



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de
la Facultad de Ciencias Exactas

“Desarrollo, caracterización y
producción a escala piloto de
agonistas de la respuesta inmune
innata con potencial aplicación como
adyuvantes”

Lic. Yanina Hiriart

Director: Dr. Martín Rumbo

2013

El presente trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Martin Rumbo en el Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

La Plata, Agosto 2013

Agradecimientos

Durante esta etapa estuve acompañada por personas que, de maneras diversas, han contribuido a mi crecimiento personal y profesional. Quisiera dedicar unas líneas para agradecerles.

- Para comenzar quiero agradecer a Martín, mi Director, por haberme guiado en estos años de formación y darme las herramientas para que emprenda un nuevo camino.
- A todos y cada uno de los Lisinos, a los que ya no forman parte del lab pero me acompañaron en los primeros pasos, a los que estuvieron mientras estuve...y compartimos todo!!! Nico, Belu, Dave, Juancito, Pao, Coqui, Romi A., Costy, Lu, Rodri, Rena, Fer, Florcita, Lore, Martín C.: Gracias por el día a día, los mates, las risas, los consejos... y todas esas pequeñas grandes cosas que hacen del LISIN un lugar de trabajo hermoso.
- A Paula, Andrés y todos los chicos del 304 de la FIL, por recibirme gratamente y ayudarme en todo.
- A Agus, Romi C., Loli y Gri, gracias por tantas charlas compartidas, por prestarme la oreja y aconsejarme en más de una oportunidad.
- A mis amigas Lau M., Guille, Ro y Lau R. por compartir tantos momentos, por saber que están ahí cuando las necesito...
- A mi familia, porque mis angustias son sus tristezas y mis alegrías son su felicidad...
- Y finalmente a Diego, mi compañero de ruta, gracias amor por ser mi cable a tierra, por tu paciencia, por tu compañerismo, gracias por todos nuestros proyectos y por elegirme todos los días.

ÍNDICE

Índice

Introducción	1
El impacto de las enfermedades infecciosas sobre la actividad humana.....	2
La plaga de atenas: el fin de la época de oro de Grecia	3
La peste negra	3
Encuentro de dos mundos: el intercambio de enfermedades infecciosas.....	3
Una enfermedad que se renueva: La gripe.....	4
Las vacunas, un aliado en la lucha contra las enfermedades infecciosas.....	6
Estrategias para la producción de vacunas	7
Vacunas atenuadas	7
Vacunas inactivadas	8
Nuevas metodologías al servicio de la vacunología.....	9
Rol de la respuesta inmune en la prevención de infecciones.....	10
Adyuvantes.....	13
Agonistas de receptores tipo toll	18
Agonistas TLR como adyuvantes.....	22
En la búsqueda de la respuesta adecuada: combinaciones de agonistas TLR	24
Objetivos y resumen del trabajo.....	26
Resultados y discusión	27
Capítulo 1	
Flagelina como agonista de la inmunidad innata.....	28
Introducción	29
Resultados y discusión	33
I.I.I Análisis transcripcional de la respuesta desencadenada por la administración de flagelina	33

Índice

I.I.II Análisis de la capacidad adyuvante de flagelina administrada a través de diferentes vías	37
I.II Optimización de un protocolo para purificar flagelina a escala piloto	39
I.II.I Determinación de la condición de cultivo.....	39
I.II.II Selección de un método de procesamiento para grandes volúmenes de cultivo	42
I.II.III Detoxificación	50
I.III Desarrollo de anticuerpos monoclonales anti-flagelina: herramientas útiles para su producción y estudio	54
I.III.I Caracterización de los anticuerpos monoclonales	55
I.III.II Posibles aplicaciones en serotipificación	59
I.III.III Detoxificación de flagelina mediante cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales anti-flagelina.....	65
I.III.IV Evaluación de la estabilidad de flagelina en distintas condiciones de almacenamiento	67
Conclusiones	69

Capítulo 2

Generación y caracterización de una proteína de fusión entre dos agonistas de TLR: FliC y BLS..... 71

Introducción.....	72
Resultados y discusión.....	75
II.I Estrategia de obtención de la quimera FliC-BLS	75
II.II Obtención y caracterización de la proteína recombinante FliC-BLS.....	78
II.III Purificación de la quimera FliC-BLS utilizando cromatografía de afinidad..	80
II.IV Evaluación de la estabilidad de FliC-BLS purificada por cromatografía de afinidad	81

Índice

II.V Caracterización estructural de FliC-BLS	83
II.VI Caracterización de la capacidad de FliC-BLS como agonista de TLR-4/TLR-5	86
Conclusiones.....	92
Discusión General.....	93
Conclusiones Generales y Perspectivas	100
Materiales y Métodos	104
I. Cepas	105
II. Obtención de flagelinas de distintos microorganismos.....	105
III. Condiciones de cultivo y protocolo de purificación de flagelina a gran escala	106
IV. SDS-PAGE y Western Blot.....	107
V. Análisis por MALDI-TOF	107
VI. Detoxificación de las muestras.....	108
VII. Test de pirogenicidad en conejos	108
VIII. Control de actividad biológica	108
IX. Análisis de la actividad biológica <i>in vitro</i>	109
X. Análisis de actividad biológica <i>in vivo</i>	109
XI. Análisis de la expresión diferencial de genes mediante qPCR	109
XII. Ensayos de adyuvancia	110
XIII. Ensayos de estabilidad	110
XIV. Producción de anticuerpos monoclonales.....	111
XV. Purificación de anticuerpos monoclonales anti-flagelina.....	111
XVI. Cromatografía de afinidad utilizando el anticuerpo anti-FliC 2B3C5	112

Índice

XVII. Conjugación de los anticuerpos con Biotina.....	112
XVIII. ELISA	113
XIX. Ensayos de aglutinación.....	113
XIX.I Tinción de <i>Salmonella</i> con carboxifluoresceína diacetato succinimidyl ester (CFSE).....	115
XX. Estrategia de obtención de la quimera FliC-BLS	115
XXI. Producción y caracterización de las quimeras	117
XXII. Caracterización estructural de FliC-BLS	117
XXII.I Análisis por difracción circular	117
XXII.II Modelado estructural	118
XXIII. Obtención de células del espacio bronquioalveolar y peritoneo	118
XXIV. Análisis y cuantificación de células reclutadas al espacio bronquioalveolar y cavidad peritoneal	118
XXV. Actividad biológica de la FliC-BLS sobre un cultivo enriquecido en células adherentes de bazo	119
XXVI. Análisis estadístico	119
Bibliografía.....	120

INTRODUCCIÓN GENERAL

EL IMPACTO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS SOBRE LA ACTIVIDAD HUMANA

Distintas formas de vida han desarrollado estrategias de autopropagación en base a la sofisticación de mecanismos de provisión de materia y energía que los haga competitivos en un ecosistema determinado. En particular muchas formas de vida han desarrollado estrategias de parasitismo que han permitido su subsistencia a partir de su relación con otras especies que actúan como medio de sustento de las especies parásitas. Entre estos, encontramos organismos que han desarrollado la capacidad de autopropagarse utilizando a la especie humana como blanco. Un subgrupo de estas especies son las causantes de las enfermedades infecciosas, las que tienen un impacto significativo sobre la vida humana, ya sea por la posibilidad de causar la muerte o por originar estados de discapacidad temporaria o permanente. A pesar de los avances logrados por el desarrollo de distintas actividades humanas, entre ellos el desarrollo de distintas estrategias médico-sanitarias, las infecciones continúan siendo la principal amenaza de la salud humana en la actualidad.

A lo largo de la historia existen distintos ejemplos del impacto que un determinado agente etiológico puede tener sobre la actividad humana. Estos eventos puntuales han tenido consecuencias que fueron más allá de la simple afección de una población e incluso han moldeado conductas y tenido influencia sobre el desarrollo geopolítico o económico del momento. A continuación se describen algunos eventos de infecciones causadas por agentes etiológicos definidos que han sido hechos históricos sobresalientes. Fueron seleccionados por considerarlos relevantes ya sea porque representan la primera epidemia de la cual se tiene registro como en el caso de la plaga de Atenas, azotaron el continente europeo durante siglos impidiendo el aumento de la población como sucedió con la peste negra, o surgieron como consecuencia de un hecho histórico, como la llegada de sífilis a Europa luego de la conquista del continente americano. Por último, la pandemia de gripe de 1918 fue seleccionada por el paralelismo presentado con la pandemia que debió superarse en 2009 lo que refleja el estado de alerta que debe mantenerse aunque se trate de patógenos conocidos.

LA PLAGA DE ATENAS: EL FIN DE LA ÉPOCA DE ORO DE GRECIA

La plaga de Atenas tuvo su desarrollo durante el período 430-426 AC. Esta fue la primera epidemia de la cual se tiene registro gracias al reporte de Tucídides, historiador griego que en su libro “Historia de la guerra peloponesa” narró detalladamente los signos, síntomas, curso clínico y complicaciones de la epidemia por la cual murió un tercio de la población de Atenas, incluyendo a su líder Pericles, lo que significó el fin de la Época de oro de Grecia. En base a la sintomatología descrita por Tucídides ha habido 2 diagnósticos principales para esta enfermedad: Fiebre tifoidea o gripe. En los últimos años diversos grupos de investigación han orientado sus esfuerzos a la determinación del agente causal de la Plaga de Atenas aunque, a pesar de esto, la enfermedad descrita por Tucídides sigue siendo una incógnita¹⁻³.

LA PESTE NEGRA

La peste negra en el siglo XIV causó 34 millones de muertes en Europa y 16 millones de muertes en Asia⁴; posiblemente alcanzó el Viejo Continente viajando a través de caravanas y rutas de comercio marítimo. Trabajos recientes presentan evidencia contundente que señala a *Yersinia pestis* como el agente causal de la epidemia^{5,6}. Este patógeno puede utilizar como reservorio a la pulga de rata oriental o rata negra la cual, como su nombre lo indica, es un parásito de la rata por lo que durante años se consideró a estos roedores como única fuente de contagio de la enfermedad. En 1985 Graham Twigg en su libro “La peste negra, una nueva evaluación biológica” propuso a la peste negra como una enfermedad contagiosa entre personas lo cual explica que se diseminara con la velocidad con que lo hizo. El surgimiento de una medida sanitaria drástica como la cuarentena en hospitales de Venecia fue la única solución efectiva encontrada por una sociedad donde los antibióticos y las vacunas eran recursos impensados.

ENCUENTRO DE DOS MUNDOS: EL INTERCAMBIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Otros ejemplos de infecciones masivas pueden mencionarse como producto de la llegada de Cristóbal Colón a América⁷. Esto significó el encuentro de dos ecosistemas que hasta el momento se habían desarrollado independientemente (a través del intercambio

de personas, animales y plantas) lo que desencadenó consecuencias catastróficas. Las enfermedades infecciosas tuvieron un papel fundamental en el éxito alcanzado por unos pocos hombres sobre grandes civilizaciones organizadas como los Imperios Azteca e Inca. Enfermedades como la viruela, la malaria y la gripe produjeron la muerte de millones de indígenas que no presentaban inmunidad frente a estas enfermedades desconocidas. Pero el intercambio no fue unidireccional, al regreso de Colón al Viejo Continente una nueva enfermedad se propagó rápidamente desde el puerto de Nápoles generando una pandemia que azotó a Europa durante años: la sífilis. Mucho tiempo pasó desde que se estableció una conexión entre el viaje de Colón a América y la aparición de sífilis en Europa, lo cual ha propiciado varias hipótesis respecto del origen de la enfermedad. Mucha discusión se ha generado respecto de si la sífilis era una enfermedad americana o ya estaba presente en Europa antes de la Conquista. La sífilis es causada por la bacteria *Treponema pallidum* y provoca daños típicos en los huesos que pueden ser utilizados para su identificación. El análisis de esqueletos americanos de la época precolombina reveló la presencia de dichas marcas, que no han sido encontradas en esqueletos europeos de la misma época^{8,9}, por lo que el debate respecto del origen de la sífilis parece ser un caso cerrado.

UNA ENFERMEDAD QUE SE RENUEVA: LA GRIPE

Las muertes provocadas por la gripe española en 1918 se estiman en 50 millones de personas alrededor del mundo. Este brote presentó 3 picos a lo largo de un año lo que significó una novedad debido a la aparición de gripe fuera de estación. En 1995 un equipo de científicos realizó el secuenciamiento del RNA del virus a partir de muestras de tejido proveniente de autopsias de víctimas del segundo pico presentado. Esto permitió determinar que el virus responsable de la pandemia de 1918 antecede a todos los subtipos de gripe humana y porcina conocidos, el H1N1 y el H3N2 e inclusive al desaparecido H2N2¹⁰. Durante todos los brotes que ha presentado a través de la historia, la gripe se ha caracterizado por presentar mayor mortalidad entre niños y ancianos. Llamativamente, el brote de 1918 generó principalmente la muerte de adultos jóvenes entre 20 y 40 años.

Si no se hubiera mencionado la época de este episodio, la descripción nos situaría rápidamente en la epidemia a la que nos vimos expuestos en el año 2009. La similitud de los hechos pone en evidencia la importancia de conocer el origen y la evolución de las enfermedades a las que hemos estado expuestos, entender el contexto en que aparecieron como así también la efectividad de las medidas sanitarias adoptadas en cada caso. Esto nos permite controlarlas, ya sea tomando los recaudos necesarios para impedir que resurjan como así también sabiendo cómo actuar en caso de que lo hagan.

El primer estudio realizado a nivel mundial para caracterizar el impacto global de las enfermedades fue realizado por la Organización Mundial de la Salud durante la década de 1990 (www.who.int/entity/healthinfo/global_burden_disease). El estudio desarrolló distintos tipos de indicadores para medir el impacto de las afecciones de la salud, entre ellos el concepto de DALYS (Disability-Adjusted Life Year), como medida del impacto global de una situación. En particular los DALYs se calculan considerando la incidencia de una determinada patología y asignándole un coeficiente entre 0 y 1 dependiendo del tipo de impacto que cause y si este es permanente o transitorio. El estudio desglosa distinto tipo de afecciones de salud por sexo, edad y región del planeta. Como resultado global se determinó que un 43% de las afecciones de salud humana son causadas por agentes infecciosos. La última actualización de estos estudios, publicada en el año 2008 indica una situación parecida, siendo las enfermedades infecciosas en su conjunto la primer causa de mortalidad a nivel mundial, representando la causa primaria de muerte en un 17% de los casos y siendo responsables del 17% de los DALYs a nivel global (<http://www.who.int/healthinfo/globalburdendisease/GBDreport2004updatefull.pdf>). Una conclusión de estos estudios es que si bien las enfermedades infecciosas en su conjunto representan el principal factor causante de enfermedades a nivel mundial, un grupo relativamente acotado de agentes etiológicos son los responsables de gran parte del impacto de las enfermedades infecciosas en la actualidad.

Distintos factores inciden en el desarrollo de una enfermedad infecciosa, entre los cuales podemos enunciar los siguientes:

- Susceptibilidad individual a determinadas infecciones
- Cambios en los microorganismos y adaptación a nuevos huéspedes

- Ausencia de medidas de salud pública
- Pobreza y desigualdad social/ Guerra y hambre
- Alteración de los ecosistemas/ Desarrollo económico y explotación del suelo/ Tecnología e industria/ Cambio climático
- Globalización (comercio, turismo)

Como se puede ver, existen factores biológicos directamente asociados a la relación huésped/patógeno los cuales a su vez están influidos por otros factores a nivel ecológico y por actividades directamente relacionadas con la actividad humana en planos más amplios.

Independientemente del desencadenante, las enfermedades infecciosas representan un problema para el hombre ya que, cuando aparecen, generan desequilibrios sanitarios, sociales y económicos. Las consecuencias ocasionadas pueden ser de lo más variadas en su magnitud y complejidad, significando simplemente la pérdida de algunos días de trabajo o, en los casos más extremos, la muerte.

LAS VACUNAS, UN ALIADO EN LA LUCHA CONTRA LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Diversas enfermedades infecciosas han afectado al hombre a lo largo de la historia. Sin dudas la invención de las vacunas significó una de las más relevantes intervenciones de la medicina moderna que ha permitido mantener bajo control muchas enfermedades infecciosas o inclusive erradicarlas. El impacto de las vacunas en la distribución global de enfermedades está documentado a lo largo de distintos estudios epidemiológicos realizados en el siglo XX¹¹, resultando en la distribución actual de patologías infecciosas mencionada previamente.

El éxito de la implementación de medidas de salud pública se basa, no solo en la selección de vacunas efectivas, sino también en la articulación de infraestructura para la producción y distribución de las mismas con medidas regulatorias que garanticen su seguridad. Las vacunas son la herramienta más utilizada y con la mejor relación costo/beneficio para disminuir la morbilidad y la mortalidad asociada a enfermedades infecciosas, generando a su vez un impacto económico positivo.

La historia de la vacunología tuvo su origen en el año 1776 cuando Edward Jenner notó que las personas con estrecho contacto con el ganado vacuno no presentaban signos de afección por viruela, por lo que supuso que la viruela bovina confería protección frente a la viruela humana. Así fue como estableció el nacimiento de la vacunología al inyectar a un joven con virus obtenido de las lesiones presentadas por una mujer que había sido contagiada accidentalmente por una vaca. El joven resultó ser inmune a posteriores desafíos con viruela por lo que, en 1778, Jenner postuló que el uso sistemático de la “vacuna” (término incorporado años más tarde por Pasteur) permitiría la erradicación de la enfermedad. El camino iniciado por Jenner se completó cuando, el 9 de diciembre de 1979, la Organización Mundial de la Salud anunciaba que la viruela había sido eliminada gracias a la utilización de una herramienta desarrollada 200 años atrás¹².

En 1880 otro avance en la historia de la vacunación llegaría de la mano de Louis Pasteur mientras estudiaba el cólera en gallinas. Al regreso de unas vacaciones, Pasteur inoculó un grupo de gallinas con un cultivo de *Pasteurella multocida* que había olvidado sobre la mesada y los animales no desarrollaron la enfermedad. Posteriormente inoculó el mismo grupo de gallinas con un cultivo fresco de la bacteria y nuevamente no presentaron síntomas de la enfermedad. En base a estas observaciones Pasteur construyó la hipótesis de que los microorganismos podían ser atenuados por la exposición a agentes adversos tales como temperatura, oxígeno y químicos¹³. Sus trabajos posteriores realizados con el virus de la rabia y el ántrax confirmaron su hipótesis.

ESTRATEGIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS

VACUNAS ATENUADAS

Como consecuencia del hallazgo de Pasteur, diversos métodos fueron utilizados para atenuar los microorganismos. De una manera totalmente empírica se logró obtener vacunas contra diversas enfermedades, algunas de las cuales se siguen utilizando. Calmette y Guérin lograron atenuar el bacilo *Mycobacterium bovis* mediante el pasaje a través de sucesivos cultivos en medio artificial, obteniendo un mutante que confiere inmunidad contra *Mycobacterium tuberculosis*¹⁴. De manera similar se logró inactivar el

virus de la fiebre amarilla mediante sucesivos pasajes en embriones de pollo. Hacia la mitad del siglo XX se adaptó el cultivo celular para el cultivo de virus, lo cual se aplicó rápidamente al desarrollo de vacunas. Así pudo lograrse la obtención de vacunas para prevenir la poliomielitis en la década del '50^{15,16}; el sarampión¹⁷, la rubeola¹⁸⁻²⁰ y las paperas²¹ en la década del '60; y la varicela en la década del '70²². En todos los casos la efectividad de las vacunas se infirió en base a su capacidad de estimular la producción de inmunoglobulinas, lo cual se correlaciona con el desarrollo de protección frente a los virus. El desafío consistía entonces, en producir virus menos reactogénicos pero que mantuvieran su inmunogenicidad. Una importante tecnología aplicable a virus de genoma segmentado fue la generación de diversidad a través del cultivo celular. El desarrollo de vacunas para la gripe y el rotavirus se ha basado en la mezcla de RNA de virus atenuados con segmentos de RNA que codifiquen para antígenos de cepas salvajes circulantes.

