

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**Caracterización de la región promotora del gen *omp25* de *Brucella abortus*.**

**Modalidad: Tesis**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico  
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

**Amanda Castillo Zeledón**

**Campus Presbítero Benjamín Núñez**

**2010**

**Caracterización de la región promotora del gen *omp25* de *Brucella abortus*.**

**Dr. Jorge Quirós Arce**  
**Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud**

**Dra. Laura Castro Ramírez**  
**Directora Escuela de Medicina Veterinaria**

**Dra. Caterina Guzmán Verri**  
**Tutora**

**Dr. Edgardo Moreno Robles**  
**Lector**

**Dra. Marietta Flores Díaz**  
**Lectora**

**2010**

## **DEDICATORIA**

A mi madre Rosa María Zeledón, mi modelo a seguir, y a mis hermanas Natalia y Adriana porque sin ellas no sería lo que hoy soy. A Reimer por ser mi TODO, por siempre acompañarme y llenar mi vida de amor.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Caterina por haberme dado la oportunidad de participar en uno de sus proyectos y abrirme las puertas a toda una nueva área de trabajo. Por hacerme sentir parte del grupo y tenerme la paciencia durante todo este tiempo de trabajo. Por siempre estar disponible a mis dudas y por haberme brindado la confianza que necesitaba para sentir que yo era capaz. Al Dr. Edgardo Moreno por guiar mi trabajo por el camino correcto. Al Dr. Esteban Chaves por las ideas que me brindó para mejorar este trabajo. A la Dra. Marietta Flores por su disponibilidad y voluntad de participar como lectora del proyecto. A Rey por mostrarme el trabajo de laboratorio, por aclarar mis dudas cuando las tenía, por animarme y alentarme a seguir cuando pensaba que todo estaba perdido, por hacerme los mil favores que le pedí durante todo el tiempo que estuve trabajando y por ser un amigo incondicional dentro y fuera del laboratorio. A las chiquillas: Pamela Altamirano, Carola Martínez, Lohendy Muñoz y Gabriela Hernández, por siempre estar dispuestas a darme una mano cuando la necesitaba y enseñarme todo su conocimiento, por compartir tantas horas de laboratorio en trabajo, risas, llantos y vivencias inolvidables. Por hacerme agradables los momentos difíciles y porque me hicieron disfrutar como nunca, una etapa de mi vida que sin amigas como ellas no hubiera logrado sobrellevar. A Don Fernando por siempre preocuparse de que todo el material estuviese listo en el momento que lo necesitaba para realizar mis experimentos y a Mayra y Doña Dafne y por su cálida atención.

Este proyecto fue financiado con fondos de la International Foundation for Science, Netropica y FES CONARE a nombre de la Dra. Caterina Guzmán Verri dentro del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, Costa Rica.

## RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica, producida por bacterias del género *Brucella*. Muchos de los mecanismos que utiliza esta bacteria para invadir y replicarse en las células no se comprenden. Sin embargo, las propiedades de la membrana externa y el sistema de regulación de expresión de genes BvrR/BvrS están ligados a su virulencia. La Omp25 es una de las proteínas de membrana externa más estudiadas. Aunque su función es desconocida, su expresión es regulada por el sistema de regulación BvrR/BvrS que es importante para la virulencia. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de la región promotora del gen *omp25*, como prototipo de secuencias promotoras que constituirían un regulón de virulencia bajo el control de BvrR/BvrS. Para ello, se realizaron fusiones transcripcionales de la región corriente arriba del gen *omp25* con el gen reportero *lacZ* carente de promotor. Una primera fusión contenía 392 pb (pares de bases) corriente arriba de *omp25*, asimismo, se clonaron dos fragmentos más cortos que contenían 262 pb y 151 pb de la misma región. La expresión de las fusiones transcripcionales en la cepa silvestre *Brucella abortus* 2308 fue evaluada durante las distintas fases del crecimiento bacteriano. Estos ensayos demostraron la presencia de actividad promotora en dos de los constructos y una notoria disminución de más del 90% en la expresión del gen con el constructo que contenía 151 pb, delimitando la región que posee las secuencias para la activación del promotor. Por lo tanto, existe una actividad promotora basal en las 151 bp corriente arriba de *omp25*, que es positivamente regulada por secuencias que se encuentran luego de las 152 bp corriente arriba de *omp25*. Esta caracterización sirve como modelo para realizar estudios comparativos con regiones reguladoras de otros genes importantes para *Brucella*, crear herramientas que permitan controlar la expresión de éstos y por lo tanto, combatir a este patógeno.

## ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease caused by intracellular facultative coccobacilli bacteria belonging to the *Brucella* genus. The mechanisms used to invade and replicate within cells are not well understood. However, its virulence is linked to its outer membrane properties as well as to secretion and gene regulation systems. Omp25 is an outer membrane protein with an unknown function whose gene expression is under the control of the BvrR/BvrS two component regulatory system, relevant for virulence. The aim of this work was to characterize the *omp25* promoter region as a prototype of promoter sequences that might constitute a virulence regulon under the BvrR/BvrS control. To accomplish this, transcriptional fusions of the *omp25* upstream region to the *lacZ* promoterless reporter gene were created. The first fusion had 392 bp upstream *omp25*. Likewise, two more fragments were cloned containing 262 bp and 151 bp of the same region. The expression of the transcriptional fusions in the wild type *Brucella abortus* 2308 strain was evaluated during its growth phase. These assays proved the presence of a growth phase dependent promoter activity in two of the constructions and a more than 90% reduction in gene expression of the construct containing the 151 bp fragment, outlining the region that has promoter activity. Therefore, a basal promoter activity is located within 151 bp upstream of *omp25*. This activity is positively regulated by further upstream sequences. This characterization could be used as a model for comparative studies with other regulatory regions in other important *Brucella* genes, and in this way create better tools to control their expression and therefore this pathogen.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>INDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>vi</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	<b>viii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Antecedentes .....	<b>1</b>
1.2. Justificación .....	<b>9</b>
1.3. Objetivos .....	<b>11</b>
1.3.1. <i>Objetivo General</i> .....	<b>11</b>
1.3.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	<b>11</b>
<b>2. METODOLOGÍA</b> .....	<b>12</b>
2.1. Materiales y Métodos .....	<b>12</b>
2.1.1. <i>Cepas bacterianas y plásmidos empleados</i> .....	<b>12</b>
2.1.2. <i>Amplificación del ADN mediante PCR</i> .....	<b>13</b>
2.1.3. <i>Electroforesis en geles de agarosa</i> .....	<b>15</b>
2.1.4. <i>Construcción de las fusiones transcripcionales</i> .....	<b>16</b>
2.1.5. <i>Curvas de crecimiento de los clones Bp3aZ5, Bp3aZ3, Bp3aZ2, BpMR15 y 3aZ</i> .....	<b>20</b>
2.1.6. <i>Ensayo <math>\beta</math>-galactosidasa</i> .....	<b>21</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>

3.1. Estandarización de la técnica de PCR .....	23
3.2. Construcción de las fusiones transcripcionales .....	24
3.2. Electroporación en <i>B. abortus</i> 2308 .....	30
3.3. Curvas de crecimiento de los clones Bp3aZ5, Bp3aZ3, Bp3aZ2, BpMR15 y 3aZ.....	30
3.4. Ensayo $\beta$ –galactosidasa.....	33
<b>4. DISCUSION.....</b>	<b>41</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>51</b>



**INDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro 1.</b> Cepas bacterianas empleadas en este trabajo .....	<b>12</b>
<b>Cuadro 2.</b> Vector de clonación y plásmidos empleados en este trabajo .....	<b>13</b>
<b>Cuadro 3.</b> Lista de cebadores utilizados en el estudio y condiciones varias .....	<b>15</b>
<b>Cuadro 4.</b> Cantidades y condiciones del protocolo estandarizado y utilizado para PCR.....	<b>23</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la caracterización del sitio promotor del gen <i>omp25</i> en <i>B. abortus</i> 2308. .....	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b> Diagrama de la fusión transcripcional lograda del gen <i>lacZ</i> con las regiones 5` del gen <i>omp25</i> . .....	<b>18</b>
<b>Figura 3.</b> Electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos obtenidos mediante PCR .....	<b>23</b>
<b>Figura 4.</b> Electroforesis en gel de agarosa del vector pMR15 obtenido.....	<b>24</b>
<b>Figura 5.</b> PCR de cinco clones resultantes de la transformación con los cebadores <i>placomp3a.3</i> y <i>placomp3a.5</i> .....	<b>25</b>
<b>Figura 6.</b> Electroforesis de los fragmentos purificados por medio de extracción en gel.....	<b>25</b>
<b>Figura 7.</b> Estandarización de la reacción de digestión con las enzimas de restricción <i>BamHI</i> y <i>XbaI</i> . .....	<b>26</b>
<b>Figura 8.</b> Comprobación por medio de PCR de la presencia del fragmento de interés en lisados de clones de <i>E. coli</i> . .....	<b>27</b>
<b>Figura 9.</b> Comprobación de los fragmentos obtenidos de los clones #7, #4 y #2 con la enzima de restricción <i>Afl II</i> . .....	<b>28</b>
<b>Figura 10.</b> Comprobación de las construcciones <i>p3aLZ5</i> , <i>p3aLZ3</i> y <i>p3aLZ2</i> mediante digestión con la enzima de restricción <i>Afl II</i> de los clones #7, #4 y #2 obtenidos de la electroporación en <i>E. coli</i> XL1Blue.....	<b>29</b>
<b>Figura 11.</b> Comprobación de la fusión del fragmento con el gen <i>lacZ</i> de los plásmidos de los clones #7 ( <i>Ep3aZ5</i> ), #4 ( <i>Ep3aZ3</i> ) y #2 ( <i>Ep3aZ2</i> ).....	<b>29</b>

<b>Figura 12.</b> Comprobación de las construcciones p3aLZ5, p3aLZ3 y p3aLZ2 en los clones #3 (Bp3aZ5), #4 (Bp3aZ3) y #6 (Bp3aZ2) por medio de PCR con los cebadores bindomp3alacZF y bindomp3alacZR.....	<b>30</b>
<b>Figura 13a.</b> Comparación del crecimiento bacteriano de 3aZ, Bp3aZ5, Bp3aZ3, Bp3aZ2 y BpMR15 en un periodo de 32 horas. ....	<b>31</b>
<b>Figura 13b.</b> Determinación de las fases de crecimiento bacteriano para Bp3aZ5, Bp3aZ3, Bp3aZ2, 3aZ y BpMR15.....	<b>32</b>
<b>Figura 14.</b> Determinación del espectro de absorción para el orto-nitrofenol.....	<b>34</b>
<b>Figura 15.</b> Actividad residual de $\beta$ -galactosidasa a través de la curva de crecimiento del clon BpMR15.....	<b>35</b>
<b>Figura 16.</b> Actividad del promotor del gen <i>omp25</i> silvestre a través de la curva de crecimiento del mutante 3aZ.....	<b>36</b>
<b>Figura 17.</b> Actividad de un fragmento del promotor del gen <i>omp25</i> a través de la curva de crecimiento del clon Bp3aZ5. ....	<b>37</b>
<b>Figura 18.</b> Actividad de un fragmento del promotor del gen <i>omp25</i> a través de la curva de crecimiento del clon Bp3aZ3. ....	<b>38</b>
<b>Figura 19.</b> Actividad de un fragmento del promotor del gen <i>omp25</i> a través de la curva de crecimiento del clon Bp3aZ2. ....	<b>39</b>
<b>Figura 20.</b> Comparación de la actividad promotora de tres fragmentos del promotor del gen <i>omp25</i> en los clones, Bp3aZ5, Bp3aZ3 y Bp3aZ2 con la actividad del promotor silvestre en el clon 3aZ y la actividad residual del clon BpMR15. ....	<b>40</b>
<b>Figura 21.</b> Representación esquemática de la secuencia corriente arriba del gen <i>omp25</i> y de regiones de interés.....	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ATS:** Agar tripticasa soya

**CTS:** Caldo tripticasa soya

**dNTPs:** Deoxinucleótidos trifosfato

**Km:** Kanamicina

**LB:** medio de Luria Bertani

**MPM:** Marcador de peso molecular

**pb:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**OMP:** Proteína de Membrana Externa

**Omp25:** Proteína de membrana externa de 25kDa

**ONPG:** O-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranososa

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias

**kDa:** Kilodaltons

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**Gm<sup>r</sup>:** resistencia a gentamicina

**Amp<sup>r</sup>:** resistencia a ampicilina

**Km<sup>r</sup>:** resistencia a kanamicina

**Nal<sup>r</sup>:** resistencia a ácido nalidíxico

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

La brucelosis es una enfermedad zoonótica, producida por bacterias del género *Brucella*, de amplia distribución a nivel mundial y causante de pérdidas económicas importantes debido a que afecta a los animales de producción. Estas bacterias colonizan principalmente el sistema reproductor en sus hospederos (Moreno y Moriyón, 2006; Moreno, 2002; Salhi et al., 2003).

Las especies de *Brucella* son cocobacilos intracelulares facultativos, aeróbicos, Gram-negativos (Carter y Wise, 2004). A la fecha, diez especies han sido reconocidas, con base principalmente en la especificidad de la bacteria por su hospedero: *Brucella melitensis* cuyos hospederos son las cabras y las ovejas, es la especie que causa las infecciones más severas en humanos. *Brucella abortus* afecta vacas y también puede infectar humanos. *Brucella suis* infecta principalmente cerdos y humanos. *Brucella canis* infecta perros y puede producir enfermedad zoonótica en los humanos. *Brucella ovis* es la especie responsable de las infecciones en carneros y *Brucella neotomae* infecta roedores (Carter y Wise, 2004; Moreno, 2002). Las restantes 4 especies se han descrito en las últimas dos décadas y son: *Brucella pinnipedialis*, causante de infecciones en pinípedos y *Brucella ceti* responsable de infectar cetáceos (Bricker et al., 2000; Foster et al., 2007; Dawson et al., 2008). Otra especie descrita es *Brucella microti*, aislada de ratones de la especie *Microtus arvalis* en República Checa (Scholz et al., 2008). El aislamiento de miembros del género *Brucella* en animales de vida silvestre demuestra la existencia de reservorios antes desconocidos para la brucelosis, que representan un riesgo sanitario para la población humana y animal. Prueba de ello es que se

han reportado casos de humanos infectados con cepas de *Brucella marinas* (Bricker et al., 2000; Godfroid et al., 2005; McDonald et al., 2006). *B. inopinata* ha sido descrita recientemente de un aislamiento de implantes de seno, pero su patogenicidad todavía se desconoce (Scholz et al., 2010).

La transmisión de animal a animal se da primariamente por ingestión de material contaminado después de un aborto o parto de una hembra infectada debido a la gran cantidad de bacterias eliminadas a través del feto, las membranas fetales y las secreciones uterinas (Songer y Post, 2005). La transmisión a los humanos se da tanto por contacto directo con animales infectados o bien por medio del consumo de productos contaminados de origen animal (Moreno y Moriyón, 2006).

Cuando estas bacterias ingresan al organismo pueden ser fagocitadas por los polimorfonucleares, células dendríticas y macrófagos como parte de la inmunidad innata. Sin embargo, una vez dentro de macrófagos y células dendríticas, las brucelas son capaces de sobrevivir y multiplicarse ya que manipulan el tráfico intracelular de manera que previene la fusión a endosomas tardíos y a lisosomas. El fagocito migra por vía linfática a los ganglios regionales correspondientes pasando luego al torrente sanguíneo, con la cual se desarrolla una bacteremia y la diseminación del patógeno en todo el hospedero (Edmonds et al., 2001). En hembras grávidas *Brucella* se localiza en la placenta, donde puede alcanzar concentraciones de aproximadamente  $10^{10}$  bacterias por centímetro cuadrado (Alexander et al., 1981). Consecuentemente, se producen abortos, retención de placenta e infertilidad. Estos a su vez ocasionan bajas en la eficiencia reproductiva, reflejadas en días abiertos e intervalos entre

partos de larga duración. Además, cuando *Brucella* se localiza en la ubre de los animales produce una disminución significativa de la producción láctea. En machos puede llegar a producir epididimitis, orquitis o atrofia testicular (CFSPH, 2007).

