido en la muestra de interés, 0,165, con la misma.

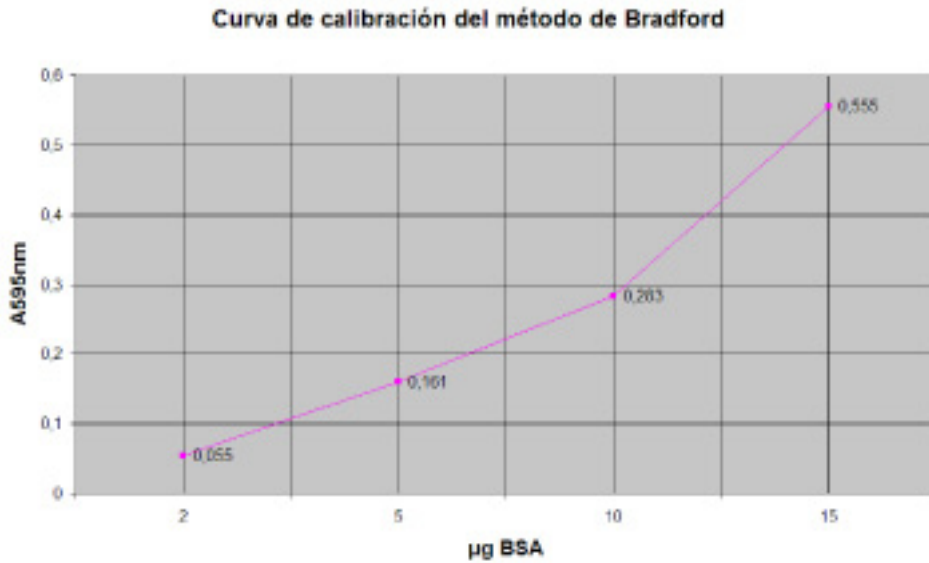
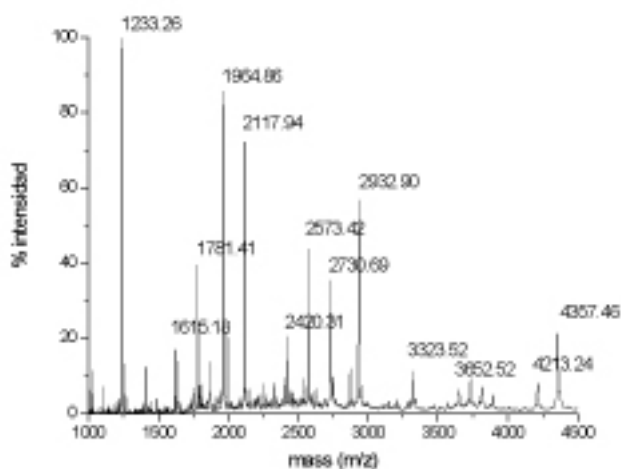


Figura 18: Curva de calibración del método de Bradford.

También se realizó una regresión lineal y según ambos, se puede concluir que se purifican aproximadamente 0,5 mg de proteína cada ml de muestra eluida. En otras palabras, este método de purificación arroja un rendimiento de 5 mg de proteína pura por cada litro de cultivo bacteriano. Para obtener mayor cantidad de proteína sería conveniente aumentar la concentración de IPTG y el tiempo de incubación durante la inducción, así como también reducir la unión inespecífica de proteínas a la matriz que puedan competir con la de interés. También sería conveniente agregar a las muestras un inhibidor de proteasas, tal como PMSF antes de la purificación.

4.6. MALDI-TOF de Lmo1820c.

Se utilizó espectrometría de masa para comprobar la identidad de la proteína purificada e identificar fosforesiduos en la misma. Este procedimiento fue llevado a cabo por la Lic. Analía Lima en el IIBCE de Montevideo, Uruguay. Brevemente, se corrió en un gel de poliacrilamida un extracto total de la cepa de expresión inducida y sin inducir. La banda diferencial de la calle inducida se cortó y luego de destañir el gel, se la digirió con tripsina "in-gel". Luego se extrajeron los péptidos del gel de acrilamida y se utilizaron para obtener el espectro de de masa. También se defosforilaron los péptidos con fosfatasa alcalina para comparar los espectros obtenidos.