VACUNAS INACTIVADAS

Ante la posibilidad de que la forma atenuada del patógeno revierta a una versión más agresiva capaz de provocar enfermedad en un individuo sano vacunado, otra manera de producción fue desarrollada en paralelo a la producción de vacunas atenuadas, basada en la completa inactivación de los microorganismos. La producción de vacunas inactivadas también contó, al igual que las vacunas atenuadas, con diferentes estrategias que permitieron que se produjeran y testearan vacunas contra la fiebre tifoidea, el cólera y la plaga. Las vacunas contra el tétanos y la difteria se produjeron en base a toxoides, toxinas inactivadas propias de los microorganismos²³.

Las vacunas atenuadas e inactivadas pertenecen al grupo de “vacunas de primera generación”. Dichas vacunas pueden presentar ciertos efectos adversos o “reacciones” entre las que se encuentran más frecuentemente dolor, enrojecimiento e inflamación en la zona de aplicación. Reacciones sistémicas como fiebre, malestar general y dolor de cabeza suelen ser atribuidas a la vacunación. Las reacciones más severas son muy raras y es difícil establecer una asociación entre una observación temporal con la vacunación como consecuencia de la misma. Efectos adversos atribuidos a las vacunas pueden resultar de malas prácticas realizadas durante su producción^{24,25}.

De cualquier manera, el desarrollo de nuevas tecnologías abrió paso a la producción de *vacunas de segunda generación*, tendientes a incrementar la seguridad de las vacunas disminuyendo los efectos adversos asociados a ellas.

NUEVAS METODOLOGÍAS AL SERVICIO DE LA VACUNOLOGIA

Muy alejada de la manera empírica con la que Jenner implementó la primera vacuna contra la viruela, la vacunología moderna está orientada a diseñar vacunas sintéticas de composición conocida. Se pretende seleccionar racionalmente componentes de los microorganismos que simulen la infección del huésped, sin desarrollar enfermedad, desencadenando una inmunidad forzada que le confiera protección frente a futuras infecciones²⁶. De esta manera se busca entonces disminuir la reactogenicidad de las vacunas obtenidas a base del microorganismo completo, algunas de las cuales se siguen utilizando, diseñando vacunas a base de subunidades que presenten el equilibrio adecuado entre reactogenicidad e inmunogenicidad. Para lograr este objetivo es necesario el conocimiento de aquellos componentes del microorganismo que resulten inmunogénicos y permitan el establecimiento de una respuesta adecuada que resulte protectora frente a futuras exposiciones al patógeno.

La selección de moléculas conservadas en los patógenos, de manera de desarrollar vacunas que resulten efectivas contra distintas cepas bacterianas o virales resulta un desafío. En tal sentido, la posibilidad de secuenciar los genomas microbianos ha permitido seleccionar potenciales antígenos protectores. Gracias a los avances en ingeniería genética y biología molecular de las últimas décadas, se han podido seleccionar componentes de los microorganismos que cumplan con los requerimientos mencionados mediante “vacunología reversa”^{27,28}. Esta técnica consiste en realizar un análisis *in silico* de antígenos, seleccionando aquellos genes que codifiquen para potenciales candidatos vacunales de interés como: proteínas secretadas, lipoproteínas, proteínas de membrana externa o proteínas expresadas por el patógeno durante la infección; expresar la secuencia de nucleótidos de interés y utilizar la proteína resultante como vacuna en un modelo adecuado. El uso de esta metodología permitió la obtención de nuevos candidatos vacunales para el desarrollo de vacunas contra meningococos del grupo B²⁹. De manera similar, técnicas de análisis genómico tales como estudios con microarreglos

de ADN o más recientemente técnicas de secuenciamiento masivo permiten determinar qué factores del microorganismo están expresados durante la infección y así, utilizar estos posibles factores de virulencia en esquemas de inmunización.

El avance de la ingeniería genética permitió utilizar bacterias, levaduras, células animales y células de insectos como sistemas para la producción de inmunógenos. El primer logro de esta tecnología fue la vacuna contra el virus de la hepatitis B a base de la proteína S recombinante producida en levadura³⁰; esto permitió el reemplazo de la vacuna basada en proteína S purificada a partir de plasma de personas infectadas, con el riesgo obvio que esto implicaba³¹. Con estrategias similares fueron obtenidas otras proteínas recombinantes como Lyme OspA³², citomegalovirus gB³³ y la toxina pertussis³⁴ factibles de ser utilizadas como vacunas.

Otra estrategia aprovecha la ventaja de que la producción de algunas partículas virales *in vitro* resulta en el ensamble de estructuras que se parecen al virus denominadas “virus-like particles” (VLP). Las partículas presentan mayor inmunogenicidad que las proteínas solubles pero carecen del material genético del virus necesario para infectar y producir enfermedad³⁵. Esta tecnología ha permitido el desarrollo de vacunas contra el virus del papiloma humano mediante la generación de partículas cubiertas por la proteína L1 de serotipos oncogénicos³⁶.

ROL DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA PREVENCIÓN DE INFECCIONES

Como se mencionó anteriormente, para determinar cuáles son los actores principales en el desarrollo de la enfermedad es necesario entender la patogénesis del microorganismo en cuestión y la respuesta inmune desencadenada frente a él. La comprensión de los mecanismos efectores intervinientes en la defensa del hospedador resulta clave para el desarrollo de vacunas exitosas.

Frente a una infección pueden desarrollarse dos grandes tipos de respuesta de memoria: respuesta humoral, mediada por células B y/o respuesta celular, mediada por células T en los órganos linfoides secundarios, que sufren una rápida expansión clonal ante un encuentro con el antígeno para diferenciarse en células efectoras y de memoria.

Se cree que la mayoría de las vacunas que han resultado exitosas hasta el momento confieren protección mediante la generación de anticuerpos neutralizantes³⁷. De esta manera, la presencia de anticuerpos se correlaciona con protección frente a distintos virus de circulación en sangre como el de la Hepatitis o el de la Fiebre amarilla, virus que infectan a través de vías mucosales como el de la Gripe, o a distintas bacterias secretoras de toxinas como las causantes de Difteria y Tétanos³⁸. Sin embargo para muchas vacunas la determinación de la calidad de los anticuerpos inducidos resulta un problema. Al momento de analizar la eficacia de una vacuna, de todo el panel de anticuerpos capaces de unir al antígeno, tal vez solo una porción resulte capaz de neutralizar al patógeno *in vitro*, mientras que otros subgrupos podrían mediar otras funciones efectoras.

Más allá de la importancia de los anticuerpos, la respuesta de células T ha resultado tener un papel muy relevante en muchas patologías. La persistencia de células T específicas para varicela inducida por vacunación con el virus de la varicela se utiliza como correlato de protección frente a la infección y reactivación de la enfermedad bajo la forma de herpes zoster en niños y ancianos^{39,40}. Por otro lado, el título de anticuerpos inducido luego de la vacunación contra la gripe resulta poco confiable para predecir el riesgo de infección en ancianos, mientras que se ha demostrado una correlación inversa entre la magnitud de la respuesta de células T específicas del virus y el riesgo de contraer gripe⁴¹.

En los últimos años ha surgido evidencia del rol clave de la inmunidad innata en la articulación de la respuesta adaptativa ya sea regulando la magnitud, calidad y persistencia de la respuesta de anticuerpos, como así también la respuesta de células T de memoria^{42,43}.

La inmunidad innata incluye células capaces de captar antígenos de los patógenos y presentarlos a las células T para montar una respuesta adecuada. Entre las células presentadoras de antígenos se destacan las células dendríticas (CD)⁴⁴. Luego del encuentro con la CD, las células T CD4+ pueden expandirse y diferenciarse en distintos tipos de células T colaboradoras (Th del inglés T_{helper}) Th1, Th2, Th17, Th21, Th foliculares, Th22 o Th9, que desempeñan distintas funciones efectoras que median la protección frente a diferentes patógenos. Así, una infección por patógenos intracelulares requiere de linfocitos T citotóxicos dirigidos por células Th1 que se encarguen de remover las

células del huésped infectadas, mientras que infecciones por parásitos y hongos son mejor controladas por respuestas Th2 y Th17 respectivamente. En el curso de una respuesta de anticuerpos, las células T colaboradoras específicas de antígeno son esenciales para la inducción de anticuerpos de alta afinidad y una respuesta inmune de memoria. Por su parte, las células T CD8+ en reposo pueden diferenciarse en células efectoras que circulan o residen en los tejidos, entre ellos las mucosas, confiriendo protección contra una infección en el sitio de entrada del patógeno. Como un gran número de las infecciones ocurre por transmisión a través de las mucosas, una vacuna capaz de producir una respuesta de memoria a base de células T CD8+ que migren rápidamente o residan en el sitio de entrada del patógeno podría brindar protección⁴⁵.

Los mecanismos de respuesta protectora varían ampliamente dependiendo de la infección en cuestión, por lo que entendiendo cómo el sistema inmune responde frente a un microorganismo podría determinarse qué respuesta se requiere para conferir protección y con qué componentes debe contar una vacuna a subunidades para que resulte exitosa (**Tabla 1**).

Tabla 1: Se detalla una lista de patógenos, la respuesta inmune requerida para una efectiva protección y los antígenos que podrían utilizarse en el desarrollo de vacunas. Adaptado de “Principles of vaccine design-lessons from nature” ⁴⁶Vaccine, Vol. 28 Sup. 3 (2010)

Patógeno	Respuesta inmune requerida	Tipo de antígeno seleccionado para vacuna
Bacteria encapsulada	Células B y T	Polisacáridos de superficie conjugados a un carrier
Virus de Hepatitis B	Células B y T	Proteína de ciclo viral
Virus Herpes Simplex	Células B y T	Proteína viral de superficie
Virus de Inmunodeficiencia humana	Células B, Células T CD4 y CD8	Diferentes proteínas combinadas
Virus de papiloma humano	Células B y T	Proteína viral de superficie
Influenza	Células B y T	Proteína viral de superficie
Micobacteria	Linfocitos T citotóxicos, células T CD8	Proteína de fase virulenta
<i>Plasmodium</i>	Células B y T, linfocitos citotóxicos	Proteína de superficie y proteína de fase virulenta

Las vacunas exitosas generan efectores de la respuesta inmune que resultan capaces de controlar la enfermedad, pudiendo requerirse anticuerpos neutralizantes⁴⁷, una efectiva respuesta de células T⁴⁸ o posiblemente una combinación de ambas,

dependiendo del tipo de agente infeccioso en cuestión. La identificación de antígenos adecuados se relaciona con el tipo de respuesta requerida, por ejemplo, si se necesita protección mediada por anticuerpos neutralizantes usualmente resulta adecuada la selección de un antígeno de superficie como se hizo para la vacuna contra el virus de la hepatitis B, o de una toxina secretada como en el caso del tétanos o la difteria. De esta manera, la vacuna para la hepatitis B induce tanto anticuerpos como una respuesta de células T específicas de antígeno⁴⁹, la vacuna contra *Bordetella pertussis* induce anticuerpos y estimula a las células T colaboradoras a producir interferón⁵⁰ y la vacuna para la Hepatitis A posiblemente estimule respuesta humoral y celular⁴⁶. Mientras que la protección inducida por la vacuna simula la respuesta inducida por una infección, en algunos casos la respuesta inmune inducida por la vacuna puede superar a la observada luego de una infección, tal como sucedió con la vacuna para el virus del papiloma humano generada a partir de partículas virales L1⁵¹. Esto podría deberse a la dosis de antígeno administrado con la vacuna y al hecho de que durante la infección ciertas proteínas del virus son expresadas exclusivamente en células epiteliales diferenciadas que se encuentran distantes de los sitios de activa vigilancia inmune⁵².

Desafortunadamente, esta no es la observación habitual. Generalmente, las vacunas producidas a partir de subunidades resultan menos reactogénicas que su contraparte convencional producida con el microorganismo completo, pero este beneficio viene acompañado de una disminución en su inmunogenicidad. En estos casos se han desarrollado distintas alternativas para aumentar la respuesta inmune generada. Globalmente, estas alternativas consisten en la incorporación de adyuvantes en la formulación vacunal.

ADYUVANTES

El término adyuvante deriva del latín *adyuvare* que significa ayudar. Usualmente se hace referencia a los adyuvantes como compuestos que pueden incrementar y/o modular la inmunogenicidad intrínseca de un antígeno. Los adyuvantes deben cumplir esta función con un mínimo de toxicidad asociada y generando una mínima respuesta inmune contra sí mismo. La idea de que algunas sustancias podían mejorar la respuesta inmune tuvo su origen en las observaciones de William Coley, quien ya en el año 1893 utilizó

derivados de bacterias para tratar a pacientes con cáncer. Más tarde Ramon y Glennly utilizaron sustancias poco habituales como tapioca (harina de mandioca) e hidróxido de aluminio para aumentar la respuesta inmune a toxoides tetánico o diftérico en caballos y cobayos⁵³.

A pesar de establecerse su utilidad como adyuvante de manera empírica, las sales de aluminio han sido por años el único adyuvante licenciado para uso en humanos de manera segura. Inicialmente se las utilizó en combinación con toxoide tetánico para proteger contra *Clostridium tetani* y con toxoide diftérico como vacuna para *Corynebacterium diphtheriae*; hoy en día se las utiliza como componente de vacunas diseñadas a base de subunidades como la del virus de hepatitis B o el virus de papiloma humano como así también en vacunas inactivadas como la del virus de la poliomielitis.

Para comprender como un adyuvante puede aumentar y/o manipular la respuesta inmune contra un antígeno se debe recapitular la dinámica de establecimiento de la respuesta inmune.

Se puede conceptualizar al sistema inmune como un sistema al que contribuyen dos componentes principales: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa o adquirida. Hasta hace poco tiempo se consideraba que la inmunidad innata era simplemente la primera línea de defensa del sistema inmune, proveyendo señales de inflamación temprana y actividad microbicida inespecífica que servían para ganar tiempo hasta que la respuesta inmune adaptativa se desarrolle. Sin embargo, hoy está claro que existe una profunda interrelación entre ambos mecanismos, resultando determinantes las señales generadas durante la activación de la respuesta innata para el tipo de respuesta adaptativa resultante⁵⁴. La activación de la inmunidad innata ocurre mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por parte de los receptores de reconocimiento de patrón (PRR). Estos receptores son codificados por distintos genes de línea germinal que tienen la capacidad de reconocer distintas estructuras presentes en microorganismos y desencadenar una respuesta caracterizada por la producción de efectores antimicrobianos y distintos factores como citoquinas y quimoquinas con capacidad para orquestar la respuesta inmune adaptativa. Los distintos (PRR) no sólo permiten detectar la presencia del agente microbiano sino también asociarlo a una categoría dada (virus, bacterias, hongos o parásitos) y generar una

respuesta inmune apropiada para su eliminación⁵⁵. Se han descrito varias familias de PRR que incluyen: los receptores tipo toll (TLRs), los receptores del tipo lectina C (C lectin like Receptor CLR), los receptores tipo NOD (NOD like receptor, NLR; NOD Nucleotide oligomerization Domain) y las helicasas tipo RIG (RIG like Receptor RLR)^{56,57}. Los TLRs y los CLRs se ubican en las membranas celulares y en el compartimento endosomal; mientras que los NLRs y las RLRs son sensores microbianos intracitosólicos. La generación de una respuesta inmune adaptativa a antígenos proteicos comienza con la endocitosis del mismo y su procesamiento a cargo de las células presentadoras de antígenos (CPA) **(Figura 1)**. La activación de los PRR (señal 0) presentes en las CPA resulta clave para la inducción de los procesos de presentación antigénica, inducción de señales de coestimulación y migración de las CPA. Entre estas CPA, las células dendríticas (CD) son centinelas clave gracias a su potencia para activar células T *naive*⁴⁴. Las CD se encuentran, entre otros lugares, en los sitios más comunes de vacunación como el tejido intramuscular o subcutáneo por lo que seguramente resulten de las primeras células en reconocer al antígeno. Luego de su captura, las CD procesan el antígeno en péptidos más pequeños, algunos de los cuales son unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) y transportados a la membrana celular. Luego de la migración de las CD a los ganglios el complejo péptido-MHC podrá ser presentado a aquellas células T que expresen el receptor de células T (TCR) capaz de reconocerlo, lo que se denomina como señal 1. Adicionalmente se requiere una señal co-estimuladora (señal 2) proveniente de la interacción de moléculas secretadas por la CPA con su correspondiente receptor sobre la célula T. Así, a través de interacciones ligando-receptor entre CD40-CD40L, CD80 y CD86 con CD28 se suministra la segunda señal necesaria para la activación de las células T. Como resultado se produce la expansión clonal de las células T y la expresión de varias citoquinas.

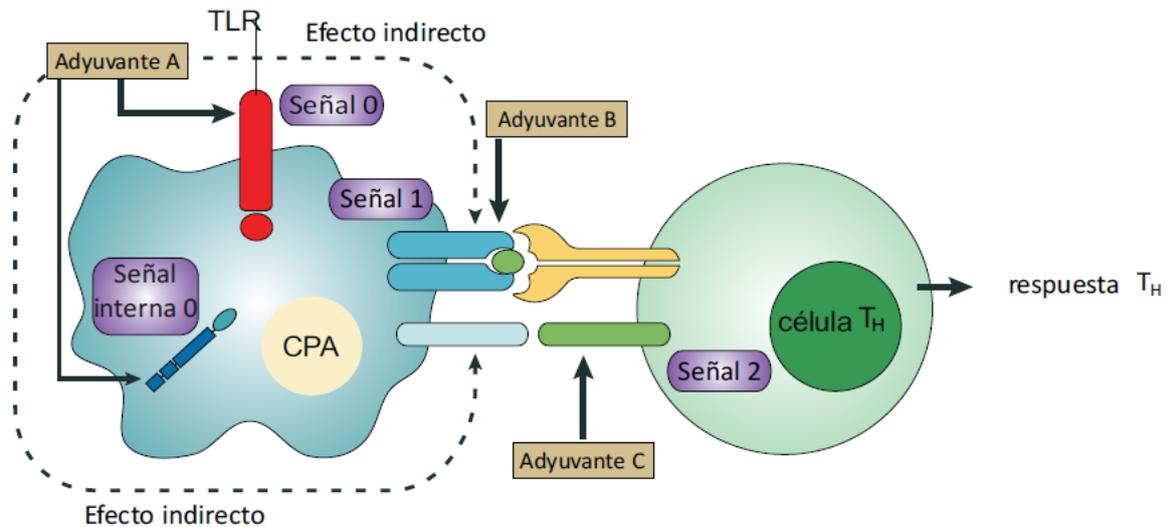


Figura 1: Inicio de la respuesta de células T colaboradoras. Se requieren 3 señales reconocidas como señal 0, señal 1 y señal 2. En teoría los adyuvantes pueden influenciar alguna o varias de estas señales de manera directa o indirecta aumentando su intensidad. Adaptado de “The perfect mix: Recent progress in adjuvant research” *Nature Reviews. Microbiology*, Vol 5, 2007.

Sin la señal 2 las células se vuelven anérgicas e incapaces de responder al antígeno. Finalmente la señal 3 podría definirse como el panel de citoquinas expresado por las CD y/u otras células del entorno tisular, lo que definirá el perfil de respuesta T generado⁵⁹. Como se mencionó anteriormente, luego de su encuentro con una célula dendrítica las células T colaboradoras (T helper) pueden dividirse en subgrupos denominados Th1, Th2, Th17 entre otros. La producción de interleuquina (IL) 12 por parte de las células dendríticas genera células T productoras de interferón γ y una polarización Th1 de la respuesta que puede mediar la erradicación de patógenos intracelulares. De igual manera, la secreción de IL-1, IL-6 e IL-23 promueve la polarización hacia una respuesta Th17, caracterizada por la liberación de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22⁶⁰. La respuesta Th17 cumple una importante función en la protección contra bacterias extracelulares⁶¹.

Las señales que dirigen la polarización hacia una respuesta Th2 no han sido claramente establecidas pero esta respuesta está caracterizada por la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13. Todas estas respuestas efectoras pueden ser moduladas por células T regulatorias (Treg) mediante la secreción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β .

Los adyuvantes pueden influenciar una o más de las señales requeridas para el establecimiento de una respuesta T, de manera directa o indirecta. Entre los adyuvantes que influyen la señal 1 podemos mencionar aquellos que actúan como vehículo del antígeno. Ejemplo de ellos son las sales de aluminio y algunas emulsiones de agua y aceite, que por fenómenos físicos permitirían una presentación antigénica sostenida en el tiempo. Por otra parte, las sales de aluminio inducen un perfil de respuesta Th2 generando una respuesta de memoria fundamentalmente mediada por células B, responsables de la generación de anticuerpos. Esto restringe el uso de las sales de aluminio a vacunas que requieran este tipo de respuesta, por lo que el desarrollo de adyuvantes novedosos que puedan utilizarse en vacunas que requieran respuesta celular resulta de fundamental importancia.