La brucelosis en humanos se conoce como fiebre ondulante o fiebre de Malta, ya que a diferencia de lo que ocurre en los animales, ésta no afecta preferiblemente el sistema reproductor sino que también es capaz de infectar otros órganos, causando una sintomatología diversa dependiendo del órgano blanco (Davis, 2004; Memish y Balkhy, 2004). La Organización Mundial de la Salud clasifica a la brucelosis humana como la zoonosis más extendida a nivel mundial, que además de causar un gran sufrimiento humano, posee un enorme impacto en la industria animal (OPS, 2009).

*Brucella*, al igual que el resto de los miembros de las bacterias Gram-negativas, posee una envoltura celular que está constituida por una membrana citoplasmática y una membrana externa, separadas entre sí por el espacio periplásmico. Aunque morfológicamente puede ser similar a otras bacterias Gram-negativas, esta envoltura celular presenta características propias que le generan a las brucelas una ventaja selectiva para su sobrevivencia en ambientes hostiles (Moriyón y López-Goñi, 1998). Aunque muchos de los mecanismos que tiene *Brucella* para invadir y replicarse en las células no se comprenden aún, estas características particulares de su membrana parecen ser importantes para su virulencia, conjuntamente con sistemas de secreción de moléculas y de regulación de expresión génica (Gorvel y Moreno, 2002; Caro-Hernández et al., 2007).

Las proteínas de membrana externa (OMPs) de *Brucella* fueron caracterizadas por primera vez en los 80s (Dubray y Charriaut, 1983; Verstrete et al., 1982). Se clasificaron según su aparente peso molecular en tres grandes grupos denominados: grupo 1 (94-88 kDa (kilodaltons)), consideradas componentes menores de la membrana externa, grupo 2 (36-38 kDa), identificadas como porinas funcionales, y grupo 3 (25-27 kDa y 31-34 kDa), que son las proteínas mayoritarias de la membrana externa de *B. abortus*. Este último grupo está constituido de al menos 8 proteínas cuyas secuencias a nivel de ADN, tanto codificantes como no codificantes son altamente conservadas. Dos proteínas muy reconocidas de este último grupo son: Omp25 (proteína de membrana externa de 25 kDa, también conocida como Omp3a) y Omp31, que se encuentra en todas las especies de *Brucella* excepto en *B. abortus* (Cloeckaert et al., 2002).

La Omp25 es la más estudiada del grupo 3. Es codificada por el gen *omp25*, el cual es altamente conservado en el genoma de *Brucella*. Únicamente dos marcadores especie específicos se determinaron mediante un análisis de PCR-RFLP con nueve enzimas de restricción para este gen: una deleción de 36 nucleótidos cerca del extremo 3' del gen *omp25* de *B. ovis* y la ausencia del sitio de restricción EcoRV en *B. melitensis* (Cloeckaert et al., 1995). Al secuenciar y comparar el gen en *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae* se encontraron apenas 12 sustituciones individuales de nucleótidos (Cloeckaert et al., 1996), lo que demuestra su alta conservación.

A pesar del esfuerzo de muchos investigadores, la función específica de la proteína Omp25 sigue siendo desconocida. La única función que se le ha asignado es la inhibición del



Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en macrófagos humanos, asunto que no deja de ser controversial, ya que este efecto no se ve en macrófagos murinos. En 1996 se documentó que al infectar macrófagos humanos con la cepa silvestre *B. suis* no había producción de TNF- $\alpha$  y que este efecto inhibitorio resultaba de la activación de un factor proteico (Caron et al., 1996). Jubier-Maurin *et al.* (2001) exponen a Omp25 como la proteína responsable de este efecto. Sus conclusiones se basan en que al medir la producción de TNF- $\alpha$  de macrófagos humanos infectados con la cepa silvestre *B. suis* y mutantes carentes del *omp25* y *omp31*, se observó que la secreción de TNF- $\alpha$  era normal en las infecciones con la mutante en *omp25* y que la inhibición se recobraba cuando se utilizaba esa mutante complementada con el gen *omp25* intacto. Igualmente, se analizó la expresión de Omp25 en sobrenadantes de las infecciones con las diferentes cepas y se demostró que la inhibición de TNF- $\alpha$  concordaba con la presencia de Omp25 en el medio. Ningún efecto se atribuyó al gen *omp31*. Esto refleja la posibilidad de que Omp25 se encuentre involucrada en la inhibición del factor TNF- $\alpha$  de macrófagos humanos. No obstante, se ha visto que no ocurre este mismo efecto en macrófagos de ratón utilizando mutantes similares de las cepas *B. abortus* y *B. suis* (Caron et al., 1996; Manterola et al., 2007), por lo que permanece no resuelto y requiere ser reevaluado dentro de un contexto más estricto de acción directa con la proteína purificada.

Por otro lado Omp25 ha sido calificada como un factor de virulencia para *Brucella* y cepas mutantes que carecen de su gen como posibles vacunas atenuadas (Edmonds et al., 2001; Edmonds et al., 2002). Edmonds *et al.* (2001) con base en un análisis *in vitro* exponen que mutantes *B. abortus* 2308 carentes de *omp25* tienen una menor capacidad de adaptarse al ambiente intracelular de macrófagos y trofoblastos bovinos. Sin embargo, más adelante se

comprobó en diferentes células que estas mutantes son mucho más eficientes en el proceso de internalización a las células, por lo que esto provoca una tasa de destrucción inicial más alta que la obtenida con la cepa parenteral. Posteriormente, las mutantes alcanzan la misma tasa absoluta que la cepa silvestre indicando que es el mismo número de bacterias que se replican y consecuentemente se adaptan al nicho intracelular (Guzman-Verri et al., 2002).

Edmonds *et al.* (2002) declararon a las mutantes de *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. abortus* que carecen de *omp25* como atenuadas en el modelo de ratón. Sin embargo, Caro-Hernández *et al.* (2007) y Manterola *et al.* (2007) realizaron estudios similares con resultados distintos, ya que mutantes semejantes en *B. abortus* y *B. ovis* fueron virulentas en el mismo modelo de ratón pues no se encontraron diferencias significativas con los resultados de las cepas parentales. La mutante *omp25* de *B. melitensis* ha sido utilizada como vacuna en ratones y provocó el mismo nivel de protección contra la cepa *B. melitensis* 16 M que produce la cepa vacunal atenuada *B. mellitensis* Rev.1. Incluso en cabras la vacunación antes de la reproducción resultó en un 100% de protección contra el aborto al desafiar con la cepa silvestre 16 M durante la gestación tardía. Asimismo, la vacunación de ratones con la mutante *B. ovis* resultó en la eliminación de la cepa parental de *B. ovis* recibida como desafío y proporcionó una protección mayor que la conferida por la vacuna Rev. 1 (Edmonds et al., 2001; Edmonds et al., 2002). Sin embargo, estos estudios requieren de mayor investigación para poder afirmar con seguridad su efectividad como nuevas vacunas.

Salhi *et al.* (2003) caracterizaron nuevos productos genómicos homólogos a Omp25 con la siguiente nomenclatura: Omp25b, Omp25c y Omp25d. Al ser comparadas sus secuencias de

aminoácidos se halló aproximadamente un 40% de identidad. También sugirieron la posibilidad de que la producción de OMPs pueda estar influenciada por diferentes condiciones nutricionales o que la ausencia de alguna puede modificar la producción de otra. Por lo tanto, el mecanismo que usa *Brucella* para ingresar a la célula y causar enfermedad es el conjunto de muchos factores y no se basa exclusivamente en la ausencia o presencia de la Omp25 (Salhi et al., 2003; Manterola, 2004).

Otro dato importante sobre esta proteína es que está bajo el control transcripcional del sistema de dos componentes BvrR/BvrS en *B. abortus*. Los sistemas de dos componentes son sistemas muy comunes en las bacterias que permiten la rápida adaptación de las mismas a los cambios que se generen en el ambiente inmediato. La respuesta a estas modificaciones involucra generalmente la activación o la represión de la transcripción de genes. El sistema BvrR/BvrS está constituido de una proteína sensora BvrS localizada a nivel de la membrana plasmática, la cual, al recibir un estímulo externo particular se autofosforila. Esta proteína, con función de histidina kinasa, fosforila a su vez a un factor de transcripción emparejado que es la proteína reguladora BvrR, el cual contribuirá en la activación o represión de genes necesarios para responder al estímulo externo original. En el genoma de *Brucella* se han descrito al menos ocho de estos sistemas, sin embargo, solo el sistema BvrR/BvrS ha sido implicado en la virulencia de la bacteria (Sola-Landa et al., 1998). Interesantemente, se observó que mutantes *bvrR* y *bvrS* perdían la habilidad de expresar Omp25. La actividad promotora de *omp25* en estas mutantes se encuentra disminuida con respecto a la cepa parental y en análisis de electroforesis en dos dimensiones de los fragmentos de la membrana de estas mutantes, la proteína se encontraba disminuida o ausente (Manterola et al., 2002).

Como ha sido demostrado para otros sistemas de dos componentes en bacterias, es muy posible que este sistema esté involucrado en la regulación de una mayor cantidad de genes que podrían eventualmente estar relacionados con la virulencia (Guzman Verri et al 2002, Manterola et al., 2002; Viadas et al., 2010) y por lo tanto constituir un conjunto de genes que se activan de forma coordinada para inducir la patogenicidad de *Brucella*. En otras palabras, el sistema BvrR/BvrS podría tener un papel orquestador o regulador de la respuesta que monta la bacteria una vez que entra al hospedero, constituyéndose entonces en un regulón de la virulencia.

En este trabajo para lograr la caracterización de la región promotora de *omp25* se emplea una estrategia convencional que involucra al gen reportero *lacZ*, el cual carece de su promotor pero posee intacta la información restante necesaria para codificar la enzima  $\beta$ -galactosidasa (Castillo, 2005). *Brucella* no posee el operon *lac*. Éste se encuentra en el operon *lac* de *Escherichia coli*. El compuesto sintético orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG) también es reconocido como un sustrato para la  $\beta$ -galactosidasa. El ONPG es un compuesto incoloro, sin embargo en presencia de  $\beta$ -galactosidasa se hidroliza la molécula en galactosa y orto-nitrofenol, este último tiene un color amarillo con capacidad de absorber luz a 420nm. La producción de orto-nitrofenol es proporcional a la concentración de  $\beta$ -galactosidasa, de esta manera la producción de color puede usarse para determinar la concentración de la enzima (Miller, 1972). Y a su vez, la técnica puede ser utilizada para monitorear la actividad promotora de genes de interés bajo diferentes condiciones, ya que se observará actividad  $\beta$ -galactosidasa en respuesta a aquellos factores que provoquen la expresión del gen que se está

estudiando, y consecuentemente del gen *lacZ*, y no se detectará actividad en las condiciones en las que dicho gen esté reprimido (Castillo, 2005).

## **1.2. Justificación**

Los sitios promotores son secuencias específicas en el ADN donde la ARN polimerasa se une para iniciar la transcripción. De esta secuencia de nucleótidos depende la transcripción de cada gen, ya que está cuidadosamente regulada para formar los productos de genes solo en el momento y las proporciones necesarias. Aunque esta regulación puede ocurrir en cualquier paso de la transcripción, mucha de la regulación está dirigida a la unión de la polimerasa al sitio promotor y la iniciación de la transcripción (Nelson y Cox, 2000). Los sitios promotores de *Brucella* han sido poco caracterizados. La caracterización de la región promotora de *omp25* abrirá la puerta al conocimiento de la regulación de otros genes dentro de *Brucella*, ya que constituye el prototipo de secuencias promotoras que constituirían un regulón de virulencia bajo el control de BvrR/BvrS. Como se detalló anteriormente, en el caso de las Omps se han hallado similitudes importantes entre ellas (Cloekaert et al., 1996), lo que permite establecer comparaciones e identificar en otras lo que se encuentra en una, por lo tanto los datos obtenidos servirán de modelo para realizar estudios comparativos con el resto de las regiones reguladoras de otras Omps. Además, el hecho de que pueda haber una conexión en sus expresiones (Salhi et al., 2003) hace que exista la posibilidad de regular cierta Omp por medio de otra Omp.

El conocimiento y posterior alteración de regiones reguladoras de la expresión génica puede traer beneficios como vacunas superiores a las actuales, ya que no existe una vacuna

contra la brucelosis en humanos, ni tampoco una vacuna completamente efectiva para todos los animales que afecta (Ko y Splitter, 2003). Asimismo, puede contribuir a la generación de mejores antibióticos para combatir la brucelosis.

### 1.3. Objetivos

#### 1.3.1. Objetivo General

- ♦ Caracterizar la región promotora del gen *omp25* de *B. abortus*.

#### 1.3.2. Objetivos Específicos

- ♦ Estandarizar un método de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar distintas regiones corriente arriba del gen *omp25* de *B. abortus*.
- ♦ Crear fusiones transcripcionales del gen *lacZ* (que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa) con los distintos amplicones de *omp25* obtenidos.
- ♦ Introducir las fusiones transcripcionales en *B. abortus* 2308.
- ♦ Establecer cuál es la mínima información genética necesaria para la existencia de una región promotora corriente arriba del gen *omp25* por medio de un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Materiales y Métodos

#### 2.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos empleados

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en el presente trabajo se describen en el Cuadros 1 y 2 respectivamente.

**Cuadro 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo**

CEPA	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
<i>E. coli</i>		
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' proAB lacIqZΔM15]. TN10(Tet<sup>r</sup>)</i>	Sambrook et al., 1989
Ep3aZ5	XL1Blue portadora del plásmido p3aLZ5	Este estudio
Ep3aL3	XL1Blue portadora del plásmido p3aLZ3	Este estudio
Ep3aL2	XL1Blue portadora del plásmido p3aLZ2	Este estudio
<i>B. abortus</i>		
2308	Cepa silvestre, virulenta, <b>Nal<sup>r</sup></b>	Sangari y Agüero, 1991
3aZ	2308 portadora de la fusión transcripcional <i>Pomp3a::lacZ</i> , <b>Gm<sup>r</sup></b> , <b>Amp<sup>r</sup></b>	Manterola, 2004
B p3aZ5	2308 portadora del plásmido p3aLZ5	Este estudio
Bp3aL3	2308 portadora del plásmido p3aLZ3	Este estudio
Bp3aL2	2308 portadora del plásmido p3aLZ2	Este estudio

**Nal<sup>r</sup>**= resistencia a ácido nalidíxico, **Gm<sup>r</sup>**= resistencia a gentamicina, **Amp<sup>r</sup>**=resistencia a ampicilina.



**Cuadro 2. Vector de clonación y plásmidos empleados en este trabajo**

PLÁSMIDOS	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
		pertenecen al gen y 151pb corriente arriba del gen) <b>Km<sup>r</sup></b>
pMR15	Alto número de copias, <i>lacZ</i> sin región promotora, <b>Km<sup>r</sup></b> (11.500 kb)	
p3aLZ5	pMR15 portador de un fragmento de 0.519 kb del gen <i>omp25</i> (127 pb pertenecen al gen y 392 pb corriente arriba del gen) <b>Km<sup>r</sup></b>	Cortesía Dr. Marty Roop (Gober y Shapiro, 1992) Este estudio
p3aLZ3	pMR15 portador de un fragmento de 0.389 kb del gen <i>omp25</i> (127 pb pertenecen al gen y 262 pb corriente arriba del gen) <b>Km<sup>r</sup></b>	Este estudio
p3aLZ2	pMR15 portador de un fragmento de 0.279 kb del gen <i>omp25</i> (127 pb	Este estudio

**Km<sup>r</sup>**= resistencia a Kanamicina

### 2.1.2. Amplificación del ADN mediante PCR

Para la obtención de los amplicones de *omp25* se utilizaron muestras de ADN genómico de la bacteria *B. abortus* cepa 2308. El ADN genómico fue extraído utilizando el DNeasy Blood and Tissue kit de Qiagen. En el Cuadro 3 se describen los pares de cebadores diseñados para amplificar mediante PCR tres regiones cada vez más cortas de la región corriente arriba del gen *omp25*.