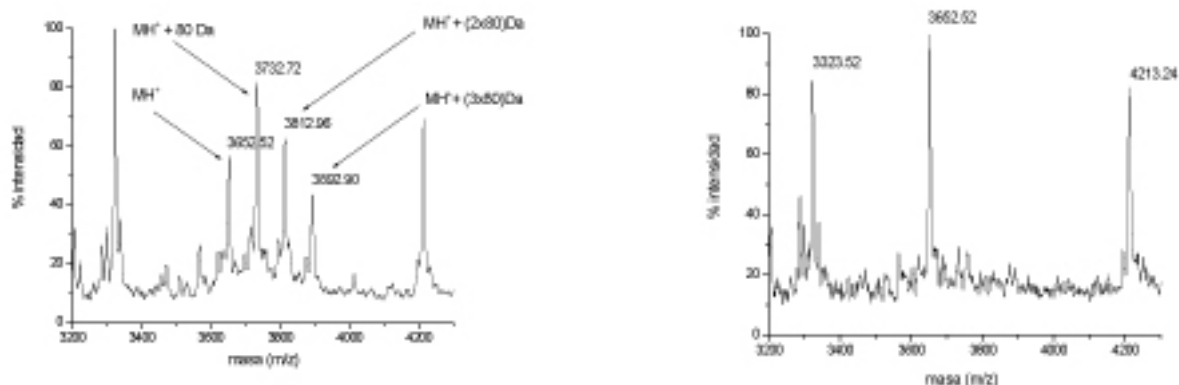


Figura 19: MALDI-TOF de Lmo1820c. A) Espectro de masa Lmo1820c. B) Ampliación del espectro de masa de Lmo1820c, donde se puede observar el pico correspondiente al polipéptido 150-183 de Lmo1820c ($m/z = 3652$) que se encuentra tri-fosforilado. Los corrimientos de masa de 80 Da corresponden a la incorporación de un fosfato al péptido. C) Espectro de masa del polipéptido 150-183 de Lmo1820c luego de la defosforilación. (secuencia del péptido 150-183: ITDFGIAMALSETSITQTNSLLGSVHYLSPEQAR)

La cobertura de secuencia de aminoácidos que se obtuvo en el análisis de los fragmentos trípticos por MS fue del 18%. El programa de búsqueda y comparación de secuencias utilizado fue MASCOT (Matrix Science).

Este experimento sirvió para confirmar que la banda que se observaba en la cepa inducida y que posteriormente fue purificada, era en efecto Lmo1820c. Su secuencia con tres residuos fosforilados presenta homología con aquella que en PknB de *Mycobacterium tuberculosis* se encuentra sistemáticamente fosforilada, y corresponde al *loop* de activación.

La fosforilación en esta zona es el método más común para regular la actividad de una kinasa. La adquisición de grupos fosfatos por uno o más residuos en el *loop*, le permite al mismo cambiar su conformación para así afirmarse a sus puntos de anclaje y quedar posicionado para la unión al sustrato. Para este proceso resulta crítica la interacción electrostática entre un fosforesiduo particular en el *loop* y el bolsillo básico conservado entre kinasas reguladas por fosforilación en el *loop* de activación. Como se mencionó anteriormente, Lmo1820 posee estos residuos, por lo tanto podría inferirse que es regulada por el mecanismo en cuestión.

Resta averiguar entonces cuál o cuáles son los sustratos fisiológicos de la kinasa, puesto que esto daría importantes indicios sobre el rol de la misma. Sería interesante comenzar por determinar si Ef-Tu es efectivamente uno de ellos. Considerando que la fosfatasa asociada a Lmo1820 actúa sobre él y que ambas constituyen un par funcional, lo más seguro es que la STPK de interés fosforile a este factor de elongación. Esto resultaría en un proceso de gran importancia para la regulación de la síntesis proteica de *Listeria monocytogenes*.

5. Conclusiones

Listeria monocytogenes es un patógeno alimentario particularmente resistente, de complejos mecanismos regulatorios y de virulencia. Está claro que este microorganismo ha desarrollado una amplia gama de estrategias para interactuar con las células huésped y manipular su comportamiento para lograr sobrevivir y propagarse.

El proceso de fosforilación de proteínas es universal en todos los organismos y constituye un mecanismo dominante para la regulación de funciones celulares de vital importancia para los mismos. Estudios genéticos han revelado un rol fundamental de algunas STPKs en la patogénesis bacteriana; debido a su organización estructural, puede postularse que actúan como sistemas de un componente en vías de transducción de señales de gran relevancia.