A menudo se utilizan erróneamente los términos adyuvante e inmunoestimulante como si fueran sinónimos. Un inmunoestimulante es un compuesto simple con actividad inmunoestimulante y/o inmunomoduladora intrínseca, mientras que los adyuvantes pueden tener más de un componente con distinta actividad o función entre los que podrían encontrarse moléculas inmunoestimulantes o inmunomoduladoras. Teniendo en cuenta esto, podría pensarse en generar combinaciones de sustancias que den origen a adyuvantes nuevos que puedan utilizarse en vacunas que requieran una respuesta inmune celular.

En los últimos años se avanzó en la caracterización de los ligandos microbianos (PAMPs) reconocidos por las distintas familias de receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs). Los PAMPs han sido postulados como adyuvantes en virtud de que actuarían como señal 0 (mencionada anteriormente) en el desarrollo de una respuesta T, además de influir sobre la señal 2 por inducir la expresión de moléculas co-estimuladoras en la célula presentadora de antígeno a cuyo receptor se hayan unido.

La familia de PRRs mejor caracterizada hasta el momento es la de los receptores tipo toll (TLRs). En vista a la importancia que reviste este tipo de receptores para el presente trabajo de tesis, en la sección siguiente se discutirán sus características fundamentales, con énfasis en aspectos que serán de interés para las actividades desarrolladas.

AGONISTAS DE RECEPTORES TIPO TOLL

Los TLRs, son proteínas transmembrana tipo-1 con un dominio extracelular rico en secuencias repetitivas de leucinas (LRR) encargado de la interacción con el PAMP y un dominio citosólico compartido con el receptor de IL-1, el dominio TIR, encargado de iniciar la transducción de señales. En su mayoría se expresan en forma de homodímeros aunque algunos receptores tienen la capacidad de actuar también como heterodímeros.

Hasta el presente, han sido descritos 12 TLR funcionales en ratones y 10 en humanos siendo, siendo del TLR-1 al TLR-9, conservados entre especies. Los receptores TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 y TLR-11 se expresan en la membrana celular y reconocen PAMPs presentes en la superficie de bacterias, hongos, virus y parásitos mientras que TLR-3, TLR-7, TLR-8 y TLR-9, que se expresan en vesículas endosomales y en el retículo endoplásmico, se caracterizan por reconocer principalmente ácidos nucleicos de distintos virus y bacterias^{56,62}.

TLR-2 y TLR-4 son importantes para la protección frente a infecciones bacterianas. TLR-2 reconoce bacterias gram positivas a través del componente estructural de su pared, el péptidoglicano⁶³. TLR-4 reconoce el lipopolisacárido que forma parte de la membrana externa de bacterias gram negativas través de un complejo junto a MD2^{64,65}.

TLR-2 ha sido implicado también en el reconocimiento de otros ligandos a través de la formación de heterodímeros. De esta manera, puede reconocer micobacterias a través de lipopéptidos diacilados por formación del heterodímero TLR-2/TLR-1 o bacterias gram negativas mediante la formación de TLR-2/TLR-6 que reconoce lipopéptidos triacilados⁶⁶. Así mismo, se ha reportado la mediación de TLR2 en el reconocimiento de micobacterias a través del lipoarabinomanano (LAM), y de hongos a través del zymosano⁶⁷. Además TLR-2 puede reconocer al virus de la viruela⁶⁸ y a la hemaglutinina del virus de las paperas, por lo que resulta relevante en el marco de infecciones por varios tipos de microorganismos.

Para TLR-4 también se han encontrado otros ligandos como ser la proteína de fusión del virus sincisial respiratorio⁶⁹, la pneumolisina de *S. pneumoniae*⁷⁰, y la lumazina sintasa de *Brucella spp.* (BLS)⁷¹ aunque la manera en que interactúan con el receptor así como las respuestas desencadenadas no han sido claramente establecidas. En particular

BLS resultará relevante para el desarrollo del presente trabajo. Algunas publicaciones sugieren además, que TLR-4 así como otros TLRs son capaces de interactuar con ligandos endógenos⁷².

TLR-5 por su parte, interviene en el reconocimiento de bacterias flageladas a través de la interacción con la flagelina, el monómero estructural de los flagelos presentes tanto en bacterias gram (+) como gram (-). Flagelina es el único ligando descrito hasta el momento para TLR-5 y su reconocimiento contribuye a la defensa contra diversos agentes infecciosos flagelados como *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* y *Salmonella spp*⁷³

TLR-11 ha sido el último TLR de membrana en ser caracterizado. Este receptor ha resultado involucrado en la defensa frente a infecciones bacterianas del tracto genito-urinario y, por otro lado, se ha descrito que su activación sobre células dendríticas por parte de la proteína tipo profilina de *Toxoplasma gondii* media la producción de IL-12, una citoquina clave en la resistencia a la infección^{74,75}. Más recientemente se ha reportado su participación en la respuesta frente a infecciones por salmonella⁷⁶ y su capacidad para formar heterodímeros con TLR12⁷⁷.

Con respecto a los receptores endosómicos se conoce que TLR-9 está involucrado en el reconocimiento de secuencias de ADN no metiladas conteniendo 2'-desoxiribo (citidina-fosfato-guanosina) (CpG), motivos que son frecuentes en bacterias y virus pero que son raros en mamíferos. TLR-3, TLR-7 y TLR-8 están asociados a la detección de patrones moleculares de virus de ARN. TLR-3 reconoce ARN de doble hebra, un patrón que se produce durante el proceso de replicación viral⁷⁸. TLR-7 y TLR-8 por su parte, han sido implicados en el reconocimiento de ARN de simple hebra ricos en secuencias Guanina-Uracilo⁷⁹⁻⁸¹.

Una vez que los receptores Toll son activados por sus ligandos, se ponen en marcha una serie de eventos de transducción de señales que comienzan con el reclutamiento de moléculas adaptadoras hacia el dominio de señalización del receptor. Hasta el momento se han descrito 4 adaptadores: MyD88, TIR-domain-containing adaptor protein (TIRAP) también conocido como Mal, TIR- domain-containing adaptor-inducing IFN (TRIF), y TRIF-related adaptor molecule (TRAM). El desarrollo de una respuesta inmune adecuada al patógeno reconocido se logra gracias a que cada TLR tiene la habilidad de reclutar

selectivamente distintas moléculas adaptadoras posibilitando que se desencadenen distintas vías de señalización que conducen a la activación de los factores de transcripción NF κ B e IFR3/7 (factores reguladores de interferón 3 y 7) y la vía de las MAP quinasas (MAPKs) (**Figura 2**). La activación de todas estas vías desencadena un programa de expresión que comparte una serie de elementos comunes, destacándose la producción de distintas quimoquinas y citoquinas proinflamatorias tales como CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL20, CXCL10, IL-6 y TNF α ⁸².

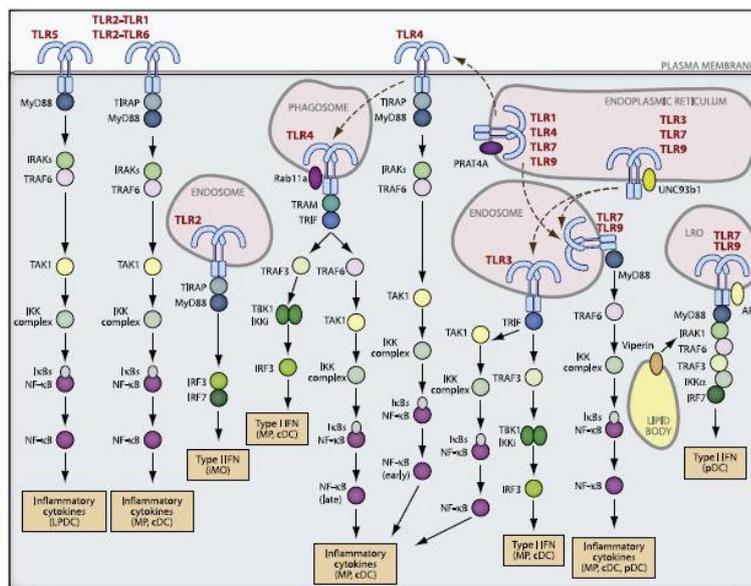


Figura 2: Tráfico y señalización de los receptores TLR. Tomado de “Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity” *Immunity*, Vol. 34, 2011.

Todos los TLR, a excepción de TLR3, utilizan el adaptador MyD88 para activar NF κ B y la vía de las MAPKs para inducir citoquinas proinflamatorias. Como se muestra en la **Figura 2** en interacción con MyD88 TLR-1, TLR-2, TLR-4 y TLR-6 reclutan TIRAP/Mal para iniciar una señalización MyD88 dependiente⁵⁶. TLR-4 es el único receptor capaz de utilizar las 4 moléculas adaptadoras descritas, ya que puede desencadenar una señalización MyD88 independiente, mediada por TRIF, para lo cual requiere el reclutamiento de TRAM. La unión inicial de TIRAP/Mal a TLR-4 permite el reclutamiento de MyD88 a la membrana plasmática y el inicio de una señalización dentro de unos pocos minutos⁸⁴. Posteriormente, tal como se esquematiza en la **Figura 2**, TLR-4 es traslocado desde la membrana plasmática al endolisosoma donde TRAM estaría colaborando en el

reclutamiento de TRIF^{85,86}. Recientemente se ha propuesto un mecanismo por el cual TLR-4 podría realizar el reclutamiento diferencial de ambos adaptadores dependiendo de la localización. El cambio de pH del compartimento endosómico induciría cambios conformacionales en el receptor que determinarían la activación de vías distintas dependiendo de la localización⁸⁷.

La inducción de NFκB dependiente de TLR-5 a través de TRIF ha sido reportada recientemente en células mieloides y de epitelio intestinal⁸⁸ aunque resta caracterizar en detalle los intermediarios de señalización involucrados y confirmar si este mecanismo opera en otros tipos celulares. La señalización a través de ambas vías promueve la inducción de diversos genes asociados a la respuesta inmune tales como citoquinas proinflamatorias e interferones de tipo I.

Tanto las vías MyD88 dependiente como las independientes conducen a la activación del factor de transcripción NFκB a través de la vía canónica. Aunque lo hacen con distinta intensidad y cinética: las primeras de forma temprana y las segundas de manera tardía. Además existen evidencias de que ambas vías conducen a la activación de distintos miembros de la familia de los IRF condicionando así el programa de inducción de genes dependientes de TLR. El reclutamiento del adaptador MyD88 puede conducir, dependiendo del ligando y el tipo celular, a la activación de IRF1 e IRF7^{89,90}, factores de transcripción que participan en la inducción de los interferones tipo 1, como así también a la activación de IRF5 un factor de transcripción clave para la inducción de genes de citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL12p40⁹¹. Por su parte, la vía MyD88 independiente conduce a la activación de IRF3, que resulta en la inducción de IFNβ y genes de quimoquinas^{56,62}

Una particularidad de los TLR es que tanto el ligando reconocido como la vía de señalización empleada están en relación con su localización subcelular⁹². Mientras que los receptores presentes en la superficie celular reconocen ligandos de la pared bacteriana o fúngica e inducen la producción de citoquinas proinflamatorias ante el encuentro con el ligando, los que se expresan en el compartimento endosomal, TLR3, TLR7 y TLR9, detectan ácidos nucleicos y promueven la producción de interferones tipo 1, moléculas claves para la defensa antiviral. TLR7 y TLR9 señalizan desde un compartimento endosomal donde usan MyD88 para activar IRF7⁹³, mientras que TLR3

señaliza a partir de otro compartimento endosomal donde promueve la activación de IRF3 e IRF7 a través de la vía TRIF-dependiente. Como se mencionó anteriormente, TLR-4 es capaz de señalar a través de diferentes vías de acuerdo a su localización⁸⁷.

Así, la activación de los receptores TLR desencadena una serie de eventos que involucran la producción de citoquinas, quimoquinas o interferones tipo 1, destinados a promover el reclutamiento, la activación y la comunicación entre los diversos tipos celulares necesarios para la orquestación de los mecanismos de defensa. Entre las células capaces de sensar PAMPs a través de TLRs se encuentran las células presentadoras de antígenos profesionales que son capaces de integrar las señales generadas por la activación de la inmunidad innata y promover la respuesta adaptativa subsecuente. De esta forma ambos tipos de respuesta están íntimamente relacionados y la activación efectiva de la inmunidad innata así como las características desarrolladas condicionan el establecimiento y formateo de la respuesta adaptativa que brinde protección frente a encuentros sucesivos con un mismo patógeno.

AGONISTAS TLR COMO ADYUVANTES

En vista de la capacidad de estimular la inmunidad innata para establecer una respuesta eficaz y articular una respuesta inmune adaptativa que confiera protección frente a infecciones, los agonistas de TLRs han sido considerados como potenciales adyuvantes⁹⁴. La identificación de los agonistas naturales de los TLRs ha permitido el diseño de ligandos sintéticos que pueden unir al receptor de manera equivalente a los ligandos provenientes de patógenos y han sido seleccionados por su habilidad de activar las vías de señalización correspondientes al receptor implicado. Un ejemplo de esto es el LPS, ligando de TLR-4, que ha sido reconocido como un potente adyuvante pero su actividad pirogénica ha impedido su utilización en humanos. Sin embargo se ha logrado la obtención de una molécula no tóxica denominada monofosforil-lípido A (MPL) derivada del LPS de *S. minnesota*⁹⁵. Esta molécula mantiene la capacidad agonista de TLR-4 pero utiliza sólo la vía de señalización TRIF dependiente (MyD88 independiente)⁹⁶, mientras que el LPS señala a través de ambas vías y genera una potente expresión de citoquinas pro-inflamatorias de manera MyD88 dependiente. El MPL interactúa con TLR-4 y es capaz de aumentar la respuesta de anticuerpos, facilitar la expansión de células T y generar una

respuesta de memoria sin causar efectos colaterales de consideración⁹⁶. Su toxicidad es aproximadamente el 0.1% de la correspondiente al LPS y presenta un perfil de seguridad similar al de las sales de aluminio, el adyuvante mayormente utilizado en humanos. Esta característica del MPL permitió que se transformara en el primer agonista TLR licenciado para uso en humanos cuando en 2009 la FDA (Food and Drug Administration, EE.UU) aprobó la vacuna Cervarix® (GlaxoSmithKline) como una medida preventiva contra las lesiones de cérvix causalmente relacionadas con los subtipos oncogénicos del HPV (Human papiloma virus)⁹⁷. La vacuna contiene el adyuvante AS04 (del inglés Adjuvant Systems 04) que consiste en MPL en combinación con sales de aluminio. Esto confirma la factibilidad del empleo de agonistas TLR como agentes inmunoestimuladores en el desarrollo de adyuvantes vacunales aunque su empleo sigue estando, en la mayor parte de los casos, en etapas experimentales.

Un análogo sintético de RNA doble cadena, como el ácido poli-inosínico:poli-citidílico (poli I:C) ha sido utilizado como agonista de TLR-3. La estimulación de células dendríticas a través de TLR-3 induce IL-12 e interferones tipo I, a la vez que aumenta la expresión como así también la presentación cruzada a través de moléculas de MHC clase II⁹⁸⁻¹⁰⁰. Esto demuestra la capacidad de un agonista TLR de actuar como adyuvante sobre las distintas señales requeridas para el establecimiento de una respuesta inmune: el aumento de moléculas del MHC clase II y presentación cruzada (señal 1) y la secreción de IL-12, necesaria para la polarización de la respuesta hacia Th1 (señal 3).

Flagelina, el único agonista de TLR-5, presenta ciertas ventajas que lo hacen interesante como adyuvante. Es efectivo a dosis bajas¹⁰¹ y por su identidad proteica permite la generación de proteínas de fusión con el antígeno de interés¹⁰²⁻¹⁰⁸. Aunque la unión del antígeno y flagelina no es requerimiento para el desarrollo de una fuerte respuesta humoral dependiente de células T CD4+, varios trabajos han mostrado que una respuesta mediada por células T CD8+ solo es posible en el contexto de una proteína de fusión^{102,107-109}. Otra característica de flagelina es la posibilidad de inducir una poderosa respuesta a base de anticuerpos sin el requerimiento de una robusta activación de la respuesta inmune innata¹¹⁰, lo que estaría nuevamente a favor de minimizar los efectos secundarios. El hecho de ser un potente antígeno en sí mismo podría resultar una desventaja para el uso de flagelina como adyuvante. Básicamente la estructura de

flagelina posee dominios conservados entre especies responsables de su interacción con TLR-5 y una región hipervariable en secuencia y longitud responsable de la generación de anticuerpos. Mediante ingeniería genética ha resultado posible la generación de flagelinas recombinantes que carecen del dominio antigénico pero igualmente mantienen su capacidad como agonista de TLR-5 permitiendo así disminuir la respuesta contra la molécula adyuvante¹¹¹.

Lumazina sintasa de *Brucella abortus* ha sido identificado como un ligando de TLR-4⁷¹. Es una proteína polimérica altamente inmunogénica que permite la inserción de péptidos hacia su extremo N-terminal, por lo que sus propiedades como carrier vacunal han sido estudiadas en diversos sistemas de interés¹¹²⁻¹¹⁴

Si bien los agonistas TLR han mostrado la capacidad de desencadenar una respuesta inmune frente al antígeno que acompañan, esa respuesta puede no ser la adecuada o lo suficientemente fuerte para brindar protección frente a futuras infecciones. Esto ha orientado la investigación hacia la determinación de aquellas combinaciones de moléculas inmunoestimulantes que resulten óptimas para mimetizar la entrada de un patógeno al huésped.

EN LA BÚSQUEDA DE LA RESPUESTA ADECUADA: COMBINACIONES DE AGONISTAS TLR

La incorporación de una molécula inmunoestimulante a una vacuna a base de subunidades podría no resultar suficiente para simular la entrada del patógeno al hospedador teniendo en cuenta que en esa situación el microorganismo estaría siendo reconocido por varios receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) simultáneamente. Para mejorar esta situación se ha recurrido a la posibilidad de utilizar combinaciones de agonistas de TLRs en una formulación vacunal. Si bien existen pocos trabajos en este campo, se ha reportado una respuesta sinérgica en la expresión de distintas moléculas señal, relevantes en el establecimiento de una respuesta inmune luego de la estimulación con combinaciones de distintos agonistas de receptores toll. Se ha observado sinergia con combinaciones TLR2-TLR4¹¹⁵, TLR4-TLR9¹¹⁶ y TLR3-TLR4-TLR7/8¹¹⁷. Sin embargo, no todas las combinaciones resultan en un comportamiento sinérgico o cooperativo¹¹⁸. Se ha identificado que aquellas combinaciones que estimulan simultáneamente una vía de

señalización MyD88 independiente (mediada por TRIF) con otra MyD88-dependiente resultaron en la estimulación sinérgica de IL-6 y TNF α tanto *in vivo* como *in vitro*¹¹⁹. De igual manera, la estimulación de células dendríticas con un agonista TLR acoplado a TRIF (TLR-4 o TLR-3) actúa sinérgicamente con los receptores toll endosomales, TLR-8 en humanos y TLR-7 y TLR-9 en ratón, sobre la inducción de IL-12p70 e IL-23¹²⁰. Este efecto sinérgico se observó aún a concentraciones subóptimas de cada uno de los agonistas utilizados, lo cual resulta sumamente interesante si se piensa en el hecho de disminuir las dosis de los mismos en una vacuna para aumentar su seguridad. El hecho de que solo ciertas combinaciones resulten en la expresión aumentada de citoquinas y/o quimoquinas necesarias para montar una respuesta inmune refleja la existencia de algún tipo de código por el cual el huésped puede reconocer un patógeno y desplegar la mejor estrategia de defensa.

El desarrollo de agonistas novedosos que resulten útiles en la obtención de una vacuna diseñada racionalmente con el objetivo de aumentar su eficacia y seguridad, ha sido tema de numerosas líneas de trabajo en las últimas décadas.

Este trabajo de Tesis se enfoca parcialmente en esta temática, manteniendo como eje la búsqueda y desarrollo de agonistas de la respuesta innata con posibles aplicaciones como adyuvantes.