El PCR se llevó a cabo en un termociclador 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems®. Para la estandarización, se tomó como punto de inicio un protocolo de PCR básico que incluye: un ciclo de 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la

temperatura necesaria para la pareja de cebadores a utilizar (Cuadro 3), 30 segundos a 68°C y un ciclo final de 10 minutos a 68°C. La mezcla para las reacciones de PCR se preparó a un volumen final de 25 µl y está constituida por 12.5 µl de Master Mix 2x de Fermentas®, que incluye la Taq polimerasa, los dNTP's (deoxinucleótidos trifosfatos) y el amortiguador necesarios para la amplificación, a esto se le agregan 0.3µM de concentración final de los cebadores correspondientes, ADN y agua ultrapura estéril para alcanzar un volumen de reacción de 25µl. Cada vez que se realizó un PCR se montó una reacción control negativo que consistía en los mismos componentes de las muestras, pero en lugar de ADN se utilizaba agua ultrapura estéril para detectar alguna posible contaminación.

Con el fin de ajustar cada PCR se variaron del protocolo básico anteriormente descrito la concentración de los cebadores en un rango de 0.3µM – 1.2µM, la concentración del ADN de 0.5µl - 4µl y las temperaturas de hibridación de 48°C - 70°C para cada par de cebadores.

**Cuadro 3. Lista de cebadores utilizados en el estudio y condiciones varias**

CEBADOR	SECUENCIA	TEMPERATURA ANILLAMIENTO (°C)	TAMAÑO ESPERADO AMPLICÓN (pares de bases)
placomp3a3	GGGATCATT <u>CAGGATCC</u> CACACGGTAAACG	60	519
placomp3a5	ACTGGGGAGCGGATCCTACTTCAACC		
placomp3a3XbaI	GGGATCATT <u>CATCTAGAC</u> CACACGGTAAACG	60	519
placomp3a5	ACTGGGGAGCGGATCCTACTTCAACC		
placomp3a-245.F	CAGCTTCGCT <u>TCTAGAG</u> CATTGCT	55	389
placomp3a5	ACTGGGGAGCGGATCCTACTTCAACC		
placomp3a-121.F	TCTCGACAGATT <u>TCTAGAT</u> ATCTCCACACA	55	278
placomp3a5	ACTGGGGAGCGGATCCTACTTCAACC		
bindomp3alacZR	CCCAGTCACGACGTTGTA	51	100
bindomp3alacZF	ATCCAGGAACAGCCTCCG		

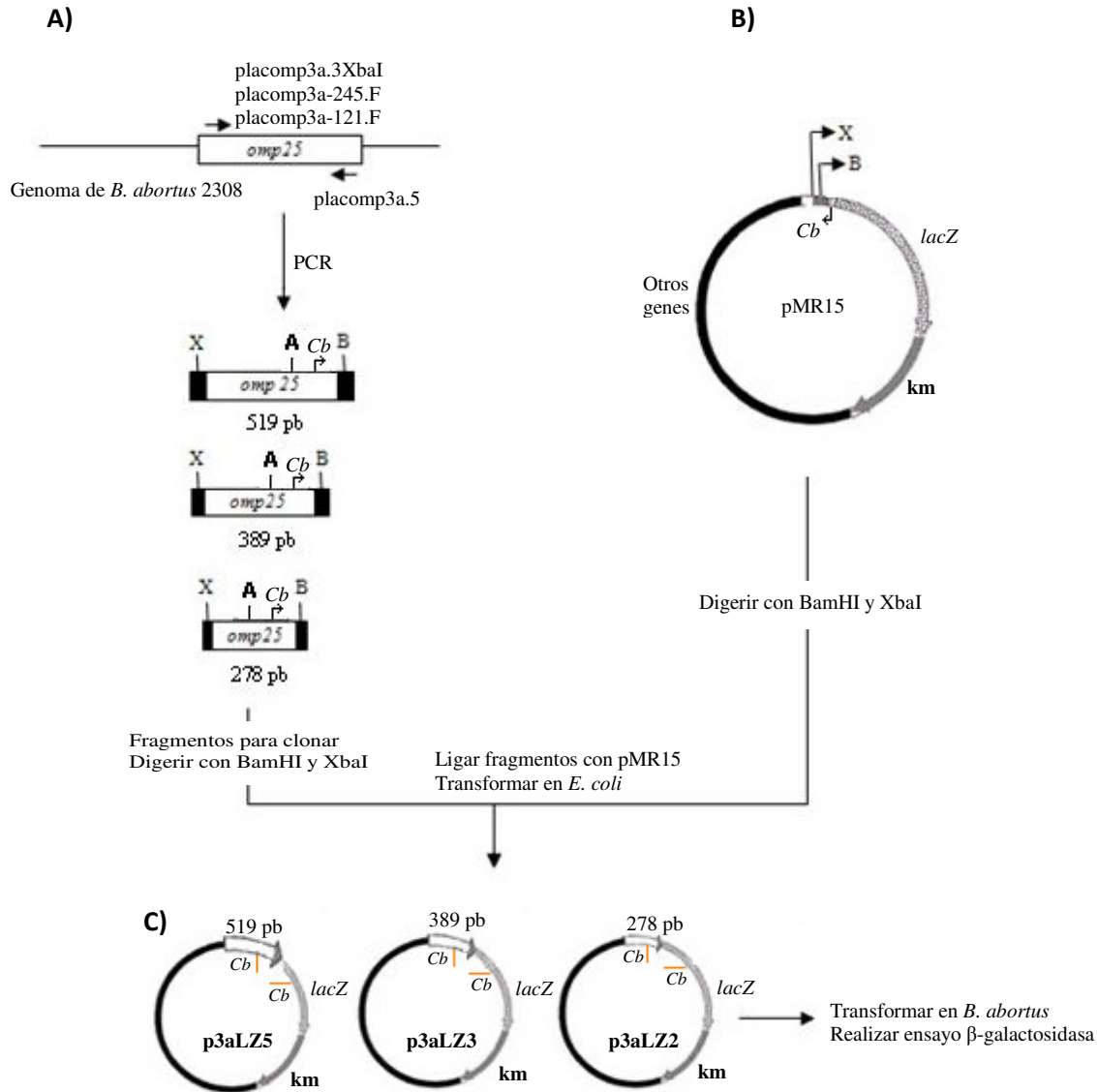
Las bases subrayadas corresponden a las dianas de las enzimas de restricción: TCTAGA para BamHI y GGATCC para XbaI.

### 2.1.3. Electroforesis en geles de agarosa

Las reacciones de PCR que se procesaron y los plásmidos extraídos en el transcurso de este estudio fueron evaluados en geles de agarosa al porcentaje necesario según protocolo previamente descrito (Maniatis et al., 1982). El 10% del volumen de cada muestra fue analizado en la electroforesis. Junto a las muestras se aplicó un MPM (Marcador de peso molecular). La lectura de la electroforesis se llevó a cabo bajo luz ultravioleta por medio del captador y analizador de imágenes Chemidoc 170-8070 de Bio Rad®.

### 2.1.4. Construcción de las fusiones transcripcionales

El esquema de las construcciones realizadas se muestra en la Figura 1.



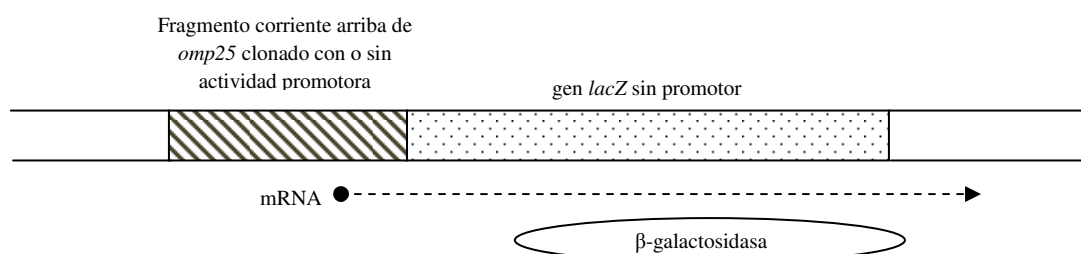
**Figura 1.** Esquema de la caracterización del sitio promotor del gen *omp25* en *B. abortus* 2308. A) Cebadores: placomp3aXbaI, placomp3a-245F, placomp3a-121F y placomp3a.5 amplifican por PCR una región corriente arriba del gen *omp25* de 519pb, 389pb y 278pb. Sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción X: XbaI, B: BamHI y A: Afl II, utilizadas para la clonación y comprobación de las fusiones transcripcionales. B) Mapa del vector pMR15: *lacZ*: gen β-galactosidasa, *km*: gen resistencia a Kanamicina, los sitios de corte para BamHI y XbaI se localizan justo delante del gen *lacZ*. C) Fusiones transcripcionales: p3aLZ5, p3aLZ3 y p3aLZ2. Cb: sitio de unión del cebador bindomp3alacZF en los fragmentos y cebador bindomp3alacZR en el plásmido pMR15, las fusiones transcripcionales con estos cebadores generan un fragmento entre las 100 y las 200 pb.

Originalmente la primera construcción se realizó con cebadores placomp3a.3 y placomp3a.5 que poseían sitios de corte para BamHI. Luego placomp3a.3 fue sustituido por placomp3a.3XbaI que posee sitio de corte para XbaI (Cuadro 3).

Una vez obtenidos los amplicones a clonar se extrajeron con QIAquick® Gel Extraction Kit de Qiagen, luego fueron pasados por el proceso de digestión con las enzimas de restricción BamHI 10U/ml y XbaI 10U/ml (Fermentas®), al igual que el vector pMR15 previamente purificado con el kit QIAquick® Plasmid Extraction de Qiagen. La cantidad de enzima a utilizar para una digestión eficiente se estandarizó con cuatro diferentes concentraciones de enzima con una misma concentración de vector. Se utilizaron las siguientes unidades de enzima XbaI: 0.01, 0.02, 0.03 y 0.04. Para BamHI se requirió únicamente 1 µl. Los fragmentos fueron digeridos con la misma cantidad que el vector. Las digestiones se realizaron por separado con incubaciones de 18 horas a 37°C. Primero se utilizó la enzima BamHI y 18 horas después se agregó la enzima XbaI, incubando 18 horas más. Se inactivaron las enzimas a 80°C durante 20 min.

Cuando se utilizaron los cebadores que poseían ambos sitio para BamHI, el vector era desfosforilado después de la digestión, con fosfatasa alcalina 5U/µl (Fermentas®). Por lo tanto, se procedió a estandarizar la defosforilación utilizando distintas unidades de fosfatasa alcalina (1,2 y 3 Unidades) para una misma concentración de pMR15 digerido (0.3µg). La sustitución del cebador placomp3a.3 por placomp3a.3XbaI eliminó este procedimiento.

Posterior a la digestión, el vector digerido se sometió con cada fragmento a una reacción de ligación con la enzima T4 DNA Ligasa 5U/ $\mu$ l (Fermentas<sup>®</sup>) que requiere de una incubación a temperatura ambiente de 16 a 18 horas. De esta reacción se obtienen las fusiones transcripcionales que se ejemplifican en el diagrama de la Figura 2. A continuación, las reacciones de ligación se pasaron por una extracción con cloroformo y un proceso de diálisis. Seguidamente el nuevo plásmido creado se electroporó en células competentes de *E. coli* cepa XL1Blue tomando una muestra directamente de la reacción de ligación y utilizando el Electro Cell Manipulator ECM 630 BTX<sup>®</sup>, siguiendo el protocolo de electroporación indicado por el fabricante. La reacción fue cultivada en placas de LB (Luria Bertani) con 30  $\mu$ g/ml de Km. Cada UFC (Unidad Formadora de Colonia) que se obtuvo fue subcultivada en nuevas placas con las mismas condiciones.



**Figura 2.** Diagrama de la fusión transcripcional lograda del gen *lacZ* con las regiones 5' del gen *omp25* (Dale y Park, 2004). Si el fragmento tuviera actividad promotora éste impulsaría la transcripción del gen *lacZ* y se codificaría la  $\beta$ -galactosidasa. Si no posee una actividad promotora la enzima no es codificada.

Se comprobó la presencia del constructo en los clones resistentes a Km por medio de cuatro procedimientos:

1. Las bacterias Km resistentes fueron lisadas. A estos lisados se les realizó un PCR con los correspondientes cebadores de cada fragmento insertado. Se escogieron con este PCR

únicamente los clones que amplificaron una banda con el peso del fragmento de interés, a los cuales se les extrajo el plásmido y se repitió el PCR que se efectuó en los lisados. Se montaron dos controles negativos en este procedimiento: un lisado de *E. coli* y el plásmido pMR15. Se escoge en este paso un solo clon para cada una de las tres fusiones transcripcionales llamadas Ep3aZ5, Ep3aZ3 y Ep3aZ2, con las cuales se continuaron los siguientes procedimientos.

2. Se purificaron los amplicones obtenidos del paso anterior, y se les realizó digestión con la enzima Afl II. Estos amplicones tienen un único sitio de corte para esta enzima, generando dos fragmentos de distinto tamaño según la región clonada (Figura 1).

3. Los plásmidos extraídos de los clones escogidos se procedieron a digerir de igual forma que los fragmentos con la enzima Afl II.

4. Por último, para corroborar la correcta orientación de las fusiones transcripcionales obtenidas, los plásmidos extraídos se sometieron a un PCR con los cebadores bindomp3alacZF y bindomp3alacZR (Cuadro 3). Estos cebadores amplifican una región del fragmento del gen *omp25* clonado y una región del gen *lacZ* (Figura 1).

Para cada fusión transcripcional, se escogió un clon positivo a los cuatro procedimientos anteriores y se introdujo por medio de electroporación en células de *Brucella* 2308 electrocompetentes utilizando el Electro Cell Manipulator ECM 630 BTX®, siguiendo el protocolo de electroporación indicado por el fabricante. Los clones con p3aLZ5, p3aLZ3 y p3aLZ2 introducidos fueron seleccionados por su resistencia a Km. Para revisar si la fusión

transcripcional aún permanecía en el plásmido se utilizó nuevamente la técnica de PCR con los cebadores bindomp3alacZR y bindomp3alacZF a los lisados bacterianos.

Al igual que los plásmidos, el vector pMR15 también se electroporó en células de *B. abortus* 2308 electrocompetentes para utilizarlo como control en los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa.

#### 2.1.5. Curvas de crecimiento de los clones Bp3aZ5, Bp3aZ3, Bp3aZ2, BpMR15 y 3aZ

Para los diferentes clones de *B. abortus* se realizaron curvas de crecimiento bacteriano. Los precultivos se realizaron a partir de los clones rayados en placas de ATS (agar tripticasa soya) con 30  $\mu$ g/ml de Km y 20 ml de CTS (caldo tripticasa soya), incubándose durante 24 horas en agitación a 37°C. Se determinaron las UFC/ml (Unidades formadoras de colonias) del precultivo para cultivar  $7 \times 10^9$  UFC/ml en 20 ml de CTS utilizando la fórmula  $\text{UFC} = \text{Abs}(420\text{nm}) - 0.0046/2 \times 10^{-10}$  (Alton et al., 1975). Los cultivos se incubaron durante 32 horas en agitación a 37°C. La curva de crecimiento se obtuvo midiendo la concentración de los cultivos a 420 nm iniciando la primera lectura a las 6 horas y continuando con la lectura cada hora en un periodo de 32 horas. Las curvas de crecimiento se repitieron al menos 6 veces por cada clon. Luego se determinó para cada curva las tres fases de crecimiento: fase de latencia, fase exponencial (fase exponencial inicial, media y tardía) y fase estacionaria. Siempre se realizó conjuntamente a los precultivos y cultivos un control de esterilidad en placas de ATS sin antibiótico y con 30  $\mu$ g/ml de Km.



### 2.1.6. Ensayo $\beta$ -galactosidasa

Las bacterias de interés se sometieron al ensayo de  $\beta$ -galactosidasa utilizando el sustrato ONPG, siguiendo el protocolo descrito por Manterola (2004). En vez de utilizar 100 $\mu$ l de muestra se utilizaron 10 $\mu$ l.