Hoy en día existe una preocupación creciente por la rápida emergencia de resistencia a agentes antimicrobianos y se procura constantemente desarrollar nuevos compuestos que actúen sobre bacterias causantes de enfermedades. Considerando la importancia de las STPKs y su rol en la virulencia o su esencialidad para el desarrollo del patógeno, éstas resultan claves para el diseño de agentes que las inhiban y así eviten la infección de huéspedes susceptibles.

En el genoma de *Listeria monocytogenes* existen genes que codifican para 3 STPKs putativas; uno de ellos, *lmo1820*, codifica para una proteína transmembrana de 655 aminoácidos que presenta homología

con las encontradas en *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium tuberculosis*. La fosfatasa asociada a Lmo1820 está involucrada en la regulación de la síntesis proteica del patógeno y podría tener un rol en la supervivencia del mismo dentro del huésped.

Acorde con el interés existente en caracterizar dicha STPK, en este trabajo se comenzó por intentar obtener una mutante nula para *lmo1820*. Pese a los diversos intentos y variaciones en las condiciones de los experimentos, no fue posible obtener la construcción necesaria para mutar el gen *lmo1820*. La estrategia delimitada al comienzo de este trabajo incluye el clonado de un fragmento que contiene 63 de los 1968 pb de dicho gen y alrededor de 700 pb del gen *lmo1821*. Si bien no fue posible determinar el motivo de una manera unívoca, resulta claro que el fragmento no puede ser clonado en el vector de interés. La opción más razonable consiste en que dicho fragmento sea tóxico para las *E. coli* que se utilizan para mantener y propagar el plásmido. Por consiguiente, para avanzar en la mutación de la kinasa, se debería buscar otro fragmento corriente arriba de *lmo1820*; aunque las opciones restantes no sean muchas, podría intentarse obtener un fragmento más distal, que involucrase aún más pares de bases de *lmo1821* o probar otras cepas para contener la construcción.

Si bien resulta importante determinar la esencialidad de la kinasa, es de mayor relevancia su caracterización *in vitro*. En este trabajo fue posible establecer una estrategia para la producción y purificación de la subunidad catalítica de Lmo1820 en forma nativa. Ésta incluye una inducción con IPTG 1 mM, seguida por una incubación mayor a 8 hs; para su purificación se requiere la presencia de imidazol en los buffers de lisis (≈ 10 mM), lavado (≈ 30 mM) y de elución (>250 mM).

Nuestra determinación por homología de la subunidad catalítica de Lmo1820 difiere de la precedida por la base de datos KinG. Mientras nosotros consideramos los primeros 338 aminoácidos como tal, en la base de datos se acota a los aminoácidos 11 a 268. Sin embargo, para purificar y caracterizar la proteína es incluso más conveniente contar con la mayor parte posible de ella, mientras sea soluble. En el caso de que se deseara cristalizar el dominio catalítico, entonces sí sería más apropiado realizar la purificación estrictamente de los aminoácidos que pertenezcan al mismo.

De todos modos, en este trabajo pudimos comprobar que los primeros 338 aminoácidos de Lmo1820 incluyen a su subunidad catalítica, que se encuentra tri-fosforilada en su *loop* de activación. Esto indica que la kinasa puede ser regulada por el mecanismo de fosforilación en esa zona. Además, se dejó sentada la estrategia para que en un futuro se puedan realizar estudios más a fondo de la Ser/Thr kinasa Lmo1820 de *Listeria monocytogenes*.

6. Referencias bibliográficas

- Archambaud C., Gouin E., Pizarro-Cerda J., Cossart P., and Dussurget O. 2005. Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* 56(2), 383-396.
- Arnaud M., Chastanet A., and Debarbouille M. 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70(11), 6887-6891.
- Av-Gay Y., Jamil S., and Drews S.J. 1999. Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* Serine/Threonine protein kinase PknB. *Infection and Immunity* 67(11), 5676-5682.
- Boitel B., Ortiz-Lombardia M., Duran R., Pompeo F., Cole S.T., Cervenansky C., and Alzari P.M. 2003. PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* 49(6), 1493-1508.
- Bollag D.M., Rozycki M.D., and Edelstein S.J. 1996. *Protein methods*. Wiley-Liss, 2nd ed.
- Charpentier E., and Courvalin P. 1999. Minireview: Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(9), 2103-2108.
- Cossart P., and Porthoy D.A. 2000. The cell biology of invasion and intracellular growth by *Listeria monocytogenes*. En *Gram positive pathogens*, Fischetti V.A. et al (eds.), American Society for microbiology, Washington DC.
- Drews S.J., Hung F., and Av-Gay Y. 2001. A protein kinase inhibitor as an antimycobacterial agent. *FEMS Microbiology Letters* 205(2), 369-374.
- Dussurget O., Pizarro-Cerda J., and Cossart P. 2004. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Review of Microbiology* 58, 587-610.
- ExpASy Proteomics Server: <http://www.expasy.ch/>
- Finelli A., and Pamer E.G. 2000. Immune and inflammatory responses to *Listeria monocytogenes*