OBJETIVOS Y RESÚMEN DEL TRABAJO

El objetivo general del presente trabajo consiste en el desarrollo y/o selección de agonistas de la inmunidad innata que presenten potencial aplicación como adyuvantes y la optimización de protocolos que permitan el cambio de escala en su producción.

Se seleccionó flagelina de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium como agonista modelo para comenzar a trabajar, por las cualidades que presenta este agonista como adyuvante y otras potenciales aplicaciones.

El trabajo consta de dos etapas, que serán detalladas en sendos capítulos. En el capítulo 1 se muestran las distintas actividades realizadas con el objetivo de optimizar un protocolo que permitiese un cambio de escala en la producción de flagelina. Se evalúan distintas condiciones de cultivo de *Salmonella* y distintas condiciones de manipulación del cultivo post-cosecha tendientes a maximizar la cantidad de flagelo recuperado. Con el objetivo de mejorar la purificación de flagelina se incorporó al protocolo de producción un paso de cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales anti-flagelina. Se muestran los resultados de la caracterización de los anticuerpos monoclonales desarrollados y las distintas aplicaciones derivadas de sus cualidades. Las características de algunos de los monoclonales obtenidos permitieron su aplicación en un ensayo de aglutinación para la detección de *S. Typhimurium*.

En el capítulo 2 se describen las actividades realizadas en pos de la generación de una molécula novedosa con potencial capacidad adyuvante, a partir de la obtención de una proteína de fusión entre la flagelina de *S. Typhimurium* y la lumazina sintasa de *Brucella spp.* (BLS). La quimera FliC-BLS fue caracterizada estructural y biológicamente para evaluar su capacidad como agonista dual TLR-4/TLR-5. La estructura decamérica de BLS permite presentar diferentes antígenos de manera repetida lo cual se sabe que induce una fuerte respuesta inmune. Esta cualidad sumada a la presencia de 2 agonistas TLR en la misma molécula postulan a la quimera FliC-BLS como un novedoso inmunoestimulador, conjugando las propiedades de flagelina como adyuvante y de BLS como plataforma vacunal^{113,114}.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

FLAGELINA COMO AGONISTA DE LA INMUNIDAD INNATA

INTRODUCCIÓN

Flagelina (FliC) es el monómero estructural del flagelo bacteriano y es capaz de desencadenar una respuesta proinflamatoria a través de distintos receptores de la respuesta innata. Por un lado, como se mencionó en la introducción general, flagelina es capaz de activar la señalización a través de TLR5, que se ubica en la membrana plasmática celular. Por otro lado, la presencia de flagelina en el citosol de células mieloides desencadena la activación del inflamosoma a través de los adaptadores IPAF (también conocido como NLRC4) y NAIP5¹²¹⁻¹²⁴. Esta respuesta se caracteriza por la secreción de diversas citoquinas y quimoquinas mediada por el factor de transcripción NF- κ B y la proteína adaptadora MyD88.

La estructura de flagelina se caracteriza por presentar 4 dominios globulares distintos denominados D0, D1, D2 (con los subdominios D2a y D2b) y D3 (**Figura 1**). La cadena polipeptídica comienza en el dominio D0, continua a través de los dominios D1 y D2, forma el dominio más expuesto D3 y luego retorna sobre los dominios D2 y D1 para finalizar en el D0¹²⁵. Las regiones N y C-terminal de los dominios D0 y D1 están altamente conservadas entre distintas especies bacterianas¹²⁶ y resultan fundamentales para el ensamble del flagelo, ubicándose ambos dominios hacia el interior del mismo^{127,128}. La zona de interacción con el receptor TLR-5 se ubica en el dominio D1 hacia el extremo amino terminal entre los aminoácidos 89-96^{129,130} (**Figura 1**). Contrariamente, los dominios D2 y D3 se ubican hacia el exterior y constituyen una región hipervariable entre cepas y especies en tamaño y secuencia que resulta altamente inmunogénica.

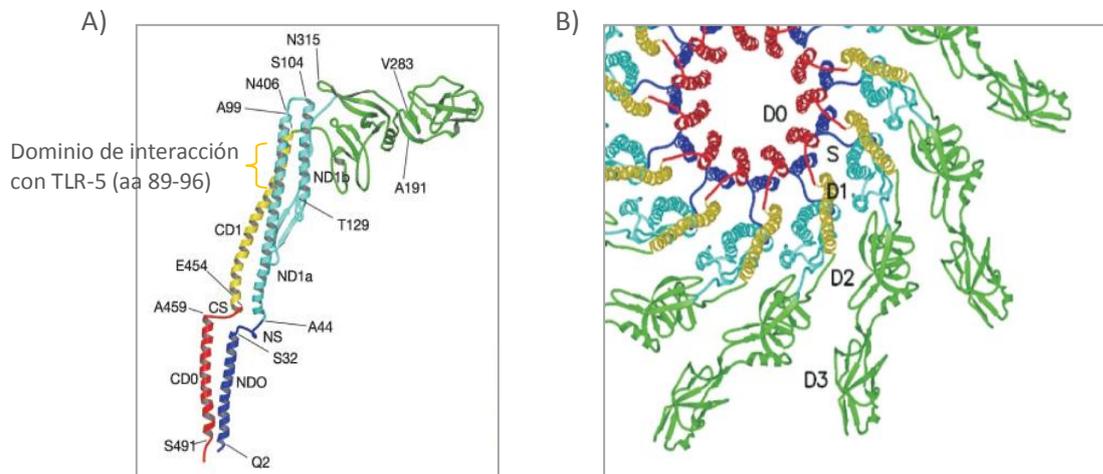


Figura 1: Estructura de flagelina y el filamento flagelar. A) Se muestra la secuencia peptídica desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal (desde el azul, pasando por el celeste, verde y amarillo hasta el rojo) de la molécula de flagelina. La llave en naranja señala el sitio de interacción con TLR-5 entre los aminoácidos 89 a 96 correspondientes al dominio D1 de la molécula. B) Representación del filamento flagelar, se utiliza la misma disposición de colores que en la figura A. Hacia el centro del filamento se ubican los dominios D0, que comprende parte de los extremos N- y C-terminal de la molécula de flagelina (mostradas en rojo y azul) y D1, que involucra las porciones de la molécula representadas en celeste y amarillo; mientras que los dominios D2 y D3 que constituyen la región hipervariable de la flagelina se ubican expuestos sobre la superficie flagelar (mostrados en verde). Adaptado de “Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy”, Nature, Vol. 424, 2003.

La interacción flagelina-TLR5 se establece entre oligómeros de flagelina, siendo menor la actividad estimuladora del flagelo completo por impedimentos estéricos determinados por la polimerización¹²⁹. Los primeros trabajos orientados a dilucidar la estructura de la interacción flagelina:TLR-5 mostraron que dímeros u oligómeros de flagelina muestran mayor capacidad estimuladora probablemente debido a su capacidad para entrecruzar simultáneamente varias moléculas de TLR5¹³¹. Recientemente se ha comprobado que la interacción fisiológica entre ligando y receptor se produce entre 2 moléculas de cada participante, determinando la estequiometría de activación como 2:2 TLR-5:flagelina¹³².

Se ha propuesto a flagelina como adyuvante mucosal en diversos sistemas¹³³⁻¹³⁶ por su capacidad de estimular el sistema inmune e inducir una posterior respuesta humoral. Una propiedad de flagelina que resulta de interés en este campo es su capacidad de activar la maduración de DCs en distintas mucosas¹³⁷ y promover la liberación de moléculas co-estimuladoras, como B7-1¹³⁴. Además, por ser un fuerte inductor del factor estimulante de granulocitos (GM-CSF) cuando se la administra por vía sistémica, se ha mostrado que flagelina es capaz de restablecer el número de neutrófilos en circulación luego del descenso inducido por radiación o quimioterapia¹³⁸, abriendo aplicaciones de la misma en el campo de la radiomedicina.

En base a las propiedades estructurales de la flagelina y su capacidad estimuladora al ser administrada por vía sistémica o mucosal seleccionamos a esta molécula como sistema de estudio. Uno de los primeros objetivos abordados en el estudio de la flagelina fue contar con un sistema de producción que permitiera eventualmente satisfacer las necesidades planteadas por el estudio de distintas propiedades de la misma, en particular su aplicación como adyuvante. Por ello nos propusimos desarrollar un protocolo de producción que pudiera ser fácilmente escalable y eventualmente usado en escala piloto.

Los protocolos habituales de producción de flagelina se basan en la recuperación de los flagelos bacterianos sin realizar la lisis del microorganismo. Se recuperan las bacterias por centrifugación a partir de cultivos líquidos del microorganismo y se resuspenden en un volumen menor, de manera tal de obtener una suspensión bacteriana densa, que es agitada en vórtex a máxima velocidad, ocasionando la liberación de los flagelos de la superficie bacteriana. Finalmente, se recupera la flagelina por ultracentrifugación¹³⁹⁻¹⁴¹ a partir del sobrenadante. En estas condiciones de trabajo, resulta necesario minimizar el desprendimiento del flagelo durante el período de obtención de biomasa para mejorar el rendimiento y luego maximizar la disrupción de los flagelos.

La respuesta desencadenada por la estimulación de distintos TLRs induce un patrón característico de respuesta en la que se destaca la expresión diferencial de distintas quimoquinas, entre ellas CCL20⁸². Esta quimoquina es un fuerte attractante de linfocitos y células dendríticas y su promotor actúa bajo la influencia del factor de transcripción NF-

kB¹⁴². Sus niveles de expresión son un buen indicador de activación de la respuesta innata en distintos órganos, en particular en mucosas¹⁴³.

Sobre la base de estos conceptos se desarrollaron las actividades del presente capítulo. Se purificó y detoxificó flagelina mediante un protocolo de producción previamente descrito¹⁴³. Se evaluó el análisis transcripcional de la expresión de *cc/20* luego de administrar flagelina por vía sistémica (intraperitoneal) y vía mucosal (intranasal o intragástrica). Consecuentemente resultó de interés evaluar su capacidad adyuvante co-administrando flagelina con OVA por vía subcutánea o intranasal.

Luego se realizaron actividades tendientes a optimizar un protocolo de producción de flagelina. Se ensayaron diferentes condiciones de cultivo y diferentes procedimientos de manipulación del cultivo post-cosecha seleccionando aquellos que mostraran el mayor rendimiento en proteína. En cada paso se evaluó la calidad de la flagelina obtenida mediante SDS-PAGE y su actividad biológica sobre la línea reportera *caco-ccl20-luciferasa*^{111,144}.

El protocolo de producción se perfeccionó utilizando cromatografía de afinidad a base de anticuerpos monoclonales anti-flagelina generados también en nuestro laboratorio.

El protocolo establecido, producto de las actividades que se describirán a continuación es fácilmente escalable y sería de fácil implementación en una línea de producción de flagelina si esta fuese incorporada en formulaciones vacunales de uso masivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.I.I ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LA RESPUESTA DESENCADENADA POR LA ADMINISTRACIÓN DE FLAGELINA

Al momento de iniciar el presente trabajo se había descrito recientemente la propiedad adyuvante de flagelina. Los primeros reportes utilizaban flagelina por vía sistémica¹³⁴ y otros ulteriores por vía mucosal, más precisamente por vía intranasal^{136,145}. Considerando estos datos nos resultó de interés el poder reproducir en nuestro laboratorio los protocolos de purificación de flagelina, de manera de obtener preparaciones puras para profundizar la caracterización de la respuesta generada por este agonista como así también evaluar su capacidad adyuvante a través de otras vías.

La purificación se realizó utilizando un protocolo tradicional que consiste en recuperar los flagelos a partir de cultivos bacterianos, en nuestro caso particular, de *Salmonella Typhimurium*. La flagelina así obtenida puede estar contaminada por componentes de la pared celular como el LPS, por lo que fue detoxificada, y mediante test de *Limulus* pudo determinarse que las preparaciones proteicas eran libres de pirógenos (resultado no mostrado). Este paso resulta fundamental a la hora de caracterizar la actividad estimulatoria de la repuesta innata de una molécula ya que puede incurrirse en el error de atribuir propiedades a moléculas que realmente no las poseen, debiéndose el efecto observado a trazas de contaminantes. Por ejemplo, numerosos trabajos han sugerido que las proteínas asociadas al shock térmico (HSPs del inglés heat shock proteins) como Hsp70, Hsp60 y Gp96 podían ser fuertes inductores del sistema inmune¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ mientras que estudios posteriores cuestionan estos resultados atribuyéndolos al LPS y otros contaminantes no proteicos¹⁴⁹⁻¹⁵². En la medida de lo posible resulta deseable el uso de un sistema insensible a la estimulación por LPS debido a que este agonista presenta una elevada actividad biológica aún en cantidades del orden de los picogramos^{134,153}.

Para confirmar la ausencia de contaminantes bioactivos, se realizó una digestión con tripsina sobre una fracción de la flagelina obtenida y se realizaron ensayos de actividad biológica *in vivo* e *in vitro*. Se utilizó la línea reportera Caco-*cc120*-luciferasa,

esta línea de epitelio intestinal expresa en forma estable la luciferasa de luciérnaga bajo el promotor de *cc/20*, una quimoquina proinflamatoria inducible por la señalización de flagelina a través de TLR5¹¹¹. Las células fueron estimuladas con flagelina o flagelina tripsinada a distintas dosis durante 6 horas luego de lo cual se midió actividad luciferasa en el lisado de células utilizando un luminómetro (**Figura 2a**). Además se evaluó el nivel de expresión de *cc/20* en hígado mediante RT-qPCR luego de la estimulación de ratones Balb/C con 10 µg de flagelina o flagelina tripsinada por vía intraperitoneal. El hígado es un órgano muy sensible a la estimulación por agonistas TLR¹⁵⁴ por lo que la ausencia de aumento en la expresión de *cc/20* luego de la estimulación con flagelina tripsinada resultó un muy buen indicador de haber obtenido una preparación de flagelina libre de contaminantes que pudieran ser responsables de la actividad biológica observada (**Figura 2b**).

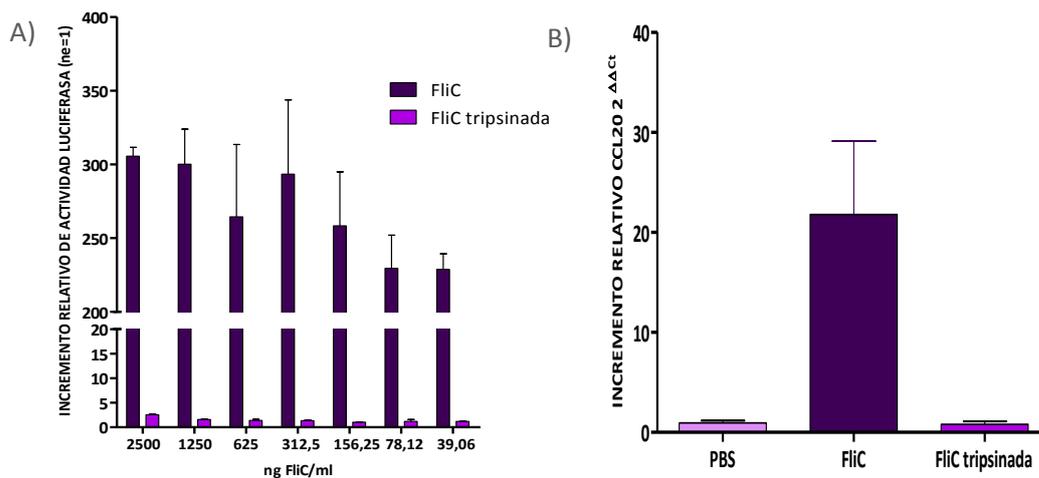


Figura 2: Control de actividad biológica. Flagelina de *S. Typhimurium* fue tratada con tripsina y se evaluó la actividad biológica residual, A) Células Caco-ccl20-luciferasa fueron estimuladas durante 6 hs en placa de 48 pocillos con las dosis indicadas de flagelina o flagelina tripsinada, luego de lo cual se midió actividad luciferasa en el lisado celular (n=3). B) Estimulación intraperitoneal de ratones Balb/C con 10 µg de flagelina o flagelina tripsinada en 300 µl de PBS libre de pirógenos. Luego de 2 hs se tomó una porción de hígado y se evaluó la expresión de *ccl20* por medio de RT-qPCR (n=4). Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes con resultados similares. En ambos ensayos la muestra tripsinada no mostró actividad biológica residual.

Una vez detoxificada la flagelina, diferentes grupos de ratones Balb/c fueron tratados con el agonista por vía sistémica o mucosal. Se estimularon por vía intraperitoneal (IP), intranasal (IN) o intragástrica (IG) y se analizó la expresión de *cc120* por RT-qPCR luego de 2 horas. La estimulación por vía sistémica aumentó la expresión de *cc120* respecto al control inyectado con PBS, en los distintos órganos evaluados: estómago, pulmón, duodeno e ileum, aunque no en todos en igual medida (**Figura 3b**) posiblemente debido a una expresión diferencial del receptor¹⁵⁵. Por otro lado, el incremento en la expresión de *cc120* en la mucosa respiratoria por la administración intranasal de flagelina fue dependiente de la dosis empleada (**Figura 3a**). La estimulación por vía IG, en cambio, no mostró una diferencia en los niveles de *cc120* en duodeno respecto al grupo control al que se administró PBS libre de pirógenos (resultado no mostrado). Este resultado podría ser consecuencia de varios factores. Podría deberse a que la proteína posiblemente esté sufriendo proteólisis en el estómago lo que le impide llegar en condiciones al intestino para interactuar con su receptor TLR-5. Por otro lado, la distribución fundamentalmente basolateral de TLR5 en intestino^{156,157} dificultaría una estimulación por vía apical u otra posibilidad sería que el mucus de la superficie epitelial bloquee el acceso al receptor.

Los resultados indican que flagelina fue capaz de estimular la respuesta inmune innata en los distintos órganos estudiados dependiendo de la vía utilizada. De esta manera corroboramos la obtención de una molécula que presenta actividad como agonista del sistema inmune innato. La habilidad de estimular una respuesta inflamatoria de los ligandos de TLR se correlaciona con su capacidad de actuar como adyuvantes efectivos.

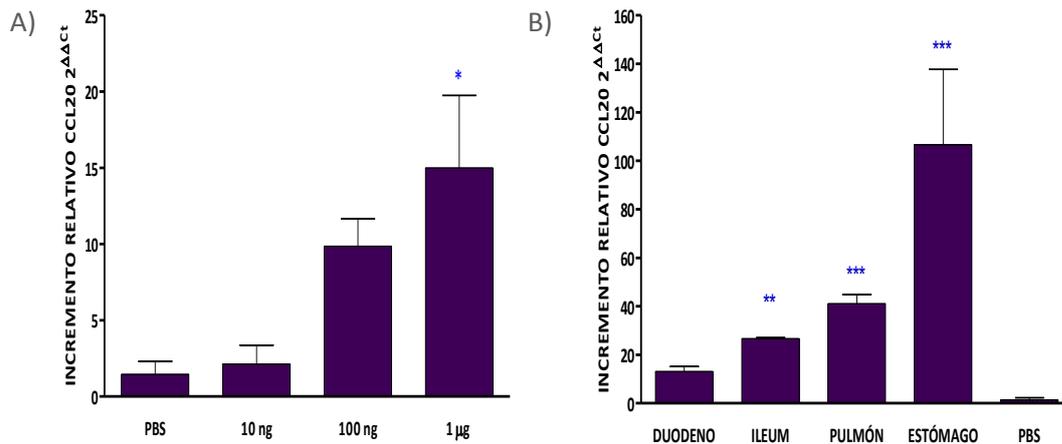


Figura 3: Análisis de la expresión de *ccl20* desencadenada por la administración de flagelina a través de diferentes vías. A) ratones Balb/c fueron estimulados con flagelina por vía intranasal a las dosis indicadas y se analizó la expresión de *ccl20* en pulmón por RT-qPCR a las 2 horas. n=3 B) Se administró flagelina (10µg) por vía intraperitoneal y se evaluó la expresión de *ccl20* a las 2 horas en los órganos indicados. En todos los casos se representa el valor medio y el SEM del aumento relativo de la expresión génica de *ccl20* analizado estadísticamente mediante ANOVA de una vía seguido por Test Tukey comparado contra el control. *= ($P < 0,05$), **= ($P < 0,01$) y ***= ($P < 0,001$).