Brevemente, las bacterias se cultivaron hasta la fase exponencial donde se da la máxima expresión de  $\beta$ -galactosidasa asociada al promotor de *omp25* (Guzmán Verri et al., 2002). Del cultivo bacteriológico se tomaron tres alícuotas de 1 ml cada una. Estas alícuotas se centrifugaron por 10 minutos a 13000 rpm. Seguidamente se permeabilizaron las bacterias con SDS (Dodecil sulfato sódico) al 0.5% y cloroformo al 6% y se incubaron por 10 minutos a 28 °C. Diez microlitros de células se diluyeron en 790 $\mu$ l de la solución tamponada PM2SH incubándose durante 2 minutos a 28°C, luego se añadieron 200 $\mu$ l del reactivo ONPG dejando incubarse durante 10 minutos a 28°C. La reacción se detuvo con carbonato sódico 1M. Luego se midió la absorbancia a 420nm. Las unidades Miller de  $\beta$ -galactosidasa se calcularon según la siguiente fórmula  $U = 1000 \times DO_{420}/t \times V \times DO_{420}$ . Siendo t el tiempo de incubación en minutos y V el volumen de células en ml (Manterola, 2004).

La producción de  $\beta$ -galactosidasa que se obtuvo de BpMR15, utilizado como control, se restó a los datos obtenidos por el resto de los plásmidos para obtener así la producción de  $\beta$ -galactosidasa neta que procedía únicamente de la actividad promotora de los fragmentos.

Todos los ensayos fueron medidos a 420 nm y 550 nm. La longitud de onda a 550 nm es utilizada como control, ya que el color amarillo del orto-nitrofenol no absorbe luz a 550 nm,

únicamente los detritos celulares interfieren. Por lo tanto las muestras fueron centrifugadas para eliminar la dispersión celular. Los valores esperados a 550 nm al centrifugar las muestras deberían ser valores iguales o cercanos al blanco.

Se utilizó la Prueba de T de Student para corroborar si las diferencias obtenidas entre los constructos eran significativos o no.

### 3. RESULTADOS

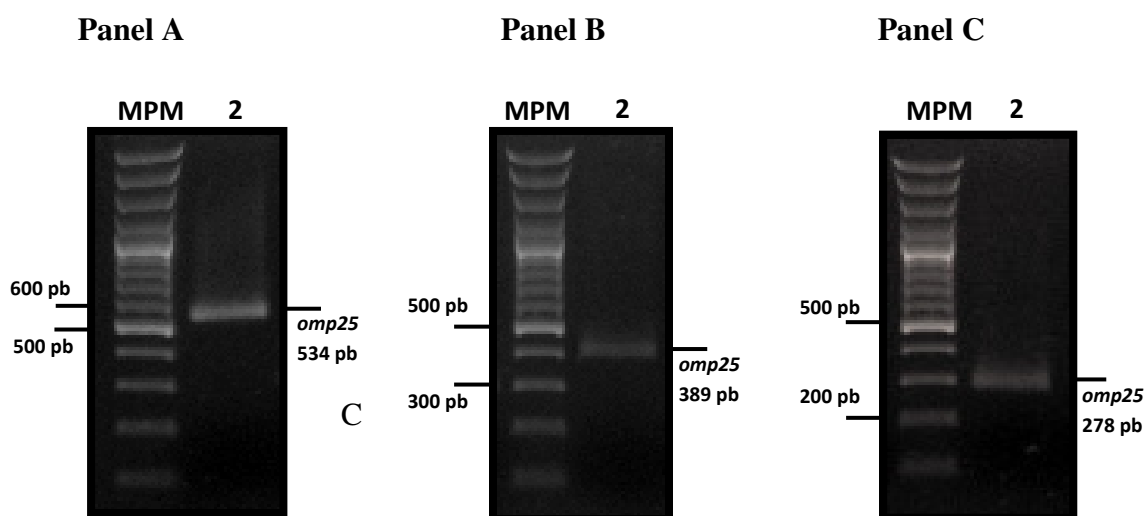
#### 3.1. Estandarización de la técnica de PCR

Con el objetivo de obtener una única banda de los tamaños esperados se llegó a un protocolo que logró la correcta amplificación de los cuatro productos de PCR, este protocolo es expuesto en el Cuadro 4. La Figura 3 muestra las bandas resultantes obtenidas después de la estandarización, las cuales fueron intensas y las esperadas.

**Cuadro 4. Cantidades y condiciones del protocolo estandarizado y utilizado para PCR**

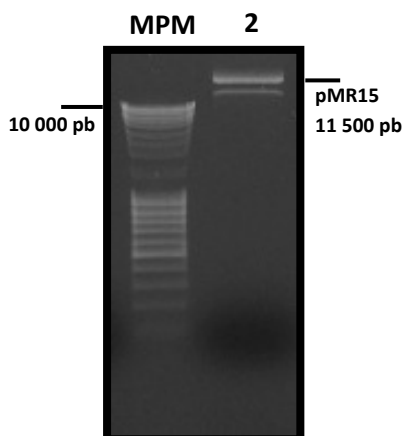
MASTER MIX	CEBADOR	ADN	AGUA	Th
125µl	0.5µl	2µl	9.5µl	50

Th: temperatura de hibridación en C°. La concentración final de los cebadores es de 0.6 µM.



**Figura 3.** Electroforesis en gels de agarosa de los fragmentos obtenidos mediante PCR. En el carril 1 de cada Panel (A, B y C) se muestra el MPM 0323 (Fermentas®), el cual permitió identificar los pesos de las bandas que fueron amplificadas. Panel A: carril 2 banda de 534 pb con cebadores *placomp3a.3-XbaI* y *placomp3a.5*, Panel B: carril 2 banda de 389 pb con cebadores *placomp3a.3-245* y *placomp3a.5* y Panel C: carril 2 banda de 278 pb con cebadores *placomp3a.3-121* y *placomp3a.5*.

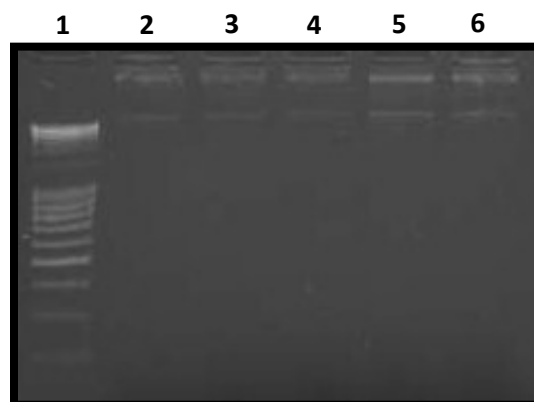
Por otra parte, se purificó el vector pMR15 según lo descrito en Materiales y Métodos. El producto de la purificación se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa del vector pMR15 obtenido. Carril 1: MPM 0403 (Fermentas®), Carril 2: banda de 11 500 pb perteneciente al vector pMR15.

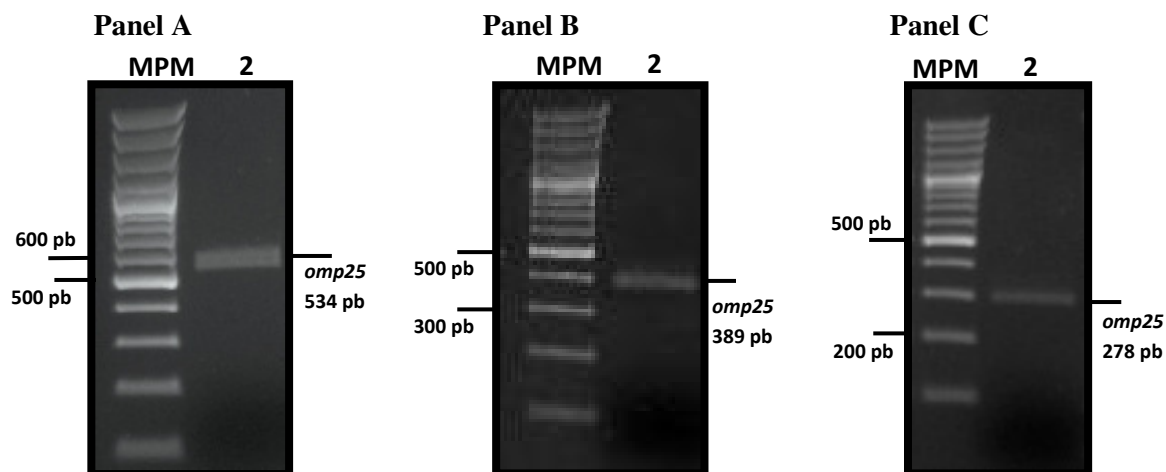
### 3.2. Construcción de las fusiones transcripcionales

Cuando se utilizaron para el PCR los cebadores con sitios de restricción para BamHI, los clones obtenidos luego de las electroporaciones no contenían el fragmento deseado. La Figura 5 muestra el resultado del PCR de verificación de 5 clones, de los cuales no se obtuvo amplificación del fragmento, sino únicamente se observan restos del vector. La defosforilación era un factor que afectaba los resultados, ya que los controles que se realizaban mostraban que la defosforilación del vector no estaba siendo tan efectiva como se requería para la construcción de la fusión. A pesar de que ésta fue estandarizada y se observó que la proporción efectiva era de 1 U de fosfatasa por cada 0.3µg de muestra, no se logró obtener clones positivos.



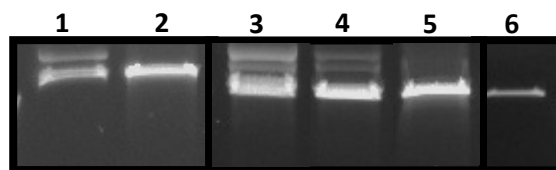
**Figura 5.** PCR de cinco clones resultantes de la transformación con los cebadores *placomp3a.3* y *placomp3a.5*. Carril 1: MPM 0323 (Fermentas®). El resto de los carriles muestra únicamente el vector pMR15 y no se obtuvo resultado del PCR con los cebadores respectivos. Esto indica que los clones no poseen el fragmento deseado.

Con el fin de evitar la unión de alguna otra banda no deseada al vector a la hora de efectuar las fusiones transcripcionales, los amplicones obtenidos fueron purificados según lo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados de dichas purificaciones se muestran en la Figura 6.



**Figura 6.** Electroforesis de los fragmentos purificados por medio de extracción en gel. En el carril 1 de cada Panel (A, B y C) se muestra el MPM 0323 (Fermentas®). Panel A: carril 2: banda de 534 pb con cebadores *placomp3a.3*XbaI y *placomp3a.5*, Panel B: carril 2: banda de 389 pb con cebadores *placomp3a.245* y *placomp3a.5* y Panel C: carril 2: banda de 278 pb con cebadores *placomp3a.121* y *placomp3a.5*.

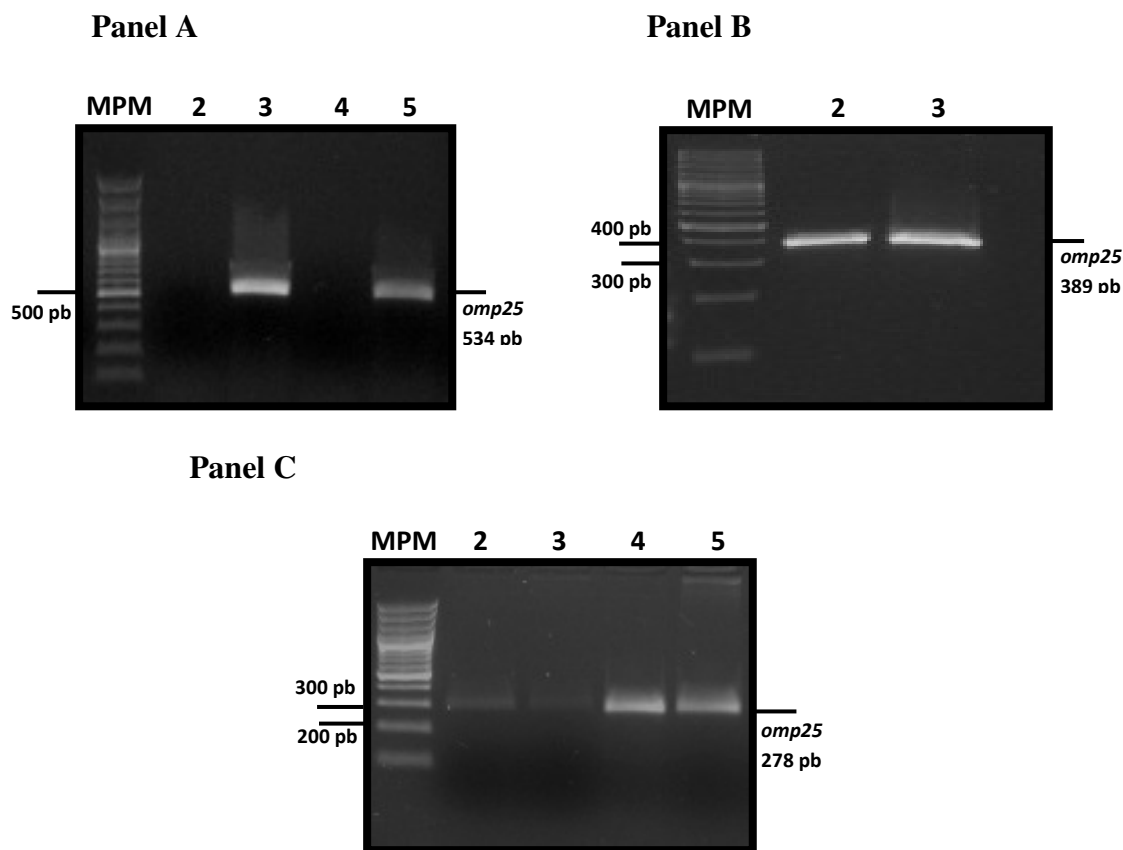
Para realizar una digestión eficaz se procedió a estandarizar las cantidades de enzima a utilizar. La Figura 7 muestra que utilizar 0.01 Unidad de XbaI para digerir el vector, como especifica el fabricante, no era suficiente. Por lo tanto, para aumentar las posibilidades de unión entre vector y fragmentos se estandarizaron las reacciones de digestión en el vector pMR15 con cada enzima por separado y se obtuvo la mejor digestión utilizando 1 µl de BamHI y 4 µl de XbaI para 25 µl de vector (Figura 7).



**Figura 7.** Estandarización de la reacción de digestión con las enzimas de restricción BamHI y XbaI. Carril 1: vector pMR15 sin digerir, carril 2: pMR15 digerido con 1 µl BamHI, carril 3: pMR15 digerido con 1 µl de XbaI, carril 4: pMR15 digerido con 3 µl de XbaI, carril 5: pMR15 digerido con 4 µl de XbaI, carril 6: pMR15 digerido con 5 µl de XbaI.

El crecimiento de clones resistentes a la Km indicaban la presencia del plásmido, pero no de las fusiones transcripcionales. Con el fin de verificar la inserción del fragmento dentro del vector se realizaron distintas pruebas según se indica en Materiales y Métodos. En la Figura 8 se muestran los resultados del PCR realizados a lisados de cuatro clones distintos de *E. coli* con los cebadores respectivos que amplifican cada fragmento *de omp25*. Para el constructo p3aLZ5 54 clones fueron muestreados, pero únicamente se amplificó el fragmento de la región corriente arriba de *omp25* en el clon #3 y en el #7. En este caso el clon #7 fue escogido para continuar las pruebas de comprobación y posterior electroporación en *B. abortus* 2308. En el caso de p3aLZ3 y p3aLZ2 todos los clones obtenidos amplificaron el fragmento correspondiente. El clon #4 y el clon #2 respectivamente fueron seleccionados para

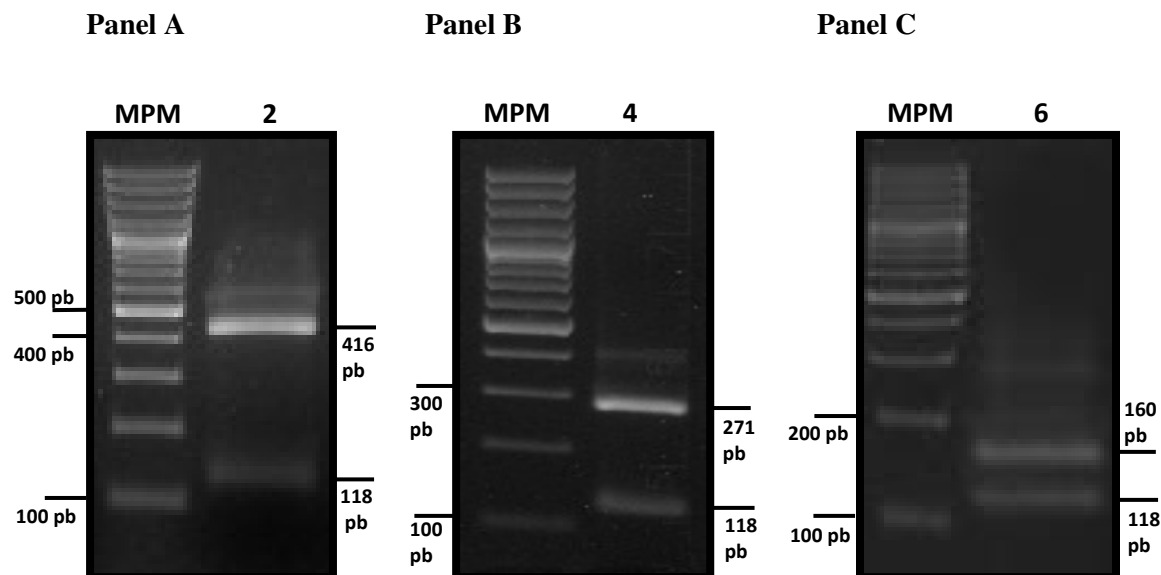
continuar con el proyecto. Posteriormente, se repitió el PCR pero a los plásmidos extraídos de cada clon y arrojaron los mismos resultados.