- infection. En Gram positive pathogens, Fischetti V.A. et al (eds.), American Society for microbiology, Washington DC.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org>
 - Freitag, N.E. 2000. Genetic tools for use with *Listeria monocytogenes*. En Gram positive pathogens, Fischetti V.A. et al (eds.), American Society for microbiology, Washington DC.
 - Gaidenko T.A., Kim T.J., and Price C.W. 2002. The PrpC Serine-Threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase *Bacillus subtilis* cells. *Journal of Bacteriology* 184(22), 6109-6114.
 - Gasanov U., Hughes D., and Hansbro P.M. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 851-875.
 - Hanks S.K., and Hunter T. 1995. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal* 9, 576-596.
 - Iwanicki A., Hinc K., Seror S., Wegrzyn G., and Obuchowski M. 2005. Transcription in the prpC-yloQ region in *Bacillus subtilis*. *Archives of Microbiology* 183(6), 421-430.
 - Kang C.M., Abbott D.W., Park S.T., Dascher C.C., Cantley L.C., and Husson R.N. 2005. The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes and Development* 19(14), 1692-1704.
 - KinG Database: <http://hodgkin.mbu.iisc.ernet.in/~king/>
 - Krupa A., and Srinivasan N. 2005. Diversity in domain architectures of Ser/Thr kinases and their homologues in prokaryotes. *BMC Genomics* 6, 129.
 - *Listeria* y *Listeriosis*: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/listeria.htm
 - Madec E., Laszkiewicz A., Iwanicki A., Obuchowski M., and Séror S. 2002. Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Molecular Microbiology* 46(2), 571-586.
 - Madec E., Stensballe A., Kjellstrom S., Cladière L., Obuchowski M., Jensen O., and Séror S. 2005. Mass spectrometry and site-directed mutagenesis identify several autophosphorylated residues required for the activity of PrkC, a Ser/Thr kinase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* 330, 459-472.
 - MicrobeWiki: <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria>
 - Nightingale K.K., Windham K., and Wiedmann M. 2005. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *Journal of Bacteriology* 187(16), 5537-5551.
 - Obuchowski M., Madec E., Delattre D., Boe G., and Iwanicki A. 2000. Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a member of the PPM phosphatase family. *Journal of Bacteriology* 182(19), 5634-5638.
 - Park S.F., and Stewart G.S. 1990. High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. *Gene* 94(1), 129-132.
 - Phan-Thanh L., and Gormon T. 1997. A chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria*. *International Journal of Food Microbiology* 35(1), 91-95.
 - Pizarro-Cerdá J., and Cossart P. 2006. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Pathology* 208(2), 215-223
 - Premaratne R.J., Lin W.J., Johnson E.A. 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3046-3048.
 - Sambrook J., Fritsch E., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.
 - Schäferkordt et al. 1998. Molecular approaches for the study of *Listeria*. *Methods in Microbiology* 27, 421-431.
 - Sclech III, W.F. 2000. Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. En Gram positive pathogens, Fischetti V.A. et al (eds.), American Society for microbiology, Washington DC.
 - TextBook of Bacteriology: <http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>
 - Tsai H.N., and Hodgson D.A. 2003. Development of a synthetic minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 69(11), 6943-6945.
 - Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., and Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14(3), 584-640.
 - Walsh D., Duffy G., Sheridan J.J., Blair I.S., and McDowell D.A. 2001. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *Journal of Applied Microbiology* 90, 517-522
 - Wiedmann M., Bruce J.L., Keating C., Johnson A.E., McDonough P.L., and Batt C.A. 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with diffe-

- rences in pathogenic potential. *Infection and Immunity* 65(7), 2707-2716.
- Wouters J.A., Hain T., Darji A., Hufner E., Wemekamp-Kamphuis H., Chakraborty T., and Abee T. 2005. Identification and Characterization of Di- and Tripeptide Transporter DtpT of *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied and Environmental Microbiology* 71(10), 5771-5778.