En particular, flagelina ha demostrado ser un buen adyuvante para células T CD4+ cuando se lo co-administra con ovoalbúmina por vía intravenosa¹³⁴. Diversos grupos se han dedicado al análisis del perfil de la respuesta desencadenada por flagelina, observándose en algunos casos una respuesta Th1 antígeno específica caracterizada por la producción de IFN γ y no de IL-4^{134,158}. Mientras que, otro reporte usando flagelina como adyuvante ha descrito la generación de una respuesta Th2 en células T CD4+, encontrando IL-4, IL-13 y una respuesta de anticuerpos típica de Th2 luego de la inmunización¹⁵⁹. Esta habilidad de flagelina de generar una respuesta Th2 *in vivo* fue corroborada por otro grupo que demostró que la administración de flagelina soluble causa una respuesta de anticuerpos tipo Th2, mientras que la flagelina administrada anclada a Salmonella genera una respuesta tipo Th1¹⁶⁰. Las diferencias en la respuesta desencadenada al utilizar flagelina como adyuvante pueden estar asociadas a la pureza de la preparación de flagelina, al grado de polimerización de la misma, a la dosis empleada y/o a la vía de administración utilizada.

Teniendo en cuenta los resultados del análisis transcripcional realizado para *ccl20*, se decidió analizar la capacidad adyuvante de flagelina a través de diferentes vías.

I.I.II ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DE FLAGELINA ADMINISTRADA A TRAVÉS DE DIFERENTES VÍAS

Se realizaron inmunizaciones co-administrando flagelina (1µg) y OVA (10µg) por vía intranasal o subcutánea bajo el siguiente esquema: día -1 sangrado, días 0 y 21 inmunización, día 25 sacrificio. Al momento del sacrificio se recuperó el suero de los animales y se realizó lavado broquioalveolar de los inmunizados por vía intranasal para determinación de anticuerpos anti-OVA. Como se muestra en la **Figura 4** la administración conjunta de flagelina con el antígeno desencadenó una fuerte respuesta de anticuerpos anti-OVA en comparación al grupo control al cual se administró solo ovoalbúmina. Esto pudo observarse para ambas vías evaluadas. El análisis del perfil de isotipos de los anticuerpos (IgG1, IgG2a) mostró una respuesta caracterizada por la mayor presencia de anticuerpos de isotipo IgG1. Por vía subcutánea no se observó aparición de IgG2a mientras que por vía intranasal hubo un leve incremento de este isotipo. Además se midió IgA específica en muestras de lavado bronquioalveolar aunque no se observaron diferencias significativas respecto al control (resultado no mostrado), probablemente por la baja magnitud de la respuesta generada.

Ante estos resultados, que evidencian la capacidad de flagelina como adyuvante, y considerando otras aplicaciones biotecnológicas de este agonista mencionadas en la introducción, resultó de interés realizar una producción a mayor escala. La posibilidad de obtener cantidades mayores, nos permitiría la realización de ensayos de caracterización (análisis de la respuesta desencadenada por diferentes vías, adyuvaticidad, estabilidad, etc) tanto en la línea de investigación reportada en la presente Tesis Doctoral, como en colaboración con otros grupos de trabajo, dentro y fuera de nuestro laboratorio.

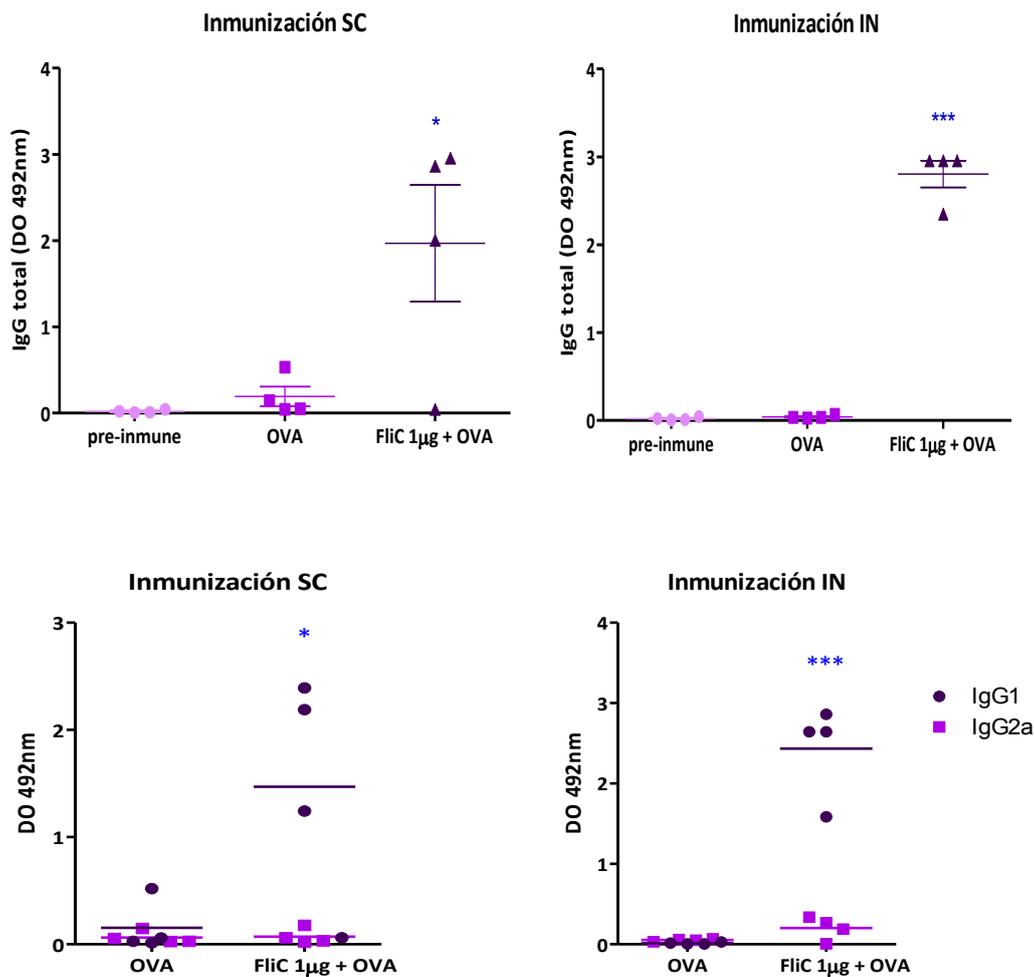


Figura 4: Análisis de la capacidad adyuvante de flagelina por vía mucosal y sistémica
Lotes de ratones Balb/c fueron inmunizados a día 0 y día 21 con 10 µg de ovoalbúmina sola o acompañada por 1µg de flagelina. Las inmunizaciones por vía intranasal se realizaron en un volumen final de 40 µl/ratón de solución fisiológica libre de pirógenos mientras que las administraciones subcutáneas se realizaron con 200 µl/ratón. A día 25 se determinó por ELISA la presencia de anticuerpos anti-flagelina utilizando una dilución 1/200 del suero (figuras de arriba) y el isotipo de los mismos realizando una dilución 1/50 del suero (paneles de abajo). Se utilizaron 4 ratones por grupo. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Se muestra el promedio de DO a 492nm y el SD. En ambos casos *= ($P < 0,05$) y ***= ($P < 0,001$), se analizó mediante ANOVA de una vía seguido de un Test Tukey en el caso de determinación de IgG total mientras que para la determinación de isotipo se muestra el promedio analizando los datos mediante ANOVA de dos vías seguido de Test Bonferroni. En este último caso se muestra la diferencia entre isotipos.

I.II OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA PURIFICAR FLAGELINA A ESCALA PILOTO

I.II.I DETERMINACIÓN DE LA CONDICIÓN DE CULTIVO

En escala de laboratorio, la flagelina se obtiene de cultivos líquidos de *Salmonella* (usualmente volúmenes de cultivo del orden de los cientos de mL) crecidos ON a 37°, 180 rpm. Se utilizan condiciones de crecimiento a baja agitación para evitar el desprendimiento de los flagelos por aumento de fuerzas de corte generadas por el movimiento de agitación.

Para la producción de flagelina a escala piloto se trabajó en los laboratorios de producción del Instituto Biológico Argentino (BIOL-SAIC). Durante el período 2006-2009 realizamos actividades conjuntas con la empresa BIOL dentro del marco del proyecto “Novel Therapeutic and Prophylactic Strategies to Control Mucosal Infections by South American bacterial strains (SavinMucoPath)”, del cual formamos parte junto a otros 6 grupos latinoamericanos y europeos.

Entre sus líneas de producción BIOL posee distintos productos provenientes de lisados microbianos, por lo que su laboratorio de producción tiene experiencia en el manejo de cultivos de patógenos y mantienen una serie de procedimientos standard de manejo de los mismos adecuado al tipo de instalaciones de producción. El tratamiento con formaldehído resulta una alternativa fácil y económica que permite inactivar al cultivo directamente en el recipiente de cultivo del mismo, para luego manejarlo como un sistema de bajo riesgo biológico. Esto permite evitar el establecimiento de un circuito cerrado, minimizando el manejo de microorganismos viables durante la cadena de producción. Una vez inactivado, el cultivo puede ser manipulado de manera segura para el operador sin mayores requerimientos que los de uso habitual (guantes, barbijo, guardapolvo, cofia, etc.).

En los laboratorios de BIOL se dispuso de fermentadores de 30 litros para cultivar *Salmonella* con o sin agitación y de botellones de 10 litros para realizar cultivos estáticos. Para comenzar con las actividades orientadas a la optimización de un protocolo de obtención de flagelina a escala piloto se diseñó un ensayo con el objetivo de analizar la

influencia de distintas condiciones de cultivo de la bacteria sobre la recuperación de flagelo, empleando un protocolo de purificación similar al usado en baja escala, se analizó a su vez el efecto de la inactivación por formolización sobre la actividad biológica de la flagelina obtenida en cada caso.

Se realizaron cultivos de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium en 10lts de medio TSB bajo las siguientes condiciones:

- 1) Cultivo en fermentador, agitación 420 rpm y aireación 10L/min ON 37º;
- 2) Cultivo en fermentador con aireación 10L/min ON 37º;
- 3) Cultivo estático en botellones, 72hs 37º.

Para poder manipular los cultivos de manera segura se procedió a la inactivación de los mismos mediante formolización. A tal efecto, habiendo transcurrido los tiempos mencionados para cada condición se tomaron muestras de los distintos cultivos para su procesamiento en forma directa y el cultivo remanente se inactivó mediante tratamiento con formaldehído.

El tratamiento de inactivación consiste en el agregado de formaldehído hasta alcanzar una concentración final 0,6% v/v. Luego de controlar la inactivación completa del cultivo, al cabo de una semana de procedimiento se cosecharon las bacterias de los cultivos formolizados. Los pellets bacterianos y las muestras tomadas antes de la formolización fueron procesadas para obtención de flagelina, de acuerdo al protocolo descrito previamente. La condición que presentó el mayor rendimiento fue la estática, debido posiblemente al desprendimiento de flagelo generado durante el crecimiento en las otras condiciones (**Figura 5a**). La pureza de la preparación obtenida fue controlada mediante SDS-PAGE (**Figura 5b**) siendo satisfactorio el grado de pureza alcanzado en todos los casos. El rendimiento en proteína de las distintas condiciones fue evaluado por el método del ácido bicinónico (BCA). Tanto la pureza como el rendimiento no se vieron afectados por el tratamiento de formolización.

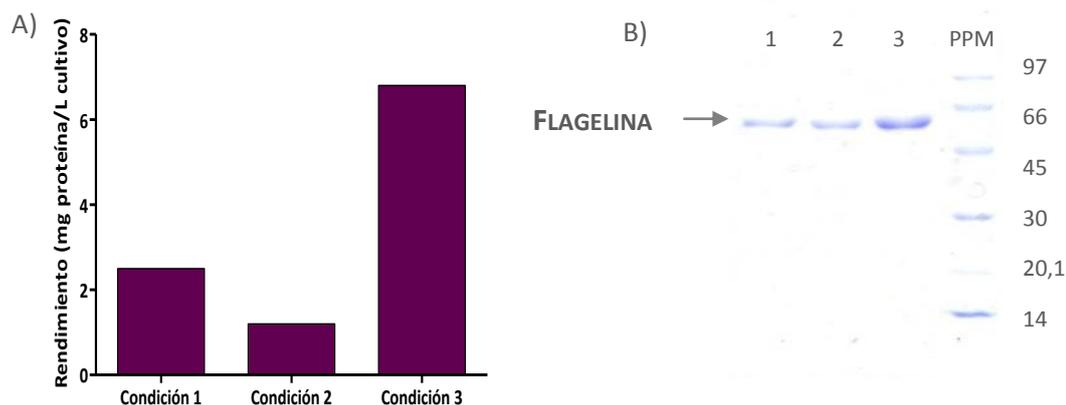


Figura 5: Determinación de la condición de cultivo con mayor rendimiento en flagelina.

Se realizaron cultivos de *Salmonella* en 10 litros de medio TSB en las siguientes condiciones: 1) Cultivo en fermentador, con agitación 420 rpm y aireación ON 37°; 2) Cultivo en fermentador con aireación ON 37°; 3) Cultivo estático en botellones, 72hs 37°. Se tomaron 200 ml de muestra de cada cultivo antes y después del tratamiento con formol a partir de las cuales se obtuvo flagelina de la manera descrita. A) La proteína recuperada a partir de las muestras obtenidas antes del tratamiento con formol se cuantificó por el método del ácido bicinónico y se expresó el rendimiento como mg de proteína/L de cultivo. B) El análisis por SDS-PAGE de dichas muestras mostró bandas únicas que coincidieron con el peso molecular esperado para flagelina (52KDa). Los mismos ensayos realizados para las muestras tomadas luego del tratamiento con formol arrojaron resultados similares. ON: overnight, PPM: patrones de peso molecular.

Se evaluó la actividad biológica de las fracciones sobre células *Caco-cc/20:luciferasa*. Las células fueron estimuladas con 1µg/ml de FliC de las distintas fracciones y luego de 6 horas se midió actividad luciferasa en el lisado. La expresión de luciferasa en respuesta a un estímulo resulta una medida de la capacidad del mismo de estimular la inmunidad innata. Todas las fracciones obtenidas con anterioridad al tratamiento con formol mostraron capacidad de estimular la línea reportera mientras que, la flagelina proveniente de los cultivos formolizados mostró una disminución en su actividad biológica (**Figura 6**). Debido a la formación de homodímeros de TLR-5 en el reconocimiento de oligómeros de flagelina, la flagelina monomérica presenta menor capacidad agonista que multímeros de la misma¹²⁹ por lo que se consideró la posibilidad de que luego del tratamiento el entrecruzamiento generado por el formaldehído sobre los monómeros de flagelina mejorase la interacción con TLR5 por estabilizar estructuras

oligoméricas. En efecto, recientemente se estableció una estructura de activación 2:2 para el eje TLR-5:flagelina¹³². Sin embargo, nuestros resultados indicaron que el tratamiento con formaldehído disminuyó la actividad biológica de la flagelina obtenida luego de este procedimiento. Esto puede deberse a alteraciones estructurales ocasionadas por la conjugación no enzimática de residuos de formaldehído a grupos aminos libres en la molécula de flagelina que terminen afectando su interacción con TLR5. En consecuencia, se descartó la formolización como un procedimiento de manejo de los cultivos para la obtención de flagelina y debieron analizarse tratamientos del cultivo alternativos.

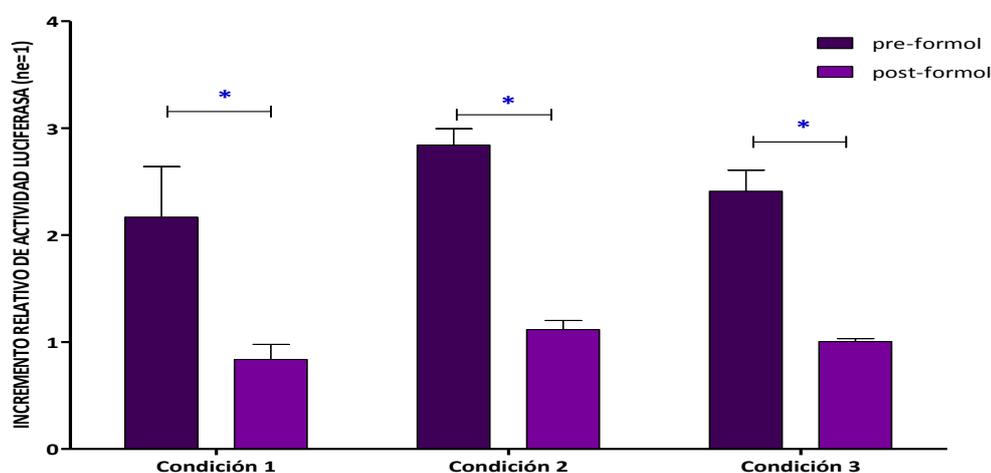


Figura 6: Análisis de actividad biológica *in vitro* de las muestras tomadas antes y después de la inactivación del cultivo por formolización. Células caco-ccl20-luciferasa fueron estimuladas con flagelina 1µg/ml (los números hacen referencia a la condición de cultivo) obtenida antes y después del tratamiento con formol. Luego de 6 horas se midió actividad luciferasa en el lisado utilizando un luminómetro. Los datos representan el promedio + SEM de duplicados de cada condición analizados mediante ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni, *= ($P < 0,05$).

I.II.II SELECCIÓN DE UN MÉTODO DE PROCESAMIENTO PARA GRANDES VOLÚMENES DE CULTIVO

El hecho de que el tratamiento con formol para inactivar los cultivos produjera una disminución de la actividad biológica de la flagelina obtenida, generó la necesidad de evaluar tratamientos alternativos para la inactivación de los cultivos. Como se mencionó anteriormente los cultivos debían ser inactivados ya que no se contaba en BIOL con un

circuito cerrado que permitiera la manipulación del cultivo en condiciones de bioseguridad. La obtención de flagelina en nuestro laboratorio se realiza a partir de pequeños volúmenes de cultivo generados en erlenmeyer, los cuales pueden trasladarse fácilmente desde y hacia el flujo laminar por lo que no se requiere ningún tratamiento previo a la separación de los flagelos. Las distintas opciones analizadas en BIOL como alternativa a la formolización fueron: 1) inactivación por tindalización, 2) inactivación con azida sódica 0,1% y 3) reducción del volumen a manipular por filtración tangencial. El primero de estos tratamientos consistió en calentar el cultivo a 60°C durante 1 hora y dejar enfriar, repitiendo el procedimiento 3 veces; de esta manera se inactivan los microorganismos poco resistentes al calor. El segundo de los tratamientos consistió en agregar azida sódica hasta una concentración 0,1% P/V de manera tal de inactivar el cultivo por inhibición de la cadena transportadora de electrones. La tercera opción, filtración tangencial, consiste en la recirculación del cultivo por un sistema cerrado integrado por una columna rellena con filtros de un tamaño de poro adecuado, de modo de ir concentrando la biomasa por separación del medio de cultivo en otro recipiente con ayuda de una bomba peristáltica (**Figura 7**). A partir del recipiente (fermentador o estático) donde se genera la biomasa se fuerza el pasaje del cultivo por la columna con filtros mediante la ayuda de una bomba peristáltica y un pescante (tubo de vidrio que se introduce por la cámara de inoculación aséptica que atraviesa el tapón del botellón y alcanza el fondo del mismo). Este procesamiento no ejerce una acción bactericida pero concentra el cultivo facilitando su posterior manipulación, teniendo en cuenta el paso de centrifugación que se requiere luego para recuperar el pellet bacteriano.



Figura 7: Equipo para filtración tangencial.

Durante el proceso el cultivo es recirculado con ayuda de una bomba peristáltica en sentido paralelo al filtro, colectándose el permeado (fracción no retenida) en un recipiente aparte. De esta manera es posible concentrar la biomasa, lo que facilita el posterior procesamiento del cultivo para la recuperación de los flagelos. De derecha a izquierda: cultivo, bomba peristáltica, columna de filtración tangencial con manómetro acoplado, recipiente para coleccionar el permeado

La filtración tangencial (FT) ha sido ampliamente utilizada para la purificación de agua¹⁶¹, inmunoglobulinas¹⁶² y antígenos de arbovirus previamente inactivados¹⁶³. El uso de filtración tangencial para la concentración de microorganismos y partículas de interés tiene varias ventajas por sobre los sistemas de filtración tradicionales. Durante el proceso, el cultivo es recirculado en forma paralela al filtro evitando la acumulación de los microorganismos o sus derivados sobre el mismo. De esta manera es posible concentrar y purificar parcialmente desde el medio de cultivo distintas moléculas de interés utilizando un tamaño de poro adecuado.