**Figura 8.** Comprobación por medio de PCR de la presencia del fragmento de interés en lisados de clones de *E. coli*. En el carril 1 de cada Panel (A, B y C) se muestra el MPM 0323 (Fermentas®). Panel A: cebadores placomp3a.XbaI y placomp3a.5, carril 2: clon #2, carril 3: clon #3, carril 4: clon #4, carril 5: clon # 7. Panel B: cebadores placomp3a-245.F y placomp3a.5, carril 2: clon #3, carril 3: clon #4. Panel C: cebadores placomp3a-121.F y placomp3a.5, carril 2: clon #1, carril 3: clon #2, carril 4: clon #3, carril 5: clon # 4.

Para reconfirmar que el fragmento que se encontraba ligado al vector era el deseado se sometieron los amplicones obtenidos a partir de los lisados a una digestión con Afl II. Esta digestión generó fragmentos de los tamaños esperados (Figura 9), corroborando que el

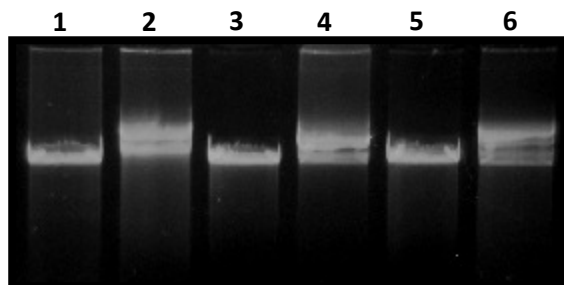
fragmento clonado obtenido era en efecto la región corriente arriba del gen *omp25* de *B. abortus*.



**Figura 9.** Comprobación de los fragmentos obtenidos de los clones #7, #4 y #2 con la enzima de restricción Afl II. En el carril 1 de cada Panel (A, B y C) se muestra el MPM 0323 (Fermentas®). Panel A: carril 2: Clon #7 (amplicón de 534 pb) se obtuvo un fragmento de 118 pb y 416 pb. Panel B: carril 2: Clon #4 (amplicón de 389 pb) se obtuvo un fragmento de 118 pb y 271 pb. Panel C: carril 2: #2 (amplicón de 278 pb) se obtuvo en fragmento de 118 pb y 160 pb

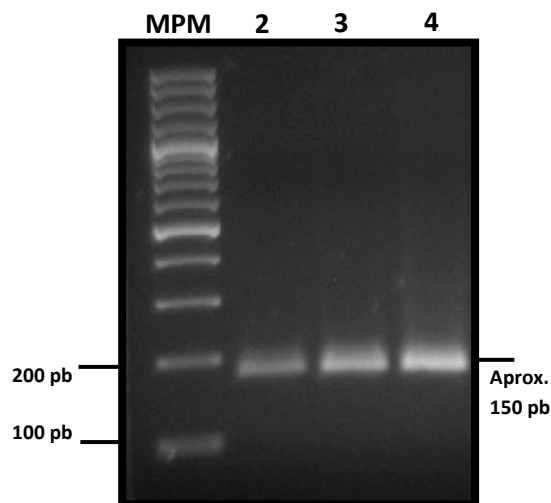
Los plásmidos extraídos de los clones #7 (Ep3aZ5), #4 (Ep3aZ3) y #2 (Ep3aZ2) se sometieron al mismo proceso de digestión descrito anteriormente. En la Figura 10 se muestran los plásmidos sin digerir y digeridos con la enzima Afl II, corroborando la correcta construcción de las fusiones transcripcionales.





**Figura 10.** Comprobación de las construcciones p3aLZ5, p3aLZ3 y p3aLZ2 mediante digestión con la enzima de restricción Afl II de los clones #7, #4 y #2 obtenidos de la electroporación en *E. coli* XL1Blue. Carril 1: clon #7 digerido con Afl II, carril 2: clon #7 sin digerir, carril 3: clon #4 digerido con Afl II, carril 4: clon #4 sin digerir, carril 5: clon # 2 digerido con Afl II, carril 6: clon # 2 sin digerir. Se puede notar como una única banda se muestra en los plásmidos digeridos con la enzima, la cual corta en el sitio localizado en los fragmentos, y dos bandas en los plásmidos no sometidos a la digestión. Estas única banda es el plásmido en forma lineal (aproximadamente 11.7 kb, según el constructo en cuestión), y las dos bandas es el plásmido relajado.

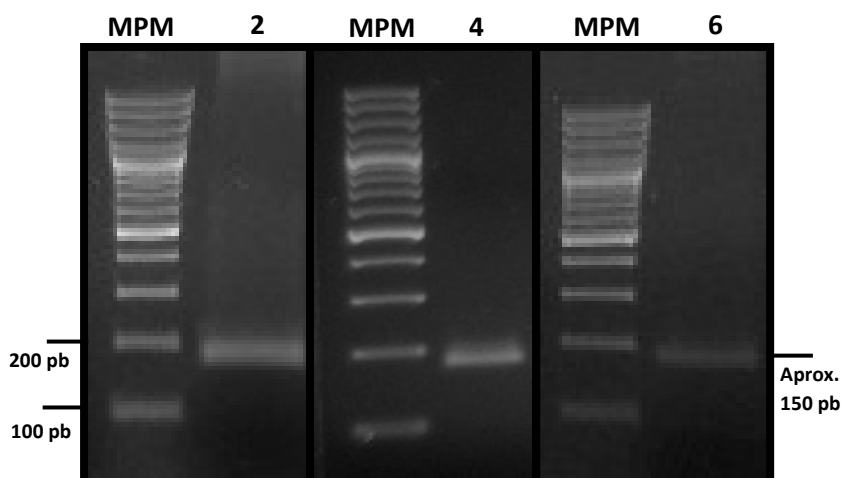
Con el objetivo de comprobar que el inserto se encontraba unido al vector y en la orientación adecuada se realizó el PCR con los cebadores bindomp3alacZF y bindomp3alacZR. Los tres plásmidos amplificaron una única banda de entre 200 y 100 pb que representa una región que incluye parte del fragmento clonado y parte del gen *lacZ* (Figura 1 y Figura 11). Estos nuevos constructos generados fueron denominados: p3aLZ5, p3aLZ3 y p3aLZ2 (Cuadro 2 y Figura 1C).



**Figura 11.** Comprobación de la fusión del fragmento con el gen *lacZ* de los plásmidos de los clones #7 (Ep3aZ5), #4 (Ep3aZ3) y #2 (Ep3aZ2). Carril 1: MPM 0323 (Fermentas®), carril 2: clon #7, carril 3: clon #4, carril 4: clon #2.

### 3.2. Electroporación en *B. abortus* 2308

Una vez confirmadas cada una de las construcciones se procedió a electroporarlas en *B. abortus* 2308. Con el fin de comprobar el éxito de la electroporación se realizó un PCR con los cebadores bindomp3alacZF y bindomp3alacZR a lisados de las cepas obtenidas y denominada 11000. *abortus* 2308Bp3aZ5, Bp3aZ3 y Bp3aZ2. Los resultados obtenidos (Figura 12) concordaron con lo esperado.



**Figura 12.** Comprobación de las construcciones p3aLZ5, p3aLZ3 y p3aLZ2 en los clones #3 (Bp3aZ5), #4 (Bp3aZ3) y #6 (Bp3aZ2) por medio de PCR con los cebadores bindomp3alacZF y bindomp3alacZR. Carril 1: MPM 0323 (Fermentas®), carril 2: clon #3, carril 3: MPM 0323 (Fermentas®), carril 4: clon #4, carril 5: MPM 0323 (Fermentas®) carril 6: clon # 6. El peso aproximado es de entre las 100 y 200 pb.

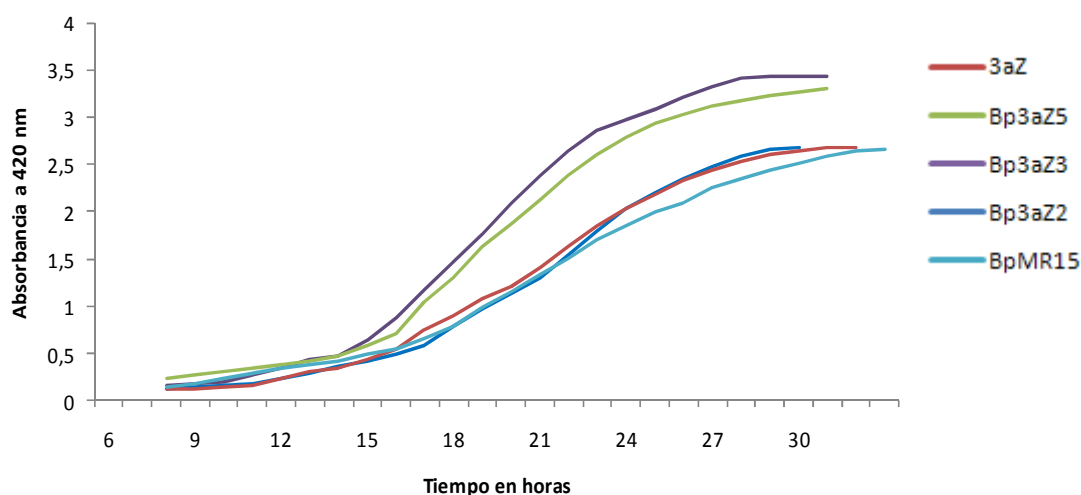
### 3.3. Curvas de crecimiento de los clones Bp3aZ5, Bp3aZ3, Bp3aZ2, BpMR15 y 3aZ

Para establecer los momentos de toma de muestra para el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa, se estandarizaron curvas de crecimiento bacteriano para cada uno de los clones y se observó que todos presentaban un comportamiento de crecimiento similar, pero alcanzaban las diferentes fases en momentos y absorbancias distintas, por lo que se determinó en cada una de las curvas

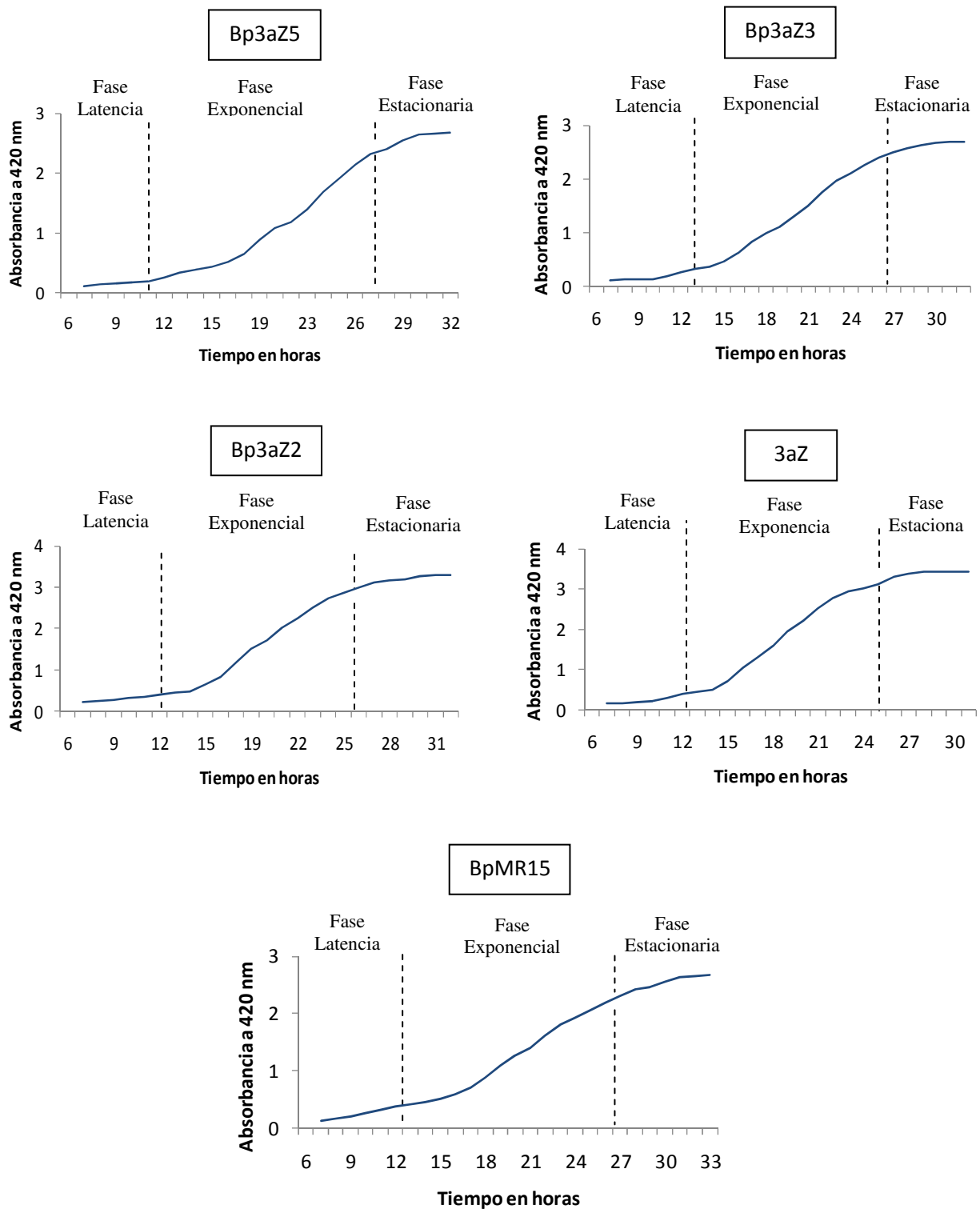
los límites de las fases latencia, exponencial (inicio, media y tardía) y estacionaria (Figura 13a y 13b).

Manterola (2004) creó la cepa *B. abortus* 3aZ (Cuadro 1). Esta cepa fue utilizada como control de la actividad promotora de *omp25*, pues posee una fusión transcripcional intracromosomal del gen de la  $\beta$ -galactosidasa y la región corriente arriba del gen *omp25*, involucrando cualquier sitio regulador que se encuentre localizado lejos del mismo.

La Figura 13a y la Figura 13b muestra la curva de crecimiento bacteriano para Bp3aZ5, Bp3aZ3, Bp3aZ2, 3aZ y BpMR15 de manera independiente y sobrepuestas, así como los límites señalados para cada fase, donde se denota que las etapas de su crecimiento difieren. De esta manera se aseguró que las muestras para el ensayo  $\beta$ -galactosidasa siempre fueran tomadas en la misma fase en todos los clones.



**Figura 13a.** Comparación del crecimiento bacteriano de 3aZ (morado), Bp3aZ5 (azul), Bp3aZ3 (rojo), Bp3aZ2 (verde) y BpMR15 (celeste) en un periodo de 32 horas.