Teniendo en cuenta que la condición de cultivo con mayor rendimiento en flagelina resultó ser la estática, se realizó un cultivo de 10 litros en botellón estático que se fraccionó de la siguiente manera: 1) 1 litro se tindalizó, 2) 1 litro se trató con azida sódica 0,1%, y 3) 8 litros fueron concentrados por filtración tangencial. Para este último caso el medio colectado a la salida del sistema de filtración se denominó permeado.

En el Instituto Biológico Argentino se dispuso de un equipo de filtración tangencial con un filtro que permite retener moléculas de tamaño ≥ 30 KDa. El flagelo es una estructura supramolecular producto de la polimerización de monómeros de tamaño promedio alrededor de 50 KDa de manera que las características de la columna utilizada evitarían la pérdida de flagelos en el permeado durante la recirculación del cultivo. La manipulación de los 8 litros de cultivo permitió obtener 400 ml de una suspensión bacteriana densa, lo que representa una concentración de 20 veces respecto al cultivo sin procesar. El efecto de la tindalización y el agregado de azida sódica se evaluó haciendo repiques del cultivo en placa de LB luego de 24, 48 y 72hs de tratamiento. Las placas incubadas a 37°C presentaron colonias aún después de las 72hs de ambos tratamientos. La necesidad de un tratamiento prolongado para la inactivación del cultivo constituye una desventaja con respecto al objetivo de purificar flagelina. Luego de 72hs el cultivo en fase estacionaria posiblemente esté en una condición de lisis activa que generaría la liberación del contenido celular al medio y podría afectar la integridad de flagelina por la presencia de proteasas.

Las fracciones tratadas por tindalización o azida sódica fueron centrifugadas y los pellet bacterianos se resuspendieron en 2 ml de PBS para obtener una suspensión densa y

proceder a la separación de los flagelos mediante agitación vigorosa en vortex. El cultivo concentrado por filtración tangencial no recibió ningún procesamiento adicional. Posteriormente, todas las fracciones fueron centrifugadas para separar los sobrenadantes, los cuales fueron ultracentrifugados a fin de recuperar los flagelos. El pellet resultante de la ultracentrifugación se resuspendió en PBS y la determinación de proteínas en las suspensiones de flagelina obtenidas se utilizó para calcular el rendimiento y así poder determinar que procedimiento para manipular el cultivo había resultado más adecuado (**Figura 8**).

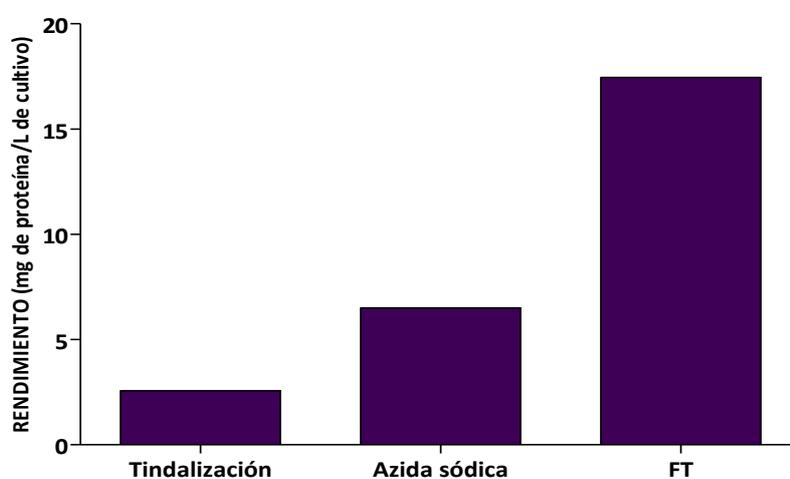


Figura 8: Determinación de un método de procesamiento alternativo al formaldehído para la manipulación de cultivos de Salmonella. Se realizó un cultivo estático de 10 litros en medio TSB el cuál se procesó de la siguiente manera: 1) 1 litro se tindalizó, 2) 1 litro se trató con azida sódica, y 3) 8 litros fueron concentrados por filtración tangencial (FT). En todos los casos el cultivo se procesó de manera de obtener flagelina por ultracentrifugación como fuera descrito previamente. La flagelina obtenida fue cuantificada por el método del ácido bicinconínico

Como puede apreciarse, la manipulación del cultivo por filtración tangencial presentó el rendimiento más alto al comparar todos los procesamientos evaluados. Además, la utilización de este método permitió obtener 2,5 veces la cantidad de flagelina obtenida a partir del cultivo estático (17,4 mg/L vs. 6,8mg/L obtenidos en la sección anterior donde se determinó la condición de cultivo más adecuada) sin necesidad de procedimientos extra, ya que no se realizó el paso de agitación en vortex previo a la ultracentrifugación, sobre el cultivo concentrado por filtración tangencial. Posiblemente

esto se deba a las fuerzas de roce a las que se somete a las células durante la recirculación del cultivo, lo cual generaría un desprendimiento del flagelo mucho más eficiente que el procedimiento utilizado habitualmente. Por su parte, la fracción tratada con azida sódica presentó un rendimiento equivalente al obtenido realizando cultivo estático en la sección anterior (6,5 mg/L de cultivo tratado con azida vs. 6,8 mg/L de cultivo estático) por lo que puede concluirse que dicho tratamiento no afecta la recuperación de flagelo. No se observó lo mismo para la fracción sometida a tindalización, que presentó un rendimiento aún inferior a la mitad del tomado como referencia (2,6 mg/L vs. 6,8 mg/L de la condición estática de la sección anterior). Este resultado evidencia el efecto negativo del tratamiento térmico sobre la recuperación de flagelina, posiblemente debido a que los ciclos de calentamiento y enfriamiento despolimericen los flagelos, afectando la recuperación en el paso de centrifugación realizado para separar las bacterias.

Se analizó la actividad biológica de las flagelinas obtenidas con los distintos procedimientos empleando la línea reportera *Caco-cc/20:luciferasa* para descartar cualquier efecto que hubiesen podido generar los distintos tratamientos como se observó con el formol. En esta oportunidad todas las preparaciones de flagelina tuvieron capacidad de estimular las células y aumentar la expresión de luciferasa (**Figura 9a**). El análisis por SDS-PAGE de las suspensiones de flagelina obtenidas con los distintos protocolos mostró una única banda en todos los casos con el peso molecular esperado (**Figura 9b**) y, acorde con lo planteado, no se observó banda ni actividad biológica alguna en el permeado concentrado por ultracentrifugación (dato no mostrado). Esto resalta la necesidad de trabajar con una columna que permita no solo concentrar el cultivo sino que además impida la pérdida de flagelo. El análisis de las bandas por MALDI-TOF concluyó que se trataba de flagelina de *S. Typhimurium*.

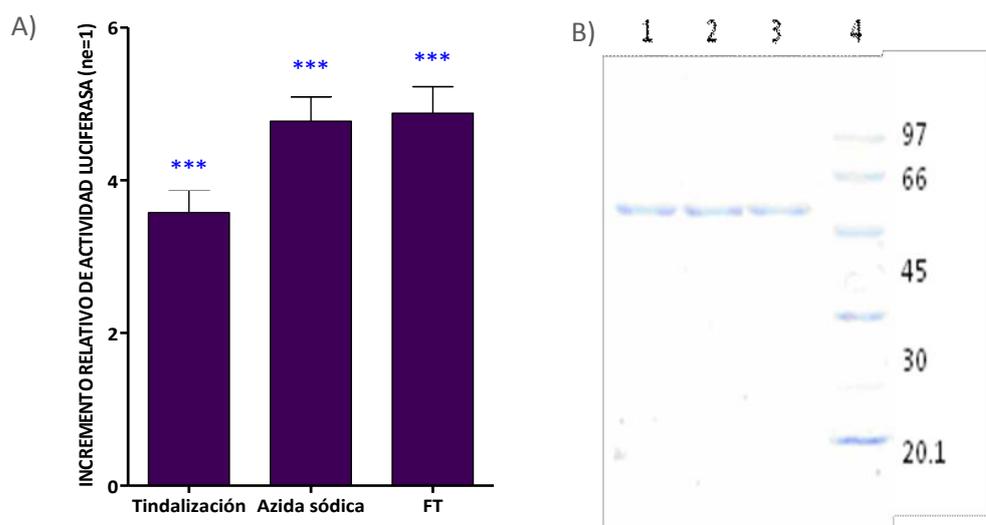


Figura 9: Caracterización de la flagelina obtenida por medio de los distintos métodos de procesamiento. A) Células caco-ccl20-luciferasa fueron estimuladas con flagelina 1ug/ml en placa de 48 fosas durante 6 horas y posteriormente se determinó actividad luciferasa en el lisado celular. Se muestra el promedio + SEM (n=3) analizados mediante ANOVA de una vía seguido de Test Tukey. ***= (P<0,001) comparado con el control sin estímulo. B) Análisis por SDS-PAGE de las distintas preparaciones. Se evidenció una única banda en todos los casos, que mostró un peso molecular coincidente con flagelina 1) Tindalización, 2) Azida sódica, 3) Filtración tangencial (FT), 4) patrones de peso molecular en KDa. Posteriormente el análisis por MALDI-TOF del material recuperado de cada banda resultó concluyente al determinar que correspondía a flagelina de *S. Typhimurium*.

La utilización de FT permite obtener cultivos concentrados con un volumen hasta 20 veces menor que el inicial. Esto facilita mucho la manipulación posterior de agitación y desprendimiento de los flagelos de la superficie bacteriana. Para evaluar la contribución de procedimientos posteriores a la FT en el rendimiento en flagelina se realizó un cultivo estático de *Salmonella* de 10 litros que, luego de ser concentrado por FT hasta alcanzar 1 litro, fue dividido en 3 fracciones que fueron procesadas de acuerdo a la **Figura 10**. En todos los casos los flagelos se recuperaron por ultracentrifugación y los pellets obtenidos fueron resuspendidos en PBS.

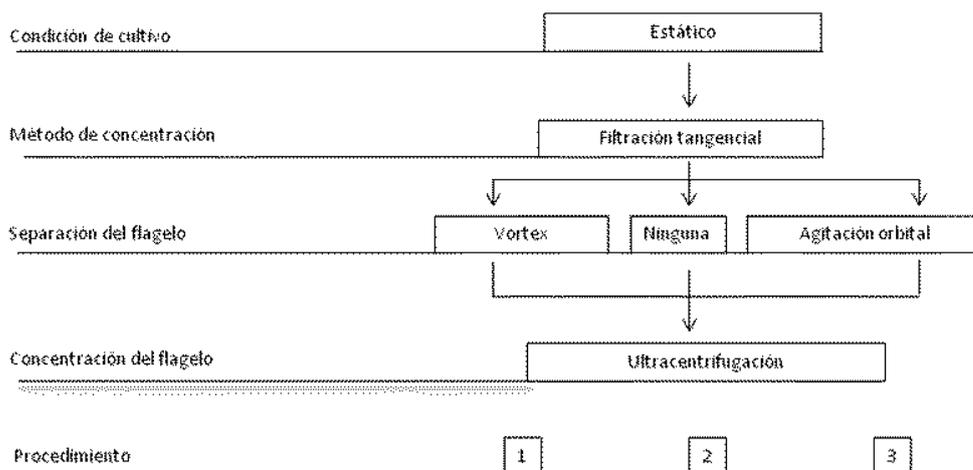


Figura 10 : Comparación de los distintos protocolos utilizados. El mismo cultivo se procesa paralelamente utilizando diferentes métodos para separar el flagelo luego de la filtración tangencial. En el procedimiento 1 la separación se realizó agitando en vortex, mientras que en el procedimiento 2 ningún procesamiento adicional fue realizado. En el procedimiento 3, se sometió el cultivo concentrado a agitación orbital durante 5 minutos a 420rpm. Finalmente se recuperaron los flagelos por ultracentrifugación.

Se determinó la actividad biológica de las fracciones de flagelina obtenidas empleando los distintos protocolos (**Figura 11a**) y se determinó la concentración de proteína en cada una de ellas por BCA (**Figura 11b**). Todas las fracciones presentaron actividad biológica comparable a la de flagelina obtenida con los protocolos habituales, de acuerdo a datos previos.

Como puede apreciarse, la fracción proveniente de aplicar el protocolo 1 (filtración tangencial + vortex) presentó el rendimiento más alto con 14 mg de proteína/L de cultivo, resultando más efectivo que el paso de agitación orbital utilizado en el protocolo 3 (11 mg/L). Por su parte, la fracción que surgió de ultracentrifugar el sobrenadante de filtración tangencial sin realizar otro procesamiento adicional presentó un rendimiento del 85% respecto del protocolo 1 (12 mg/L vs. 14 mg/L) y un rendimiento equivalente al protocolo 3. Este resultado evidencia la eficiente liberación de flagelos generada por el solo efecto de recircular el cultivo para concentrar la biomasa, lo que permitiría prescindir de tratamientos adicionales previos a la ultracentrifugación simplificando así el protocolo de purificación.

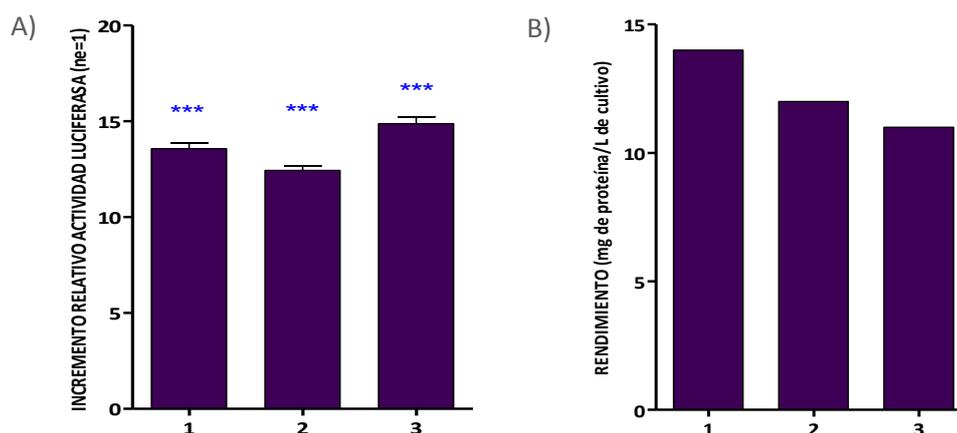


Figura 11: Comparación de los distintos protocolos utilizando procesamientos posteriores a la filtración tangencial. El mismo cultivo fue dividido en 3 fracciones y procesado de acuerdo a la Figura 10, A) Se midió actividad biológica de las suspensiones de flagelina obtenidas por los distintos protocolos. Células Caco-CCL20-luciferasa fueron estimuladas con 1ug/ml de flagelina y se midió actividad luciferasa a las 6 hs en el lisado. B) Se cuantificó proteína por BCA y se determino el rendimiento, expresando el resultado como mg de proteína/L de cultivo. En ambas figuras los números en el eje horizontal hacen referencia al protocolo utilizado. En la figura A se representa el valor medio + SEM analizados mediante ANOVA de una vía seguido de un Test Tukey. ***= (Pvalue<0,001)

Teniendo en cuenta que la concentración del cultivo por filtración tangencial impide la pérdida de flagelina a pesar de la liberación de flagelo generada durante la recirculación, se decidió combinar este método de concentración con distintas condiciones de cultivo que favorecieran la obtención de biomasa. Se realizaron cultivos bajo distintas condiciones: estática, aireada 10L/min, y aireada con agitación 10L/min 420rpm. En todos los casos se midió la DO del cultivo para independizar el rendimiento en flagelina del rendimiento en biomasa. Los cultivos se procesaron por filtración tangencial y posteriormente se ultracentrifugó el sobrenadante, sin realizar tratamientos intermedios para separar el flagelo, de manera similar al procedimiento 2 de la **Figura 10**. Al igual que en los análisis anteriores, se calculó el rendimiento de los distintos procedimientos como mg de FliC/litro de cultivo. La condición utilizando aireación combinado con agitación presentó el rendimiento más alto en flagelina significando 2,5 veces el rendimiento del cultivo estático y 1,5 veces el rendimiento del cultivo aireado

(Tabla 1). La cantidad de biomasa obtenida en el cultivo aireado y agitado no resulto muy diferente a la obtenida cultivando las bacterias sólo con aireación, aunque sí hubo un incremento en el rendimiento en flagelina de alrededor de un 50% respecto de esta condición. Esto podría deberse a que las fuerzas de corte a las que resultan expuestas las células en un cultivo aireado y agitado generen una pérdida de flagelo mayor que obligaría a las bacterias a sintetizar más flagelo para contrarrestar esta situación.

Tabla 1: Se muestran los rendimientos en flagelina de cultivos realizados bajo diferentes condiciones y procesados mediante filtración tangencial

Cultivo estático	72 hs 37°C	35 lts DO ₆₅₀ final=2,27	Proteína 12 +/- 0,5 mg/L
Cultivo aireado	10L/min 3 hs 37°C	10 lts DO ₆₅₀ final=2,5	Proteína 20,0 +/- 0,9 mg/L
Cultivo aireado y agitado	10L/min 420 rpm 2hs 45' 37°C	10 lts DO ₆₅₀ final=2.8	Proteína 29,9 +/- 0,8 mg/L

En base a todos los resultados puede apreciarse que el protocolo que resultó más efectivo en cuanto a rendimiento y simplicidad fue aquel que resultó de combinar el crecimiento del cultivo en agitación y aireación, con la concentración por filtración tangencial y posterior ultracentrifugación del sobrenadante sin realizar procedimientos extra para desprender los flagelos. Este protocolo permite alcanzar rendimientos aproximadamente cuatro veces mayores a los obtenidos realizando un cultivo en condición estática, recomendada habitualmente para evitar el desprendimiento de flagelo, seguido de agitación en vortex.

Habiendo optimizado un protocolo que permite la obtención de grandes cantidades de flagelina, todos los ensayos posteriores se realizaron con flagelina obtenida de esta manera.

I.II.III DETOXIFICACIÓN

Al momento de planificar ensayos *in vivo* para comparar la actividad biológica desencadenada por la flagelina obtenida usando el nuevo protocolo con la obtenida en el

laboratorio, una fracción de cada flagelina debió detoxificarse. Como se mencionó anteriormente, la disminución de la carga de pirógenos en las muestras resulta primordial a la hora de evaluar actividad biológica debido a que el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de bacterias gram negativas también es un agonista de la inmunidad innata, por ser capaz de desencadenar una respuesta a través del receptor TLR-4, tal como se describió en la introducción general.

La detoxificación consistió en una cromatografía utilizando polimixina B-sepharosa. La polimixina B es un antibiótico con afinidad por el LPS y es empleada habitualmente con esta finalidad. Este procedimiento permite minimizar la presencia de LPS, contaminante habitual de las preparaciones de flagelina. Posteriormente, se determinaron los niveles de endotoxina mediante el Test de LAL (“USP 27/NF22” <85> Lisado de amebocitos del cangrejo herradura *Limulus*) de punto final en su versión gel-clot, utilizando un reactivo con una sensibilidad de 0,125UE/ml (**Figura 12a**). Por otra parte, con la flagelina obtenida con el nuevo protocolo se realizó un Test de pirógenos en conejos (“USP 27/NF22” <151>) el cual consiste en inyectar un lote de animales con la muestra problema y evaluar el incremento de temperatura corporal en comparación con la temperatura control tomada de manera previa a la inyección (**Figura 12b**). Aquellas muestras para las que se observa un incremento menor a 0,5°C en todos los animales del lote se considera que cumplen con el ensayo. Los resultados negativos de ambas pruebas demuestran la disminución de los niveles de pirógenos en la flagelina detoxificada lo que nos permite confiar en el procedimiento realizado y, de esta manera, planificar los ensayos *in vivo* que se requieran.