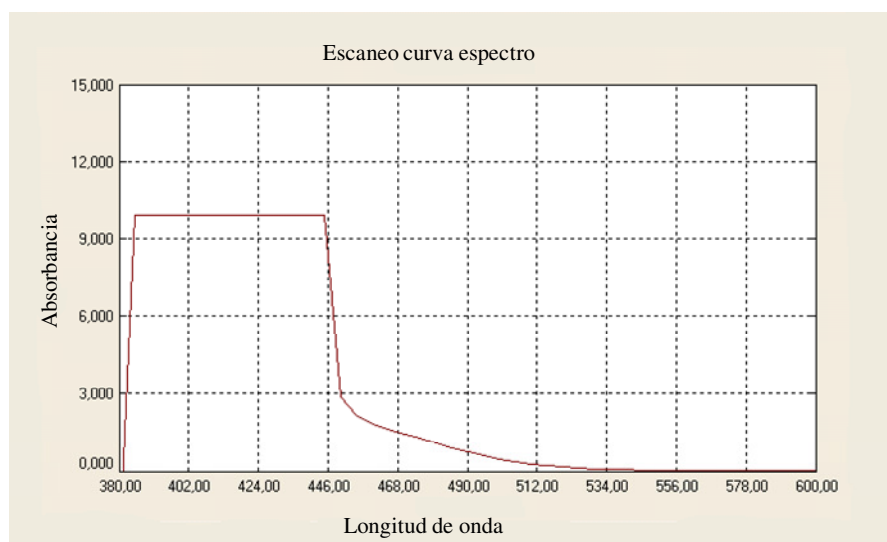


**Figura 13b.** Determinación de las fases de crecimiento bacteriano para Bp3aZ5, Bp3aZ3, Bp3aZ2, 3aZ y BpMR15.

### 3.4. Ensayo $\beta$ –galactosidasa

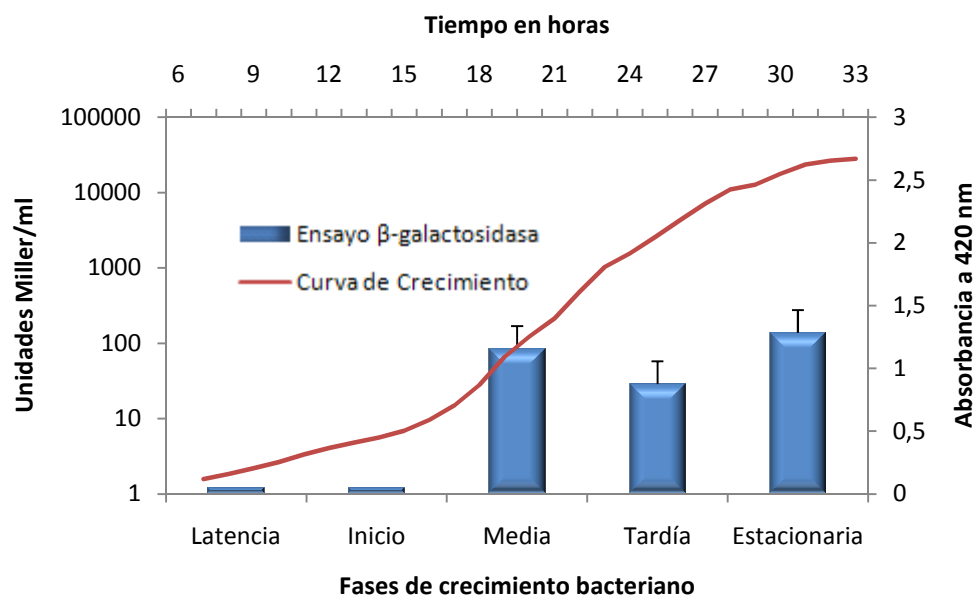
Con el fin de observar el comportamiento de los diferentes constructos se procedió a medir la actividad  $\beta$  –galactosidasa de Bp3aZ5, Bp3aZ3, Bp3aZ2 y BpMR15 en las diferentes etapas de la curva de crecimiento realizando el protocolo descrito en materiales y métodos.

Para verificar que las unidades de absorbancia obtenidas para cada muestra medida correspondían efectivamente a la actividad  $\beta$ -galactosidasa y no a la presencia de interferentes (detritos celulares), las muestras fueron medidas a 420 nm y 550 nm de longitud de onda. Sin embargo a pesar de la centrifugación, las muestras arrojaban los mismos valores en ambas longitudes de onda. Por lo tanto la lectura obtenida a 420 nm era únicamente de dispersión celular y no la señal proveniente del orto-nitrofenol. Para descartar algún problema técnico, con el equipo utilizado o la presencia de interferentes, se realizó el espectro de absorción de una de las muestras en otro espectrofotómetro. La Figura 14 muestra el espectro de absorción del orto-nitrofenol obtenido de los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa y mostró que el pico de absorción se encontraba entre los 380 nm a los 450 nm. A 550 nm la medición era cero a diferencia de lo que mostraba el primer espectrofotómetro (Figura 14). Por lo tanto, se midieron los ensayos tanto en el espectrofotómetro ya utilizado como en uno nuevo y reveló que los valores que arrojaba el primer espectrofotómetro para 550 nm eran diferentes a los del nuevo espectrofotómetro, donde la lectura fue cero. A raíz de estos nuevos hallazgos, se descartaron las lecturas obtenidas con el primer espectrofotómetro y se continuó realizando la lectura con el espectrofotómetro nuevo. A pesar de estos resultados siempre se medían los ensayos a ambas longitudes de onda.



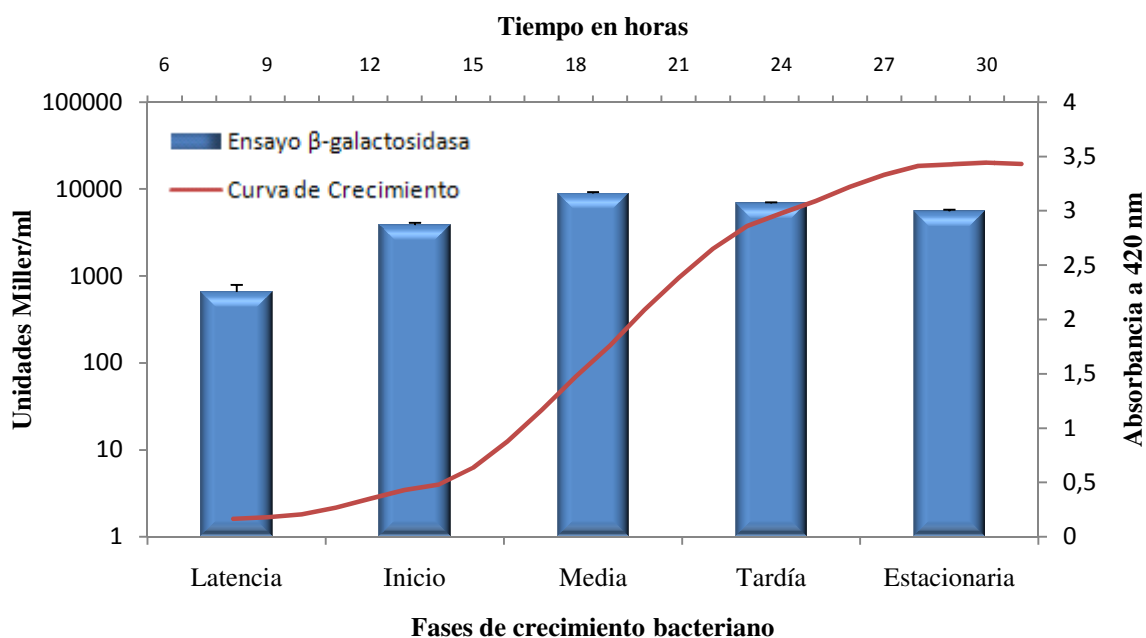
**Figura 14.** Determinación del espectro de absorción para el orto-nitrofenol. El rango de longitud de onda utilizado es de 380 nm a 600 nm.

Con el fin de eliminar cualquier producción de color amarillo externo a la actividad del promotor se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa residual a la cepa BpMR15. Como se observa en la Figura 15 en la fase de latencia e inicio de la fase exponencial la producción de  $\beta$ -galactosidasa fue cero. En las siguientes fases hubo una pequeña hidrólisis de ONPG, que fue sustraída en cada uno de los ensayos realizados en las fases de crecimiento correspondientes.



**Figura 15.** Actividad residual de  $\beta$ -galactosidasa a través de la curva de crecimiento del clon BpMR15. La actividad residual obtenida del ensayo  $\beta$ -galactosidasa se expresa como Unidades Miller/ml.

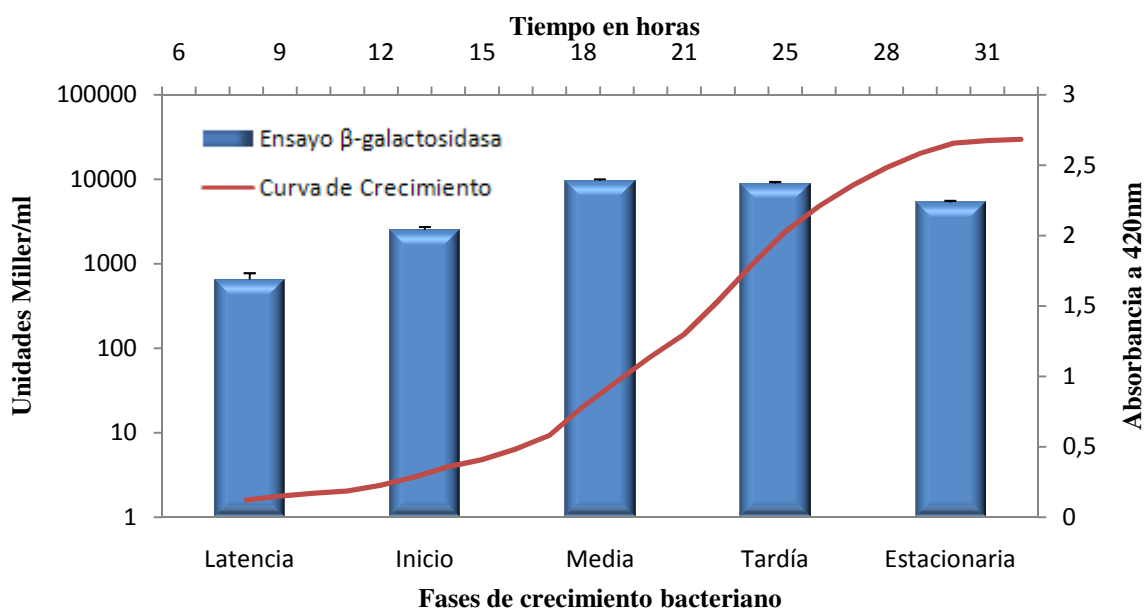
Los resultados de los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa para la cepa control 3aZ se muestran en la Figura 16. Ésta tuvo su máxima expresión en la fase exponencial (promedio: 8927 Unidades Miller/ml  $\pm$ 326.72) y disminuye en las otras dos fases: latencia y estacionaria. Su mínima expresión fue en la fase de latencia con un promedio de 655 Unidades Miller/ml  $\pm$ 135.14.



**Figura 16.** Actividad del promotor del gen *omp25* silvestre a través de la curva de crecimiento del mutante 3aZ. La actividad promotora obtenida del ensayo β-galactosidasa se expresa como Unidades Miller/ml.

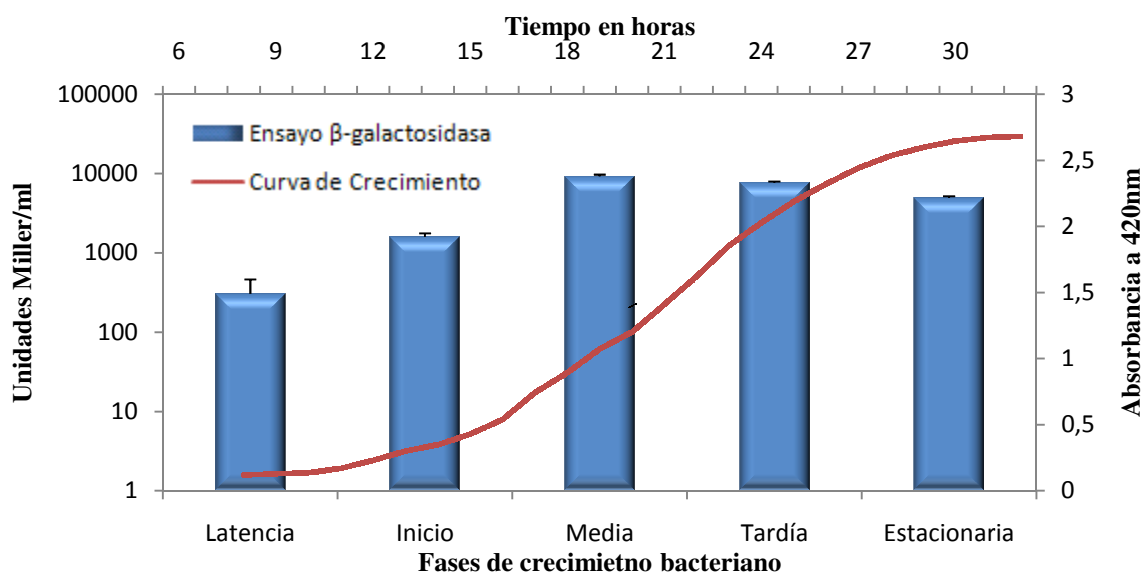
La cepa Bp3aZ5 contiene el primer constructo creado de 519 pb. La Figura 17 muestra que al igual que 3aZ la actividad promotora es dependiente de la curva de crecimiento. La máxima expresión fue en la fase exponencial media con un promedio de 9634 Unidades Miller/ml  $\pm 361.18$  y se mantuvo alta hasta la fase exponencial tardía. La mínima expresión fue en la fase de latencia con un promedio de 652 Unidades Miller/ml  $\pm 123.73$ . La similitud en cuanto al patrón de expresión así como a las Unidades Miller/ml de este fragmento con la cepa 3aZ valida la estrategia utilizada para la búsqueda de regiones reguladoras corriente arriba de *omp25*.





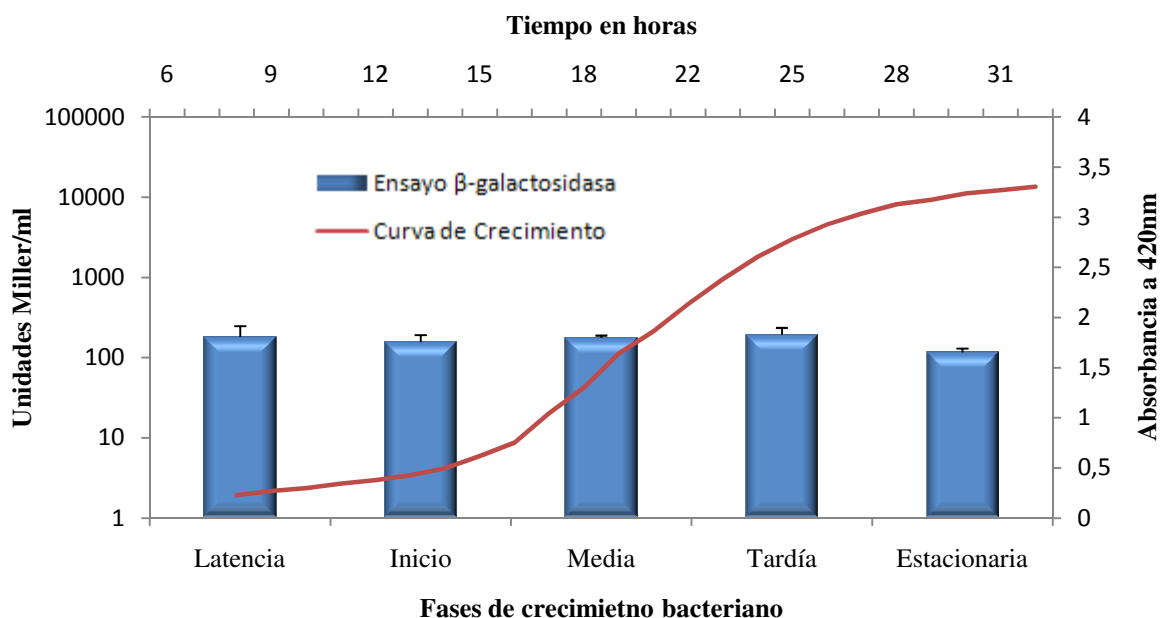
**Figura 17.** Actividad de un fragmento del promotor del gen *omp25* a través de la curva de crecimiento del clon Bp3aZ5. La actividad promotora obtenida del ensayo β-galactosidasa se expresa como Unidades Miller/ml.

La cepa B3aZ3 contiene el constructo con el fragmento de 389 pb, el cual posee 262 pares de bases antes del primer codón, este fragmento elimina 145 pb del fragmento de 519 pb. La Figura 18 muestra la actividad promotora de *omp25* presente en esta región y se observa que también fue dependiente de la curva de crecimiento donde su máxima expresión fue de 9250 Unidades Miller/ml  $\pm 448.80$  y la mínima fue de 304 Unidades Miller/ml  $\pm 159.493469$ . Se concluye entonces que la actividad promotora comprendida en los 262 pares de bases antes del primer codón es la misma que aquella contenida en los 392 pares de bases que existen antes del primer codón del gen *omp25*, presentes tanto en 3aZ como en Bp3aZ5.



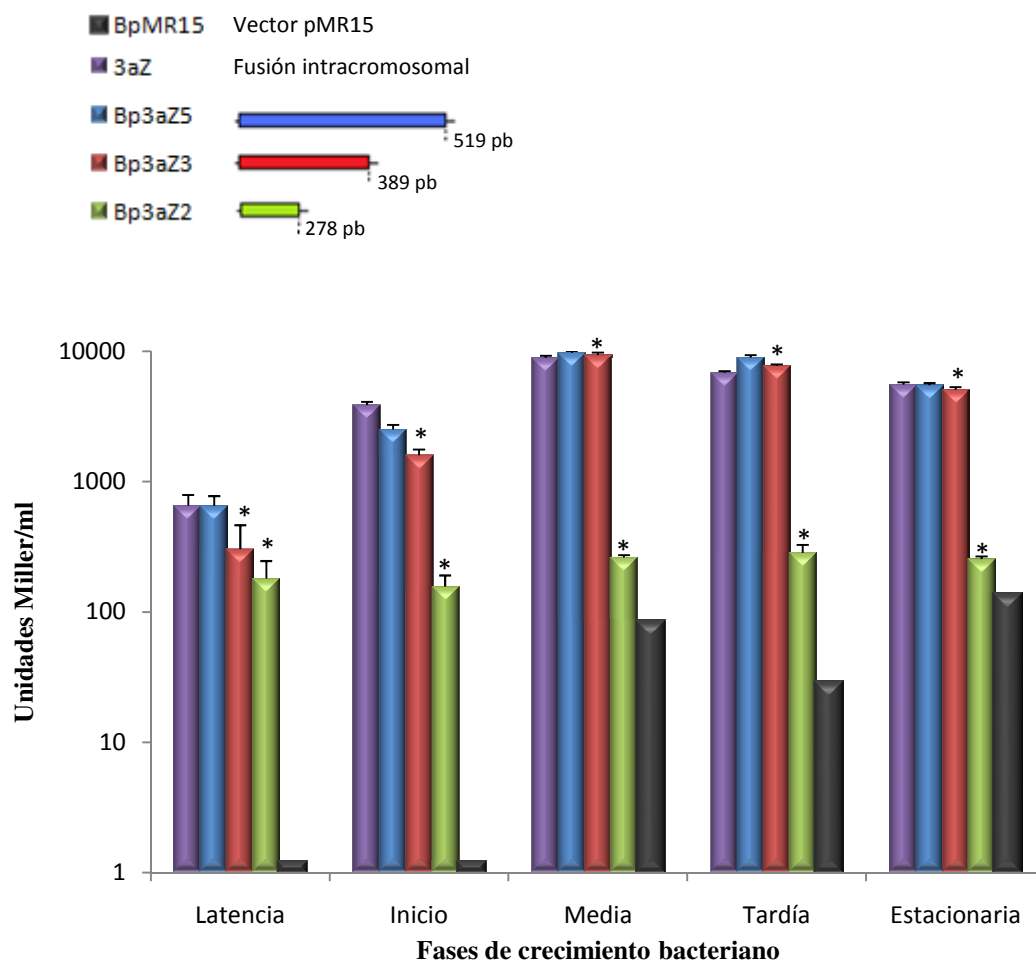
**Figura 18.** Actividad de un fragmento del promotor del gen *omp25* a través de la curva de crecimiento del clon Bp3aZ3. La actividad promotora obtenida del ensayo  $\beta$ -galactosidasa se expresa como Unidades Miller/ml.

Al contrario del resto de los constructos, el más pequeño, que comprende 151 pares de bases antes del primer codón del gen *omp25* se caracterizó por tener una producción de Unidades Miller/ml mínima y constante durante todas las fases de la curva de crecimiento (Figura 19). Estos datos revelan que la actividad promotora que presentaba el fragmento de 389 pb mostrados en la Figura 18 se vio afectada al ser eliminadas 111 pb para formar este fragmento de 278 pb.



**Figura 19.** Actividad de un fragmento del promotor del gen *omp25* a través de la curva de crecimiento del clon Bp3aZ2. La actividad promotora obtenida del ensayo β-galactosidasa se expresa como Unidades Miller/ml.

En la Figura 20 se muestran los resultados de los tres constructos y 3aZ. Se observa que Bp3aZ5 y Bp3aZ3 tuvieron una producción de Unidades Miller/ml muy similar entre si y fueron dependientes de la fase de crecimiento, indicando que el promotor se activa al inicio de la fase exponencial. Observándose una máxima expresión al alcanzar la mitad de la fase exponencial que se mantuvo incluso hasta el final de la fase exponencial y que disminuye al llegar a la fase estacionaria. Además, ambos constructos presentaron el mismo patrón de actividad promotora que la cepa control 3aZ, y valores en Unidades Miller muy similares. Sin embargo, las diferencias entre Bp3aZ5 y Bp3aZ3 según la Prueba T de Student son significativas. Por otro lado, se nota la disminución abrupta de actividad promotora que presentó Bp3aZ2, independiente de la fase de crecimiento. La diferencia que se obtuvo entre Bp3aZ2 y BpMR15 también fue significativa.



**Figura 14.** Comparación de la actividad promotora de tres fragmentos del promotor del gen *omp25* en los clones, Bp3aZ5 (azul), Bp3aZ3 (rojo) y Bp3aZ2 (verde) con la actividad del promotor silvestre en el clon 3aZ (morado) y la actividad residual del clon BpMR15 (negro). La actividad promotora obtenida del ensayo  $\beta$ -galactosidasa se expresa como Unidades Miller/ml. Con asterisco se señalan los fragmentos que presentaron diferencias significativas con respecto al fragmento de 519 pb.

#### 4. DISCUSION

Este trabajo consistió en la construcción de tres fusiones transcripcionales que permitieron evaluar el comportamiento de la región promotora que regula la expresión del gen *omp25* de *B. abortus*. La transformación y la clonación son técnicas que han provocado un especial impacto en la ingeniería genética. Muchos estudios las han utilizado para llevar a cabo experimentos que llevan al análisis genético de algunas bacterias (Dale y Park, 2004).

Para el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa Miller (1972) recomienda que la lectura de la DO a 420nm del orto-nitrofenol debería ser idealmente entre 0.6 - 0.9. También sugiere medir a 550 nm paralelamente a los 420 nm ya que a esta longitud de onda el color del orto-nitrofenol no es visible pero los detritos celulares si, es decir que la dispersión celular de la medición a 420 nm se puede eliminar midiendo a 550 nm. Sin embargo la muestra se centrifugó y se tomó cuidadosamente el sobrenadante para ser evaluado, evitando de esta manera la necesidad de corregir la medida realizada a 420nm.

La cepa *B. abortus* 3aZ (Manterola, 2004) representó el control que respalda los resultados obtenidos por los constructos fuera del cromosoma, ya que su fusión intracromosomal muestra el promotor del gen *omp25* intacto en su entorno propio. En el caso de este proyecto los ensayos del promotor se realizaron en constructos que se crearon extrayendo las regiones corriente arriba del gen *omp25* fuera del cromosoma, pudiendo provocar de esta manera la pérdida de alguna región reguladora lejos de la región corriente arriba del gen *omp25*, alterando y desvalorizando los resultados que se obtuvieran. Sin embargo, al realizar simultáneamente los ensayos de los constructos con los de 3aZ se

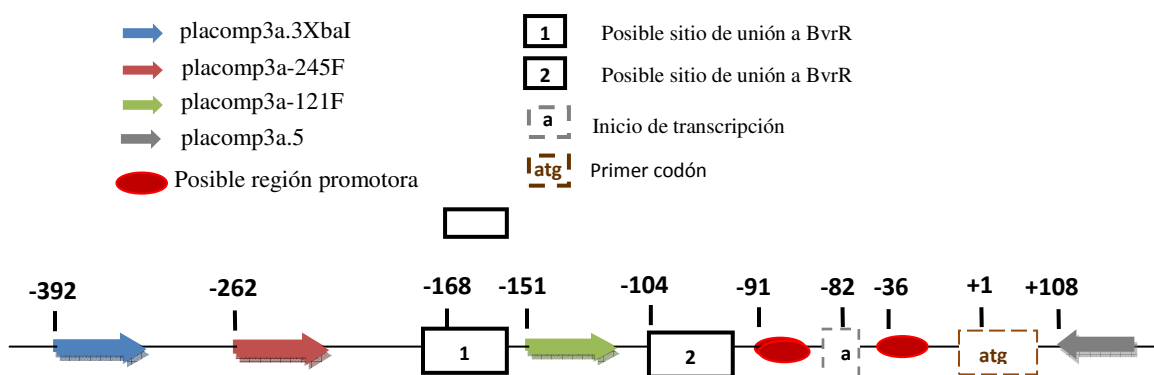
controló si se afecta o no el extraer las regiones del contexto cromosómico. Además, a pesar de que los ensayos  $\beta$ -galactosidasa efectuados en 3aZ y los demás constructos se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Manterola (2004), los valores en Unidades Miller/ml alcanzados con 3aZ difieren con los expuestos por Manterola (2004). Esta situación se puede deber a la divergencia en la manipulación de los procedimientos por ser realizado por haber sido dos personas distintas y en dos ambientes diferentes. Por lo tanto, se reproduce en el laboratorio los ensayos  $\beta$ -galactosidasa que permite comparar 3aZ con el resto de los constructos y tener el mismo cambio en todos.

BpMR15 es otra cepa control que contenía solamente el vector de clonación. La misma generó hidrólisis de ONPG en las últimas fases de crecimiento, como se pudo preveer, por esta razón la importancia de utilizarlo como control y eliminar al resto de los constructos la producción de ONPG que se obtuviera. De esta manera se evita que lo producido por BpMR15 no aumente o altere los resultados de la actividad promotora de los constructos.

Con técnicas similares, Guzmán-Verri *et al.* (2002) observaron en *Brucella* el efecto que tiene el sistema de dos componentes BvrR/BvrS en los genes de las proteínas de membrana pertenecientes al grupo 3 de *B. abortus*. Con ello demostraron que el promotor del gen *omp25* se encuentra bajo regulación positiva del sistema BvrR/BvrS, ya que disminuía la síntesis de esta proteína en mutantes *bvrR*<sup>-</sup> o *bvrS*<sup>-</sup>.

Posteriormente, se localizaron dos regiones reguladoras corriente arriba de *omp25* de *B. abortus* donde BvrR puede interaccionar. Estas dos secuencias motivo fueron comparadas y

analizadas con otras secuencias de otros genes que codifican para proteínas de membrana o proteínas que se creen importantes para la virulencia de *B. abortus* y se obtuvo una secuencia consenso a la que se denominó secuencia C (Capitan, 2008). En *omp25* las dos posibles regiones motivo reguladoras se ubicaron en las posiciones -104 y -168 con respecto al primer codón del gen, las cuales poseen un 46% y un 66% de similitud respectivamente con la secuencia C de Capitán (2008). Además, se realizó el hallazgo del sitio de inicio de la transcripción en la posición -82 con respecto al primer codón por medio de la técnica de extensión de cebadores utilizando ARN extraído de *B. abortus* 2308 (Capitán, 2008) (Figura 21).



**Figura 15.** Representación esquemática de la secuencia corriente arriba del gen *omp25* y de regiones de interés. En esta secuencia se localizan los siguientes cebadores: placomp3a.3XbaI (flecha azul), placomp3a-245F (flecha roja), placomp3a-121F (flecha verde) y placomp3a.5 (flecha gris). El recuadro gris muestra el sitio de inicio de la transcripción según Capitán (2008). Se ejemplifica con un recuadro café el primer codón atg. En los recuadros negros resaltan los posibles sitios de unión con BvrR que poseen un 66% de similitud (1) y 46% de similitud (2) con la Secuencia C de Capitán (2008). En rojo se muestran las posibles regiones promotoras.

Estos datos sugerían posibles regiones donde localizar el sitio promotor, por lo tanto con respecto a estos sitios se realizaron los cortes que comprendieran secuencias importantes para ser analizadas. El fragmento de 519 pb comprende hasta la posición -392. El segundo fragmento de 389 pb envuelve hasta la posición -262, estas dos regiones incluyen los dos sitios motivo reguladores encontrados por Capitán (2008). El último fragmento involucra

únicamente hasta la posición -151, excluyendo una de las regiones motivo reguladoras (Figura 21). Esta región es la ubicada en la posición -168 a partir del primer codón, la cual al poseer un 66% de similitud con la Secuencia C podría ser el sitio con mayor posibilidad de unión con la proteína BvrR.

La Figura 20 denota que las cepas que contienen los plásmidos p3aLZ5 y p3aLZ3 mostraron niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa similares entre si y similares a la cepa que contiene la fusión transcripcional cromosómica *Pomp25::lacZ*, además de manifestar el mismo patrón a lo largo de la curva de crecimiento. Por lo tanto, la sección de 180 pb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción que envuelve el fragmento de 389 pb es capaz de producir una actividad promotora similar a la de la cepa control. Las diferencias entre Bp3aZ5 y Bp3aZ3 fueron significativas lo que revela un posible sitio regulador. Por otro lado, Bp3aZ5 y Bp3aZ3 mantuvieron siempre una actividad mayor a Bp3aZ2. La cepa Bp3aZ2, que contiene el fragmento más corto, mostró durante toda la fase de crecimiento una actividad constante y basal, pero siempre mayor a la de la cepa BpMR15. Esta actividad basal representó una disminución de más de un 90% en todas las fases de crecimiento con respecto al resto de los constructos, lo que demuestra que en este fragmento la actividad promotora se vio afectada. Los resultados obtenidos demuestran que la región comprendida entre el cebador placomp3a-245 y placomp3a-121 (Figura 20) es una región que afecta positivamente la función del promotor, ya que sin ella se ve comprometida la actividad y ésta decae.

Los constructos de Manterola (2004) en mutantes del sistema de dos componentes BvrR/BvrS mostraron un comportamiento muy similar al producido por el constructo de este



estudio Bp3aZ2. Estas mutantes y Bp3aZ2 muestran una disminución drástica de la actividad del promotor, sin embargo, presentan una leve transcripción que permanece constante a lo largo de toda la fase de crecimiento. Por lo tanto, se concluye que existe una actividad promotora basal en las 151bp corriente arriba de *omp25*, que es positivamente regulada por secuencias que se encuentran luego de las 152 bp corriente arriba de *omp25*.

Con estos resultados y los hallazgos mencionados anteriormente por Guzman-Verri *et al* (2002) y Capitán (2008) se puede conjeturar que al eliminar en el fragmento de 278 pb el posible sitio motivo regulador donde la proteína BvrR se une al ADN, la transcripción se ve afectada y la actividad del promotor disminuye al mínimo. Al carecer el promotor, en este fragmento, de un impulsor para mejorar la efectividad de su funcionamiento no se va a observar una actividad alta como tampoco regulada a través de su crecimiento. Jiménez y Merchant (2003) puntualizan que los activadores confieren a la polimerasa una alta afinidad y especificidad por el promotor, incluso llegando a aumentar los niveles de la transcripción. Por lo tanto, si suponemos que el promotor en este fragmento sigue intacto y solo el sitio de unión de BvrR es eliminado, la polimerasa todavía tiene la capacidad de reconocer el promotor, unirse a él y transcribir el gen pero es incapaz de producir altos niveles de ARN *omp25*, como lo muestran los fragmentos que conservan en su secuencia el sitio motivo regulador BvrR de Capitán (2008).