A fin de comparar la actividad biológica de las preparaciones de flagelina obtenidas con el protocolo de laboratorio o con el nuevo protocolo a gran escala se realizaron ensayos de estimulación de la inmunidad innata utilizando *cc/20* como marcador. Lotes de ratones Balb/C fueron estimulados por vía IP o IN con flagelina obtenida en el laboratorio (FliC LISIN) o con el protocolo a gran escala (FliC BIOL) y al cabo de 2 horas el hígado o el pulmón izquierdo, según correspondiese, fueron utilizados para el análisis de la expresión relativa de *cc/20* respecto a un control que recibió PBS libre de pirógenos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 13**. La flagelina obtenida con el nuevo

protocolo mostró una actividad biológica comparable a la flagelina obtenida en el laboratorio con los protocolos previamente descritos. Para ambas muestras la actividad biológica fue significativa respecto al lote control al que se le administró PBS.

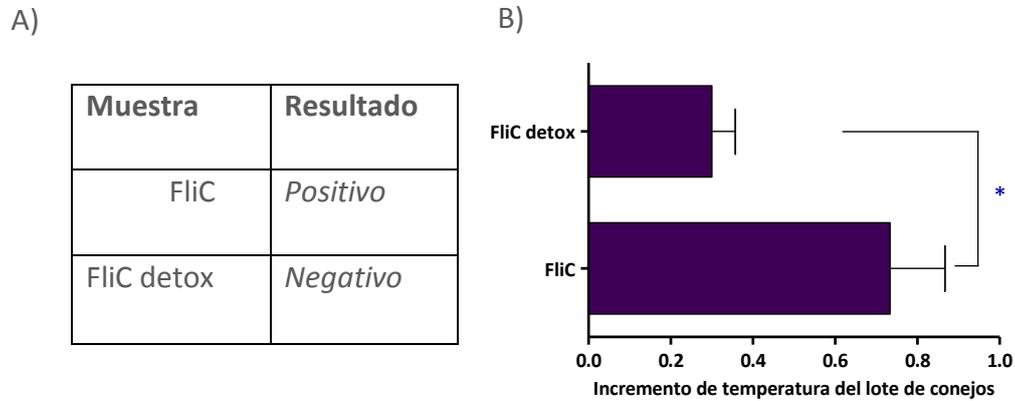


Figura 12: Evaluación del proceso de detoxificación utilizando columnas de polimixina B.

A) Las muestras detoxificadas y sin detoxificar (50µg/ml) fueron analizadas mediante Test de Limulus (USP<85>) en un ensayo de punto final gel clot. Luego de incubar las muestras 1 hora a 37°C con el reactivo de Limulus se evalúa la formación de coágulo en cada tubo. Aquellos tubos que evidencien la formación de coágulo tienen un nivel de endotoxina mayor a la sensibilidad del reactivo utilizado B) Grupos de conejos fueron estimulados por la vena de la oreja con la flagelina detoxificada (FliC detox) o sin detoxificar (FliC). Cada conejo recibió 100 µg de la muestra y se evaluó el incremento de temperatura a intervalos de media hora durante 3 horas. (n=3). La flagelina detoxificada cumplió con el ensayo al no generar un incremento de temperatura mayor a 0,5°C en ninguno de los animales inyectados. Se muestra el promedio ± SD analizado por un t Test ($P < 0,05$)

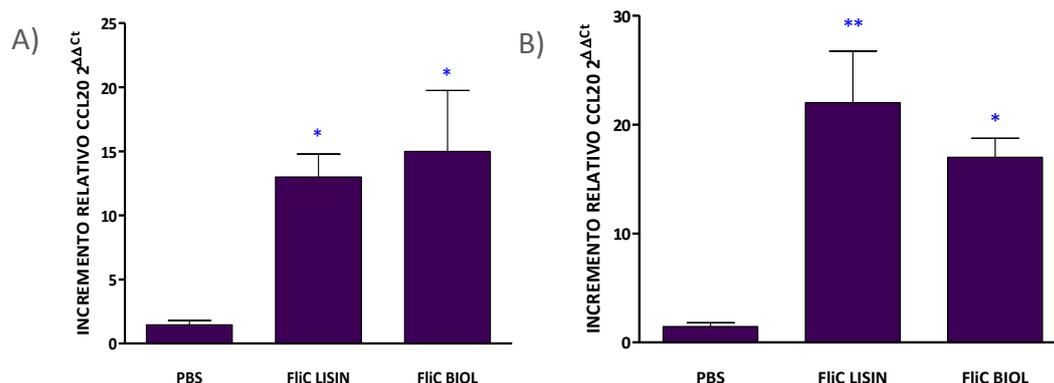


Figura 13: La flagelina obtenida por el protocolo de producción a gran escala tiene bioactividad comparable a la obtenida por el protocolo de laboratorio. A) Expresión de CCL20 en hígado murino. Los ratones fueron estimulados por vía intraperitoneal con 10 μ g de flagelina detoxificada en PBS libre de pirógenos y 2 h más tarde la expresión relativa de CCL20 fue evaluada mediante RT-qPCR (n = 3). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. B) Expresión de CCL20 en pulmón murino. Los ratones fueron estimulados con 1 μ g de flagelina detoxificada en PBS libre de pirógenos por vía intranasal. Luego de 2 hs se quitó el pulmón izquierdo y los niveles de expresión de CCL20 relativos se analizaron mediante qPCR (n = 3). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. Se indican diferencias significativas con el control de PBS. * = (P<0.05), ** = (P< 0.01) ANOVA de una vía seguido de test Tukey. No se encontraron diferencias significativas entre los estímulos evaluados.

Si bien el procedimiento resultó ser exitoso para la disminución de los niveles de endotoxinas en las muestras, un efecto colateral indeseado fue la disminución del rendimiento en flagelina. Esto podría deberse a que flagelina interaccione de manera inespecífica con la polimixina B o que la proteína interaccione fuertemente con el LPS y quede retenida junto a él en la resina. De cualquier manera, para superar este inconveniente se planteó una estrategia basada también en cromatografía de afinidad pero, ésta vez, utilizando anticuerpos anti-flagelina.

La utilización de anticuerpos monoclonales anti-flagelina permitiría además el escalado del proceso de detoxificación, acompañando el cambio de escala en la producción de flagelina descripto anteriormente.

I.III DESARROLLO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-FLAGELINA: HERRAMIENTAS ÚTILES PARA SU PRODUCCIÓN Y ESTUDIO

Con el objetivo de generar anticuerpos monoclonales (AcMos) anti-flagelina que pudiesen ser utilizados en cromatografía de afinidad, se realizaron inmunizaciones en ratones Balb/c (3 administraciones de: 1ug de flagelina ó 1ug de flagelina + hidróxido de aluminio). Dosis de flagelina más altas y otros adyuvantes fueron utilizados pero resultaron muy agresivos para los animales. Previo al sacrificio y extracción de bazo para la fusión, se evaluó el título de anticuerpos séricos anti-flagelina para comprobar la eficacia del protocolo de inmunización. El título de los animales inmunizados sólo con flagelina fue similar al de aquellos a los que se les administró flagelina acompañada de hidróxido de aluminio, lo que puso una vez más en evidencia la gran inmunogenicidad de esta proteína. La generación de hibridomas se llevó a cabo utilizando el protocolo previamente descrito¹⁶⁴.

Los hibridomas se crecieron en medio selectivo y se determinó la presencia de clones secretores de anticuerpos anti-FliC por ELISA indirecto. Las fosas positivas fueron subclonadas por dilución y de esta manera pudieron establecerse 4 clones productores de AcMos anti-flagelina que se denominaron 5B4H2, 2D11A1, 2B3C5 y 4C1H7. Se determinó mediante ELISA el isotipo de los hibridomas, siendo IgG2a el isotipo para 2D11A1 mientras que 2B3C5, 4C1H7 y 5B4H2 fueron IgG1. En la **Figura 14** se muestran los resultados para ensayos de western blot anti-flagelina realizados con los 4 monoclonales obtenidos.

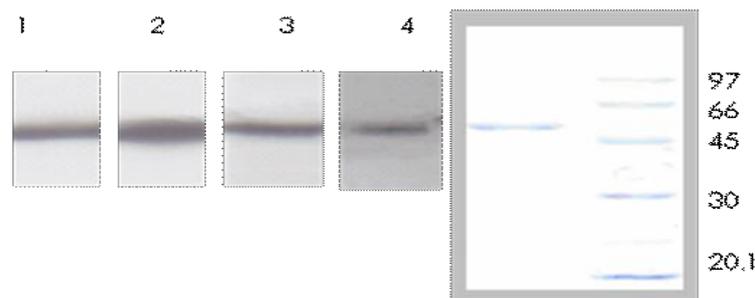


Figura 14: Reactividad de los anticuerpos monoclonales frente a flagelina de *Salmonella Typhimurium* evaluada mediante Western-blot. Se realizó una corrida electroforética de flagelina y se transfirió a membrana de nitrocelulosa; en cada calle se utilizó uno de los monoclonales como anticuerpo primario 1) 5B4H2, 2) 2D11A1, 3) 2B3C5 y 4) 4C1H7 mientras que el revelado se realizó en todos los casos con un anticuerpo anti-IgG murino conjugado a peroxidasa. Hacia la derecha se muestra un SDS-PAGE de flagelina acompañado de patrones de peso molecular revelado con Coomassie Blue.

I.III.I CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

La estructura de flagelina presenta dominios conservados entre especies integrados por los extremos N- y C-terminal y dominios hipervariables D2 y D3 mayormente inmunogénicos y contra los que se genera la mayor proporción de anticuerpos.

Nuestro grupo dispone de una flagelina recombinante que carece del dominio antigénico denominada C131¹⁶⁵ obtenida a partir de una colaboración con el laboratorio del Dr. Sirard (Instituto Pasteur de Lille). Esta variante de flagelina tiene un peso molecular menor que la flagelina salvaje. Ambas variantes se utilizaron para evaluar la reactividad de los anticuerpos obtenidos. Mediante ELISA indirecto se determinó que los anticuerpos reconocen distintos dominios en la estructura de flagelina, dado que 2B3C5 y 4C1H7 reconocieron ambas proteínas mientras que 5B4H2 y 2D11A1 mostraron reactividad solo frente a la flagelina completa (**Figura 15**). En base a los resultados puede suponerse que estos últimos reconocen epítopes presentes en el dominio antigénico de flagelina.

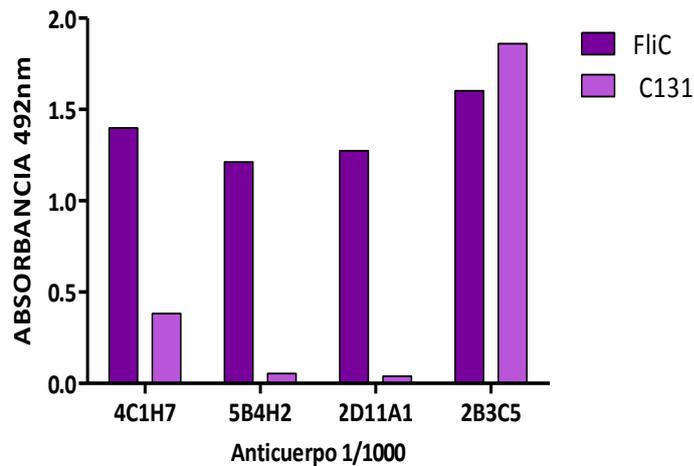


Figura 15: Caracterización del reconocimiento de los AcMos. Mediante ELISA indirecto se analizó el reconocimiento de regiones conservadas o hipervariables evaluando la reactividad cruzada frente a la molécula de flagelina completa (FliC) o a una molécula corta que carece del dominio antigénico (C131). Los anticuerpos se utilizaron a una dilución 1/1000.

Se realizó un ensayo de bloqueo de actividad biológica sobre la línea reportera Caco-cc/20:luciferasa para evaluar si la unión de los anticuerpos monoclonales afectaba el reconocimiento del sitio de interacción con TLR-5. Previo a la estimulación de las células se incubó la flagelina con distintas diluciones de los anticuerpos 4C1H7, 2B3C5 y 5B4H2. La actividad luciferasa se midió luego de 6hs de estimulación. En la **Figura 16** puede observarse que los anticuerpos 2B3C5 Y 4C1H7 fueron capaces de impedir la estimulación de las células. Esta capacidad de bloquear la actividad agonista de la flagelina disminuye a mayores diluciones de los anticuerpos. Este resultado coincide con lo desprendido de la **Figura 15** en cuanto a que 2B3C5 y 4C1H7 reconocen regiones conservadas de la molécula de flagelina.

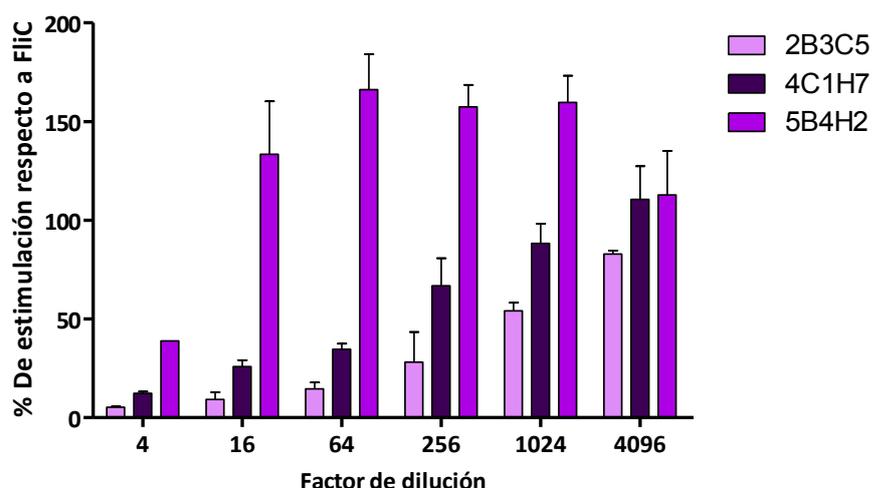


Figura 16: Análisis de la capacidad de bloqueo de la actividad biológica de flagelina. Células Caco-*cc120*-luciferasa fueron estimuladas en placa de 48 fosas con 150 ng de flagelina pre-incubados con distintas diluciones de los anticuerpos. Los resultados corresponden a triplicados \pm SD y se muestran como porcentaje de estimulación respecto a la desencadenada por 150 ng de flagelina/fosa.

El resultado observado para 5B4H2 resulta llamativo dado que parece aumentar la capacidad estimuladora de la dosis de flagelina utilizada. Tal vez el anticuerpo al unirse genera oligómeros de flagelina que podrían interaccionar mejor con el receptor, tal como se discutió en la introducción del presente capítulo.

Para continuar con el análisis de los dominios de flagelina reconocidos por los anticuerpos se decidió realizar un ensayo que permitiese evaluar el solapamiento de epitopes. Para esto los AcMos fueron conjugados a biotina y mediante ELISA competitivo se evaluó el desplazamiento del anticuerpo conjugado.

En la **Figura 17** puede apreciarse que el anticuerpo 4C1H7 reconocería un epitope distinto al reconocido por los demás anticuerpos, dado que no es capaz de desplazar a los otros anticuerpos biotinilados. El anticuerpo 2B3C5 no es capaz de desplazar al 4C1H7 biotinilado, confirmando que ambos anticuerpos reconocen epitopes diferentes. Sin embargo, se observa un desplazamiento parcial del 4C1H7 por parte de 2D11A1 y 5B4H2, lo cual deja abierta la posibilidad de un solapamiento parcial de los epitopes reconocidos

por estos anticuerpos o una proximidad de los mismos que genere interferencias estéricas en la unión de un segundo anticuerpo a su epítope correspondiente.

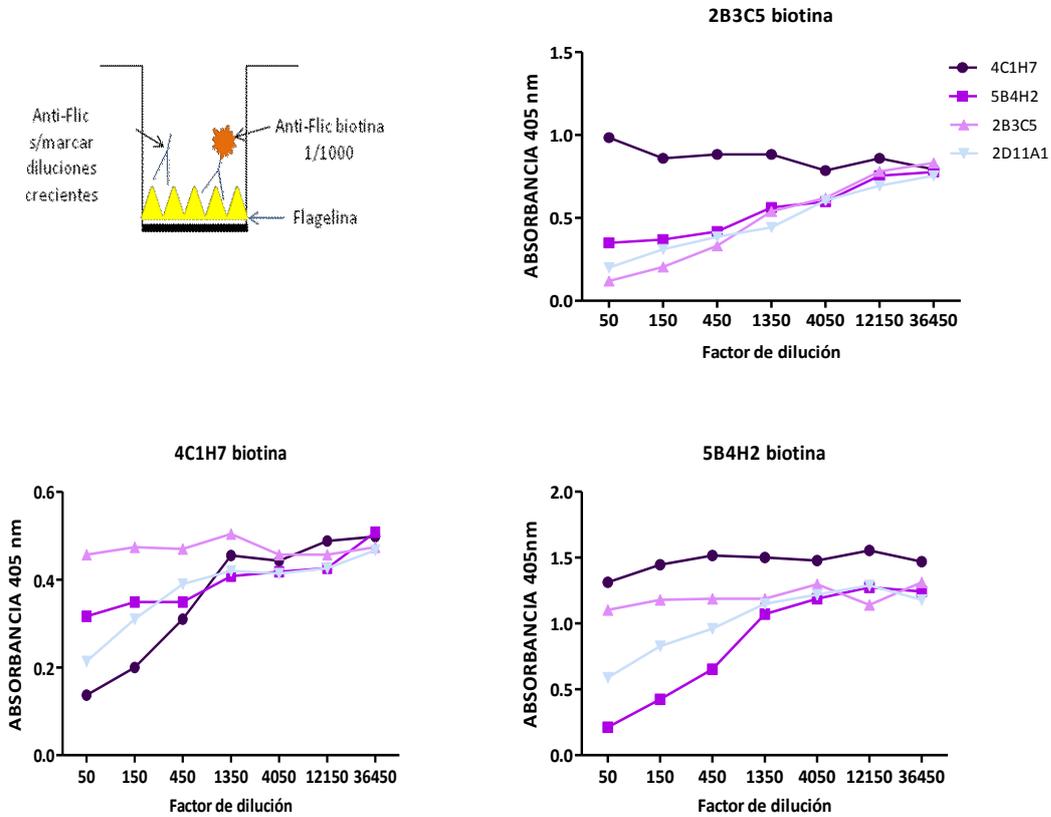


Figura 17: Análisis de los epítopes reconocidos por los AcMos. Los anticuerpos fueron conjugados con biotina y mediante ELISA competitivo se evaluó el reconocimiento de epítopes solapados. A) Se muestra un esquema del ensayo realizado, placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con flagelina, el anticuerpo biotinilado se utilizó 1/1000 frente a diluciones crecientes de los anticuerpos sin marcar. Paneles B, C y D) Se muestra la absorbancia a 405 nm correspondiente a cada anticuerpo biotinilado. La disminución de este parámetro evidencia un desplazamiento del anticuerpo biotinilado por parte del anticuerpo co-incubado sin marcar.

El anticuerpo 2B3C5 tampoco desplaza a 5B4H2 biotinilado, sin embargo los anticuerpos 5B4H2 y 2D11A1 fueron capaces de desplazar a 2B3C5 biotinilado, indicando una particular relación espacial de los epítopes reconocidos por estos anticuerpos. El anticuerpo 5B4H2 biotinilado es mínimamente desplazado por el anticuerpo 2D11A1 y no por los otros anticuerpos probados, indicando el reconocimiento de epítopes diferentes.

I.III.II POSIBLES APLICACIONES EN SEROTIPIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, el flagelo bacteriano posee regiones conservadas (entre ellas el dominio de interacción con TLR5) y regiones hipervariables en longitud y secuencia que difieren entre especies. Teniendo en cuenta el hecho de que algunos de los AcMo obtenidos reconocen secuencias conservadas en la estructura de flagelina, nos propusimos determinar si los mismos presentaban especificidad por la flagelina utilizada en su generación o eran capaces de reconocer flagelinas provenientes de microorganismos pertenecientes a otras especies. Se obtuvieron suspensiones de flagelina mediante el protocolo de laboratorio a partir de las siguientes especies: *S. marsescens*, *P. aeruginosa* y *B. cereus*. La flagelina obtenida de *B. japonicum* fue cedida generosamente por la Dra. Althabegoiti (IBBM-Conicet). El resultado del análisis mediante ELISA indirecto se muestra en la **Figura 18**.