Según Nelson y Cox (2000) la transcripción puede ser regulada durante cualquiera de sus etapas, sin embargo, la unión de la polimerasa al ADN y el inicio de la transcripción son el principal objeto de regulación. La unión de factores de transcripción o de proteínas

reguladoras a secuencias cercanas o lejanas al promotor afecta los niveles de la expresión génica (Devlin, 2002). Éstas se unen a secuencias del ADN llamadas operadores y bloquean o mejoran la unión de la ARN polimerasa con el promotor, de esta manera inhibiendo o activando la transcripción, respectivamente. Se ha encontrado que la activación o represión mediada por proteínas reguladoras está ligada a distancias exclusivas de los operadores con relación a los promotores. Los sitios de preferencia para los represores son corriente abajo de la posición -30 y los activadores, como es el caso de BvrR, es entre los nucleótidos -80 y -30 con respecto al sitio de inicio de la transcripción, esto se debe a que las secuencias activadoras se ubican corriente arriba del promotor para reclutar la ARN polimerasa y las secuencias que reprimen se ubican corriente abajo del promotor para detener a la ARN polimerasa (Wagner, 2000; Lloyd et al, 2001). Los sitios ubicados por Capitán (2008) se encuentran a -168 y -104 desde el primer codón. Nelson y Cox (2000) aseguran que los activadores se localizan adyacentes a los promotores que tienen poca afinidad o no se unen del todo a la ARN polimerasa, por lo que poca transcripción ocurre en la ausencia de estos activadores, como es el caso de Bp3aZ2.

Actualmente, las regiones promotoras más estudiadas pertenecen a la bacteria *E. coli*. Generalmente estas regiones se extienden desde unas 70 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio transcripción hasta unas 30 pares de bases corriente abajo (Nelson y Cox, 2000). Incluso se ha caracterizado una estructura consenso del sitio promotor en *E. coli* que posee tres elementos importantes, entre ellos están dos secuencias altamente conservadas que usualmente se encuentran diez pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción con la secuencia 5'-TATAAT-3' llamada región -10 y 35 pares de bases antes del sitio de inicio de la

transcripción con la secuencia 5'-TTGACA-3' llamada región -35. La región entre estos dos sitios no es conservada, pero es importante para posicionar las dos secuencias consenso en la distancia y el ángulo correcto para un contacto óptimo con la superficie de la ARN polimerasa (Wagner, 2000; Hartl y Jones, 2005).

Del proceso de transcripción depende la supervivencia de la bacteria por lo que éste debe ser un mecanismo cuidadosamente regulado. A causa de esto no se presentará una única vía de regulación sino múltiples formas de escoger los genes adecuados y precisos en cada momento de su crecimiento (Nelson y Cox, 2000). Otra forma de regulación aparte de proteínas reguladoras es el factor sigma de la holoenzima de ARN polimerasa, el cual reconoce la secuencia del promotor. Existen varios factores  $\sigma$  que pueden ser parte de la ARN polimerasa, cada factor  $\sigma$  interacciona con diferentes secuencias del ADN, por lo tanto el reconocimiento y el uso de un determinado promotor es dependiente del factor  $\sigma$  presente en la holoenzima (Wagner, 2000; Alberts et al., 2002). La BrvR es una proteína reguladora perteneciente a la familia OmpR que contienen en el extremo C-terminal el dominio de unión con el ADN de 150 amino ácidos de longitud. Este sitio de unión al ADN probablemente envuelve un dominio de hélice-vuelta-hélice. Los reguladores de tipo OmpR actúan en promotores que son reconocidos por la holoenzima  $\sigma^{70}$  de la ARN polimerasa (Mizuno y Tanaka, 1997; Wagner, 2000). Hook-Banard *et al.* (2006) caracterizaron un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$  en *E. coli* y demostraron que la región -35 encontrada en ese promotor es requerida para una función promotora eficiente, ya que al eliminarla disminuía significativamente su actividad. Este promotor poseía un elemento -35 y un motivo con la secuencia "TGN" muy conservados pero un elemento -10 muy pobre, por lo que sus análisis

indicaron que ambos, región -35 y motivo TGN se requieren para una transcripción eficiente y que esto compensa un elemento -10 deficiente. En el caso de *omp25* no se sabe donde se localizan las regiones -35 y -10 o si posee un motivo TGN cerca de la región -10. Por lo tanto, el último corte (278 pb) puede haber eliminando el sitio -35 viéndose afectada aún más la transcripción de este gen. Sin embargo, se puede especular que este promotor es  $\sigma^{70}$  dependiente, localizado entre el sitio -10 al sitio -34 a partir del sitio de inicio de la transcripción, lo que implicaría la permanencia intacta del promotor en el fragmento más pequeño de 278 pb.

Una conclusión relevante de este trabajo es que la secuencia que se ubica corriente arriba de la posición -151 hasta la posición -262 contiene información relevante y necesaria para una transcripción a los mismos niveles de la cepa silvestre. Este fragmento posee únicamente 111 pb más que el fragmento 278 pb y sin ellas la proteína Omp25 no lograría ser producida en las cantidades ni en los momentos requeridos por la bacteria. En esta región se encuentra una posible región de unión para BvrR.

## 5. CONCLUSIONES

1. Las cepas Bp3aZ5 y Bp3aZ3 durante la fase de crecimiento mantuvieron valores muy cercanos entre si. Sin embargo, las diferencias obtenidas entre estos dos fragmentos son significativas, lo que determina que la región de 389 pb aún posee el sistema de transcripción pero con la delección de algún factor regulador positivo envuelto en el fragmento de mayor tamaño.
2. La actividad promotora de Bp3aZ2 decayó en más de un 90 % con respecto a los constructos Bp3aZ5 y Bp3aZ3. Lo que demostró el corte realizado en la posición -151 eliminó una región importante para el buen funcionamiento del promotor del gen *omp25*, y eliminó la correcta transcripción del gen.
3. Hay una producción residual en Bp3aZ2 que podría corresponder únicamente a los sitios -35 y -10 del promotor, sin factores de regulación.
4. La secuencia necesaria para lograr la transcripción del gen *omp25* se encuentran entre la región -151 y -262.
5. El sitio de unión de la proteína reguladora BvrR podría ser la responsable de la caída de la actividad promotora del fragmento Bp3aZ2.

## 6. RECOMENDACIONES

1. Secuenciar los fragmentos obtenidos por PCR para corroborar que las secuencias amplificadas no sufrieron mutaciones.
2. Ejecutar dos cortes más entre los fragmentos de 389 pb y 278 pb para disminuir aún más la secuencia donde posiblemente se encuentran tanto el promotor como el sitio de unión de BvrR.
3. Realizar estudios con los fragmentos obtenidos en este trabajo que complementen estos resultados, como “DNA footprinting” o EMSA.
4. Efectuar estudios mutagénicos para determinar las regiones -10 y -35 de este promotor y observar si estos cortes interfirieron o no con la región -35.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th. ed. Garland Science, New York.
- Alexander, B., P.R. Schnurrenberger & R.R. Brown. 1981. Numbers of *Brucella abortus* in the placenta, umbilicus and fetal fluid of two natural infected cows. *Vet. Rec.* 108: 500.
- Alton, G.G., L.M. Jones & D.E. Pietz. 1975. *Laboratory techniques in brucellosis*. 2nd ed. FAO-WHO, Geneva.
- Bricker, B.J., D.R. Ewalt, A.P. Macmillan, G. Foster & S. Brew. 2000. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1258-1262.
- Capitán, Z. 2008. Caracterización de secuencias con actividad reguladora de genes de *Brucella abortus* vinculados con la virulencia y bajo el control del sistema de dos componentes BvrR/BvrS. Tesis de Maestría. Universidad Nacional. Heredia, CR.
- Caro-Hernández, P., L. Fernández-Lago, M.J. de Miguel, A.I. Martín-Martín, A. Cloeckaert, M.J. Grilló & N. Vizcaíno. 2007. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect. Immun.* 75: 4050-4061.

- Caron E., A. Gross, J.P. Liautard & J. Dornand. 1996. *Brucella* spp. release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF- $\alpha$  expression, active on human but not on murine macrophage-like cells. *J. Immunol.* 156: 2885-2893.
- Carter, G.R. & D.J. Wise. 2004. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. 6th ed. Iowa State Press. Iowa, United States.
- Castillo R., F. 2005. *Biología ambiental*. 1era. ed. Tébar, S L., Madrid.
- CFSPH (Center for Food Security and Public Health). 2007. *Brucellosis* [en línea]. Iowa State University College of Veterinary Medicine. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf> (Consulta: 29 jun. 2009).
- Cloekaert, A., N. Vizcaíno, J. Paquet, R. A. Bowden & P. H. Elzer. 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past present and future. *Vet. Microbiol.* 90: 229-247.
- Cloekaert, A., J.M. Verger, M. Crayon & O. Grepinet. 1995. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer membrane proteins of *Brucella*. *Microbiol.* 141: 2111-2121.
- Cloekaert A., J.-M. Verger, M. Grayon, M. S. Zygmunt & O. Grepinet. 1996. Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the major 25-kilodalton outer membrane



protein of *Brucella ovis*: evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene. *Infect. Immun.* 64: 2047–2055

Dale, J. W. & S. F. Park. 2004. *Molecular genetics of bacteria*. 4th. ed. John Wiley & Sons, Ltd., England.

Davis, R.G. 2004. The ABCs of bioterrorism for veterinarians, focusing on category B and C agents. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224: 1084–1095.

Dawson, C.E., E.J. Stubberfield, L.L. Perrett, A.C. King, A.M. Whatmore, J.B. Bashiruddin, J.A. Stack & A. P. MacMillan. 2008. Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals. *B.M.C. Microbiol.* 8: 224.

Devlin, T. M. (ed). 2002. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. 5th. ed. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

Dubray, G. & C. Charriaut. 1983. Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. *Ann. Rech. Vet.* 14: 311-318.

Edmonds, M.D., A. Cloeckert, N. J. Booth, W. T. Fulton, S. D. Hagius, J. V. Walker, and P. H. Elzer. 2001. Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 62:1461–1466.

- Edmonds, M.D., A. Cloeckaert & P. H. Elzer. 2002. *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.* 88: 205-221.
- Foster, G., B.S. Osterman, J. Godfroid, I. Jacques & A. Cloeckaert. 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2688-2693.
- Gober, J. W., & L. Shapiro. 1992. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3 enhancer and IHF binding elements. *Mol. Biol. Cell* 3:913–926.
- Godfroid, J., A. Cloeckaert, J.P. Liautard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravens, B. Garin-Bastuji & J.J. Letesson. 2005. From the discovery of the Malta fever's agents to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* 36: 313-326.
- Gorvel, G.P. & E. Moreno. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* 90: 281-297.
- Guzmán-Verri, C., L. Manterola, A. Sola-Landa, A. Parra, A. Cloeckaert, J. Garin, J.P. Gorvel, I. Moriyon, E. Moreno & I. Lopez-Goni. 2002. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer

membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 12375-12380.

Hartl, D. L. & E. W. Jones. 2005. Essentials genetics. 6th. ed. Jones and Bartlett, United States.

Hook-Barnard, I., X. B. Johnson & D. M. Hinton. 2006. *Escherichia coli* RNA polymerase recognition of a  $\sigma 70$ -dependent promoter requiring a -35 DNA element and extended -10 TGn motif. J. Bacteriol. 24: 8352-8359.

Jiménez, L.F. & H. Merchant. 2003. Biología celular y molecular. 1 era. ed. Pearson Education, Mex.

Jubier-Maurin, V., R.A. Boigegrain, A. Cloeckert, A. Gross, M.T. Álvarez-Martínez, A. Terraza, J. Liautard, S. Kohler, B. Rouot, J. Dornand & J.P. Liautard. 2001. Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of humans. Infec. Immun. 69: 4823-4830.

Ko, J. & G.A. Splitter. 2003. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Clin. Microbiol. Rev. 16: 65-78.

Lloyd, G., P. Landini & S. Busby. 2001. Activation and repression of transcription initiation in bacteria. Essays Biochem. 37: 17-31.

- Maniatis, T., E.F. Fritsch & J. Sambrook. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Manterola, L. 2004. Caracterización del sistema regulador de dos componentes BvrR/BvrS de *Brucella abortus*. Tesis doctoral. Universidad de Navarra. España.
- Manterola, L., C. Guzmán-Verri, E. Chaves-Olarte, E. Barquero-Calvo, M.J. De Miguel, I. Moriyón, M.J. Grilló, I. López-Goñi & E. Moreno. 2007. BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infect Immun.* 75: 4867-74.
- McDonald, W. L., R. Jamaludin, G. Mackereth, M. Hansen, S. Humphrey, P. Short, T. Taylor, J. Swingle, C.E. Dawson, A.M. Whatmore, E. Stubberfield, L.L. Perrett & G. Simmons. 2006. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4363-4370.
- Memish, Z.A. & H. Balkhy. 2004. Brucellosis and International Travel. *J. Travel Med.* 11: 49-55.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- Mizuno, T. & I. Tanaka. 1997. Structure of the DNA-binding domain of the OmpR family of response regulators. *Mol. Microbiol.* 24: 665-667
- Moreno, E. 2002. Brucellosis in Central America. *Vet. Microbiol.* 90: 31-38.
- Moreno, E. & I. Moriyón. 2006. The genus *Brucella*. p.315-456. *In* M. Dorkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The prokaryotes*. Vol. 5. Springer-Verlag, New York, US.
- Moriyón, I. & I. López-Goñi. 1998. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int. Microbiol.* 1: 19-26.
- Nelson, D.L. & M.M. Cox. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3era. ed. Worth, New York.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2009. Boletín epidemiológico: definición de caso brucelosis [en línea]. [http://www.who.int/zoonoses/neglected\\_zoonotic\\_diseases/en/index.html](http://www.who.int/zoonoses/neglected_zoonotic_diseases/en/index.html) (Consulta: 31 jul. 2009).
- Salhi, I., R.A. Boigegrain, J. Machold, C. Weise, A. Cloeckert & B. Rouot. 2003. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infect. Immun.* 71: 4326-4332.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Sangari, F. & J. Agüero. 1991. Mutagénesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microb. Pathogen*. 11: 443-446.
- Scholz, H.C., K. Nöckler, C. Göllner, P. Bahn, G. Vergnaud, H. Tomaso, S. Al Dahouk, P. Kämpfer, A. Cloeckert, M. Maquart, M. S. Zygmunt, A. M. Whatmore, M. Pfeffer, B. Huber, H.-J. Busse & B.K. De. 2010. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 801-808.
- Scholz, H.C., Z. Hubalek, I. Sedláček, G. Vergnaud, H. Tomaso, S. Al Dahouk, F. Melzer, P. Kämpfer, H. Neubauer, A. Cloeckert, M. Maquart, M.S. Zygmunt, A.M.Whatmore, E. Falsen, P. Bahn, C. Göllner, M. Pfeffer, B. Huber, H.J. Busse & K. Nöckler. 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 375-382.
- Sola-Landa A., J. Pizarro-Cerdá, M. J. Grilló, E. Moreno, I. Moriyon, J. M. Blasco, J. P. Gorvel & I. López Goñi. 1998. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.* 29: 125-138

- Songer, J.G. & K.W. Post. 2005. Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri.
- Verstrete, D.R., M.T. Creasy, N.T. Caveney, C.L. Baldwin, M.W. Blab & A.J. Winter. 1982. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. Infect Immun. 35: 979-989.
- Viadas, C., M.C. Rodríguez, F.J. Sangari, J.-P. Gorvel, J.M. García-Lobo & I. López-Goñi. 2010. Transcriptome Analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS Two-Component Regulatory System. PLoS ONE. 5: 10216-10371.
- Wagner, R. 2000. Transcription regulation in prokaryotes. 1st ed. Oxford University Press, New York.