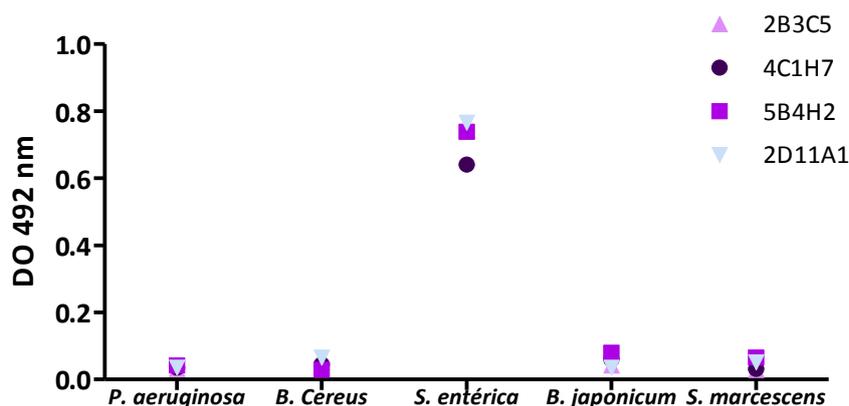


Figura 18: Evaluación del reconocimiento de flagelinas pertenecientes a otras especies. Mediante ELISA indirecto se evaluó la reactividad de los anticuerpos frente a flagelina obtenida de *P. aeruginosa*, *S. marsescens*, *B. cereus*, *S. entérica* y *B. japonicum*. Todos los AcMo mostraron reactividad sólo frente a flagelina obtenida de *Salmonella entérica*.

Todos los anticuerpos obtenidos reconocieron únicamente flagelina proveniente de *Salmonella entérica*.

El avance en la caracterización de la reactividad de los AcMos dio origen a la tesis de grado de la Lic. Sofía Sampaolesi, la cual se realizó bajo la dirección de la Dra. María Serradell y la tutoría de quien escribe.

En dicho trabajo, utilizando 8 aislados de *Salmonella* provenientes del cepario del CIDCA y de la Cátedra de Microbiología FCE-UNLP, pudo comprobarse mediante western blot y ELISA indirecto que los anticuerpos 5B4H2 y 2D11A1 presentan una alta reactividad específica para *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, en vista de que no mostraron reactividad frente a flagelina proveniente de otros serotipos incluidos en el ensayo como *S. entérica* serovar Newport, *S. Saintpaul* y *S. Enteritidis*. Por su parte, los anticuerpos 2B3C5 y 4C1H7 que habían mostrado capacidad de reconocer tanto la flagelina completa como la versión recombinante más corta, mostraron reactividad mediante ensayo de ELISA y westernblot frente a varias flagelinas obtenidas de serotipos distintos a Typhimurium.

A partir de los resultados obtenidos podría concluirse que los AcMos 2B3C5 y 4C1H7 estarían dirigidos contra la porción constante de la flagelina de *Salmonella* y son por ello capaces de reconocer flagelina purificada de diferentes serotipos de *Salmonella*, pero no así flagelina purificada de otros géneros bacterianos. Por otra parte, los AcMo 5B4H2 y 2D11A1, específicos en el reconocimiento de flagelina de *S. Typhimurium* e incapaces de reaccionar con flagelina perteneciente a otros serotipos de *Salmonella entérica*, estarían dirigidos contra el dominio hipervariable de la flagelina de *Salmonella* serotipo Typhimurium.

Estos resultados nos permitieron evaluar posibles aplicaciones para estos anticuerpos monoclonales aparte de la idea original que motivase su obtención.

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos de cepa para ser usados en serotipificación presenta importantes ventajas como el hecho de utilizar un reactivo homogéneo (en contraparte a los antisueros obtenidos con el microorganismo completo), que puede obtenerse en grandes cantidades y sin restricciones¹⁶⁶.

La aglutinación es un método de diagnóstico rápido que puede realizarse en placa o en tubo y resulta la técnica elegida por varios Centros Nacionales de Referencia

Microbiológica para serotificación. La capacidad de aglutinación de un anticuerpo depende de la distribución de epitopes en la superficie como así también la accesibilidad de estos epitopes, factores que no son fácilmente caracterizados.

Considerando que 2 de los anticuerpos analizados mostraron reactividad por la región hipervariable, se decidió realizar un ensayo de aglutinación para seleccionar aquél que pudiese tener utilidad para el desarrollo de un método diagnóstico. Para esto se ensayó la capacidad de aglutinación en portaobjetos de los anticuerpos monoclonales 2B3C5, 5B4H2 y 4C1H7 sobre el panel de 8 aislados de *Salmonella* mencionados anteriormente. En todos los casos se utilizó la cepa de *S. Typhimurium* SIN41 no flagelada como control negativo¹⁴³.

Los anticuerpos 2B3C5 y 4C1H7 no mostraron capacidad aglutinante sobre ninguna de las cepas evaluadas mientras que el 5B4H2 mostró capacidad aglutinante específica de *Salmonella* Typhimurium, como pudo concluirse en vista de la ausencia de cúmulos en las fosas donde se incubó el anticuerpo con *Salmonella* de serotipos distintos a Typhimurium incluidas en el ensayo.

En la **Figura 19** se muestran fotografías obtenidas en microscopio de fluorescencia de las bacterias marcadas incubadas con los AcMos. La foto A es representativa del resultado obtenido para 5B4H2 sobre *Salmonella* Typhimurium donde la aglutinación se evidenció por la formación de cúmulos densos de bacterias en todo el campo analizado. Por su parte, la foto B es representativa del resultado que se obtuvo luego de la incubación de los anticuerpos 2B3C5 o 4C1H7 con cualquiera de las bacterias ensayadas. En todos los casos se observó un césped continuo de bacterias aisladas al igual que con la cepa no flagelada SIN 41 utilizada como control negativo.

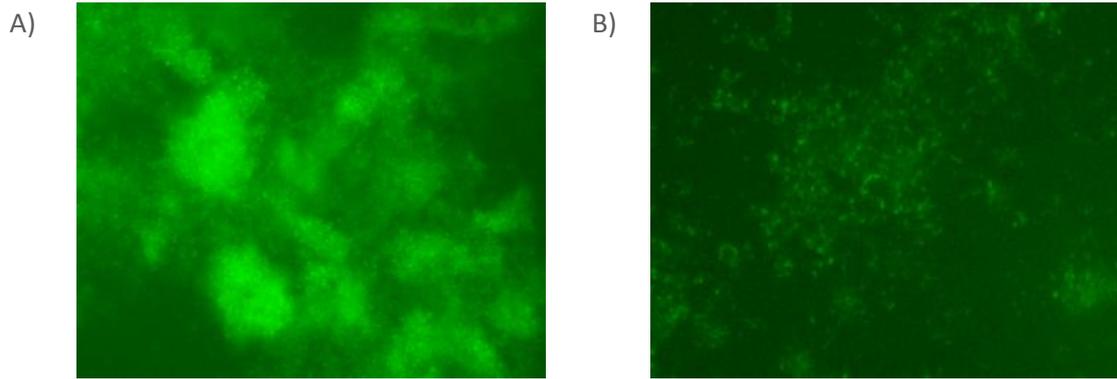


Figura 19: Ensayo de aglutinación de *Salmonella typhimurium* con los anticuerpos monoclonales Se muestran microfotografías de cultivos de *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium SIN22, marcados con diacetato de carboxifluoresceína e incubados con una suspensión 1:10 del anticuerpo monoclonal. Las imágenes fueron tomadas en microscopio de fluorescencia con un aumento 40X **A)** Imagen representativa del resultado obtenido con el AcMo 5B4H2 sobre *S. Typhimurium*. Se aprecian cúmulos bacterianos extensos y densos, fácilmente distinguibles. Para el resto de los serotipos ensayados no se observó aglutinación, **B)** Imagen representativa del resultado obtenido con los AcMos 2B3C5 y 4C1H7 sobre todas las bacterias ensayadas, donde se observa un césped regular de bacterias aisladas comparable al obtenido con la cepa no flagelada *S. Typhimurium* SIN41 que fue utilizada como control en todos los casos.

Anteriormente se describió la estructura de flagelina y la ubicación en el flagelo de los dominios que la componen. Cabe recordar que los dominios D0 y D1 que contienen las regiones conservadas N y C terminal se ubican hacia el interior del flagelo mientras que las regiones hipervariables están expuestas en la superficie del flagelo y, por ende, de la bacteria. Mediante ELISA indirecto pudo determinarse que los anticuerpos 2B3C5 y 4C1H7 presentan reactividad tanto frente a la flagelina completa como a una variante más corta (FliC Δ 201-368 denominada C131) carente del dominio antigénico mientras que 5B4H2 y 2D11A1 solo reconocieron la flagelina completa. Estos resultados sugieren que 2B3C5 y 4C1H7 reconocen regiones conservadas del monómero de flagelina mientras que 5B4H2 y 2D11A1 estarían orientados al dominio antigénico. Tomados juntos, estos datos explicarían los resultados obtenidos en el ensayo de aglutinación donde solo el anticuerpo 5B4H2 mostró capacidad para aglutinar las bacterias. Las zonas de la molécula de flagelina reconocidas por los anticuerpos 2B3C5 y 4C1H7 se ubican hacia el

interior del flagelo polimerizado por lo que resultan inasequibles, imposibilitando el aglutinamiento.

Con el objetivo de ahondar en la caracterización de la especificidad para *Salmonella* Typhimurium mostrada por el anticuerpo 5B4H2 se estableció una colaboración con el Centro Nacional de Salmonella ubicado en el Instituto de Higiene en Montevideo, Uruguay. El trabajo consistió en enfrentar el anticuerpo a un importante número de Salmonellas fehacientemente caracterizadas dada su condición de Centro de Referencia (Tabla 1 Materiales y Métodos). En principio se evaluó la capacidad de aglutinación de los monoclonales frente a Salmonella de los serotipos Typhimurium y Frankfurt, los cuales comparten el antígeno flagelar de fase 1 (i). Las cepas fueron crecidas en condiciones que promovieran la expresión del flagelo de fase 1. Como se muestra en la **Tabla 2** el anticuerpo 5B4H2 fue el único con capacidad de aglutinación bacteriana basada en el antígeno flagelar i aún utilizando diluciones mayores a 1/1000.

En vista de este resultado se seleccionó el anticuerpo 5B4H2 para realizar pruebas de aglutinación utilizando serotipos de Salmonella que expresen antígenos H distintos al i además de diferentes antígenos O comparados con Typhimurium (por ejemplo Infantis, Makiso, Newport y Paratyphi B). Las cepas seleccionadas fueron Newport, Infantis, Makiso, Paratyphi B, Derby y Enteritidis que expresan los factores flagelares 1,2, r, z6, 1,2, f,g, and g,m respectivamente.

Para la evaluación de la especificidad de reconocimiento de los distintos serotipos se comenzó utilizando diluciones bajas del anticuerpo, usualmente 1/10, y si se apreciaba algún indicio de aglutinación se incrementaban las diluciones hasta 1/1000. Los resultados mostrados en la **Tabla 3** indican que 5B4H2 tuvo una buena especificidad por el antígeno flagelar i, a pesar de que se observó reactividad cruzada con los factores 1,2 a diluciones 1/20 o más bajas del anticuerpo.

Tabla 2: Aglutinación en portaobjetos utilizando *Salmonella* serovars Typhimurium o Frankfurt

Typhimurium						
AcMo	Puro	1/10	1/100	1/800	1/1000	1/1200
5B4H2			+	+	+	+-
2B3C5	-	-				
4C1H7	-	-				
Frankfurt						
AcMo	Puro	1/10	1/100	1/800	1/1000	1/1200
5B4H2			++	+	+-	-
2B3C5	-	-				
4C1H7	-	-				

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) fueron usados puros o a las diluciones indicadas. ++: aglutinación positiva intensa, +: aglutinación positiva, -: aglutinación negativa, +-: indeterminado.

Tabla 3: Ensayo de aglutinación en portaobjetos con el AcMo 5B4H2 utilizando serovars de *Salmonella* que expresan otros antígenos H además de i

Serovar	1/10	1/20	1/50	1/100	1/400	1/1000
Infantis	-					
Makiso	-					
Newport	++	+	-	-	-	-
Paratyphi B	+	+-	-	-	-	-
Enteritidis	-					
Derby	-					

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) fueron usados a las diluciones indicadas. ++: aglutinación positiva intensa, +: aglutinación positiva, -: aglutinación negativa, +-: indeterminado.

A pesar de haber sido descritos más de 2500 serovars distintos, *S. Typhimurium* es uno de los serotipos de *Salmonella* más relevantes principalmente porque está involucrado en enfermedades transmitidas por alimentos. En un estudio reciente a nivel mundial cubriendo las infecciones por *Salmonella* en 37 países participantes¹⁶⁷ se reportó que *S. serovar Typhimurium* ha sido responsable de alrededor del 17% de las infecciones de *Salmonella* reportadas entre 2001 y 2007, con una distribución similar a lo largo de diferentes continentes, con excepción de Oceanía, donde representó más del 50% de los casos reportados en el período estudiado. A lo largo del período analizado, se observó un aumento en la incidencia de este serovar en los países en desarrollo.

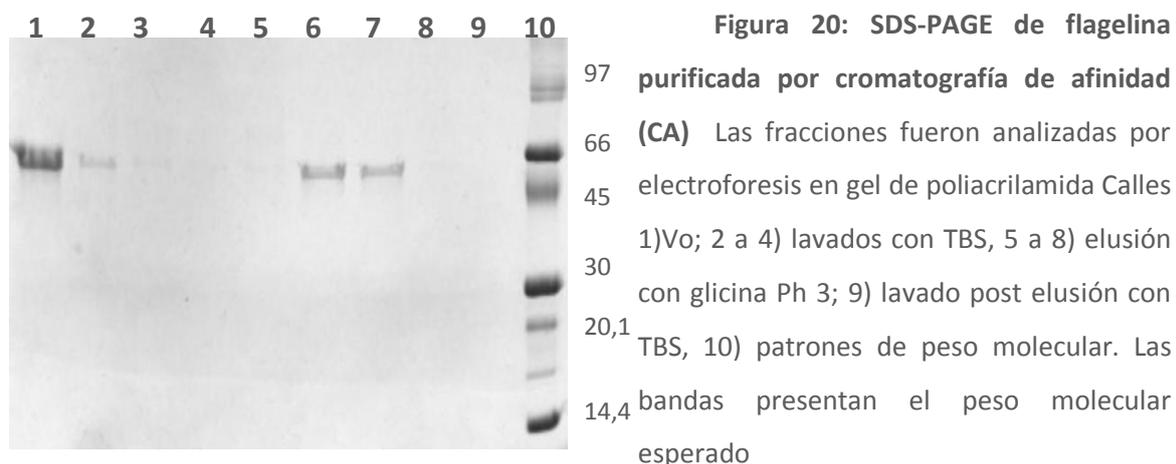
Considerando esta información resulta de importancia haber podido seleccionar entre los anticuerpos monoclonales generados uno con especificidad para *Salmonella Typhimurium* y otros serotipos expresando el antígeno flagelar i, además de demostrar que este AcMo es adecuado para ser utilizado en pruebas de aglutinación para la identificación de *S. Typhimurium*. Esto constituiría una herramienta valiosa para identificar aislamientos de casos clínicos u otras muestras contribuyendo a prevenir la diseminación de salmonelosis.

I.III.III DETOXIFICACIÓN DE FLAGELINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD UTILIZANDO ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-FLAGELINA

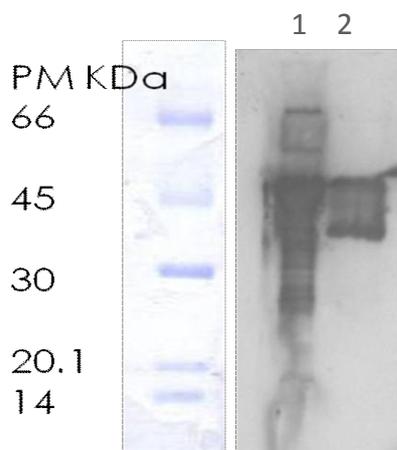
Cuando se plantea el desarrollo de una herramienta para ser utilizada dentro de un protocolo de purificación resulta lógico pretender que dicha herramienta tenga una aplicación lo más amplia posible. En este sentido, al momento de seleccionar un anticuerpo del panel obtenido para utilizarlo en cromatografía de afinidad para detoxificar flagelina decidimos emplear el 2B3C5, dado que había mostrado reactividad frente a regiones conservadas de la flagelina (**Figura 15**) y resultó capaz de reconocer flagelinas provenientes de distintos serotipos de *Salmonella* mediante WB o ELISA indirecto.

El anticuerpo 2B3C5 fue conjugado covalentemente a una resina de sefarosa activada y el producto resultante se utilizó para despirogenar flagelina de *Salmonella Typhimurium* por cromatografía de afinidad en batch. El resultado de la purificación se

analizó por SDS-PAGE (**Figura 20**). Las calles correspondientes a la fracción no unida (V_0) y a las fracciones eluídas mostraron una banda del peso molecular esperado para flagelina. La presencia de una banda en la fracción no unida evidencia la saturación de la resina por lo que debió ajustarse la relación muestra/resina utilizada.



El análisis por SDS-PAGE sirve para analizar la eficiencia de la cromatografía en cuanto al pegado y recuperación de la flagelina en el proceso, pero nada nos dice en cuanto a la separación del LPS. Para evaluar la eficiencia de la cromatografía de afinidad como método de despirogenado se realizó un western blot de la flagelina pre y post-purificación por columna de afinidad utilizando un suero murino obtenido con flagelina cruda (**Figura 21**)



En la calle 1, correspondiente a flagelina cruda, puede observarse un perfil de bandas indefinido por encima y por debajo del peso molecular correspondiente a flagelina. Estas bandas, reconocidas por el antisuero murino, corresponden al LPS presente en la muestra antes de la detoxificación y su diferencia de tamaño se debe a la longitud de las cadenas de glicanos presentes en esta molécula (antígeno O). La ausencia de estas bandas luego de la cromatografía de afinidad (calle 2) sumado a un resultado negativo del Test de Limulus nos permite concluir que el método resultó efectivo para la eliminación de pirogenos de la muestra. Las bandas de la calle 2 que permanecieron luego de la cromatografía de afinidad corresponden a flagelina, posiblemente originadas por proteólisis parcial que no afecta la región reconocida por el AcMo.

I.III.IV EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE FLAGELINA EN DISTINTAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Como hemos mencionado anteriormente, el interés puesto en flagelina como potencial adyuvante mucosal gracias a su capacidad agonista del sistema inmune innato genera expectativas, resultando de interés su producción y almacenamiento. Pensando en una cadena de distribución resulta importante conocer la estabilidad de flagelina. Considerando esto se decidió evaluar la estabilidad de flagelina a distintas temperaturas de almacenamiento (-20°C, 4°C y 25°C) durante distintos tiempos. La estabilidad de flagelina se evaluó mediante determinación de actividad biológica sobre células Caco-ccl20-luciferasa y SDS-PAGE. Habitualmente las preparaciones de flagelina son conservadas a -20°C en nuestro laboratorio por lo que esta temperatura fue tomada como referencia en los ensayos realizados a lo largo del experimento. En la

Figura 22 se presentan los resultados de las medidas realizadas expresados como actividad luciferasa porcentual respecto a la flagelina almacenada a -20°C. Puede observarse que la flagelina almacenada a distintas temperaturas fue capaz de estimular la línea reportera en todos los tiempos evaluados de manera similar a la flagelina almacenada a la temperatura control. De esta manera, pudimos comprobar que flagelina resultó ser estable a 4°C y 25°C lo que permite su traslado y almacenamiento sin necesidad de equipamiento sofisticado.

Todas las actividades hasta aquí descritas permitieron la obtención de suspensiones de flagelina aptas para su utilización en ensayos biológicos *in vivo* como pudo comprobarse mediante el análisis del nivel de endotoxinas y actividad biológica en la línea reportera Caco-luciferasa. El cambio de escala en la producción resultó en una capacidad de producción de flagelina en mayores cantidades que el trabajo a escala laboratorio. Los batches de flagelina así obtenidos fueron utilizados a lo largo del desarrollo de éste y otros trabajos de tesis del grupo. Además se proveyó de flagelina a otros laboratorios con los que se trabajó en colaboración durante el transcurso del proyecto INCO (marco de éstas actividades) y colaboraciones posteriores.

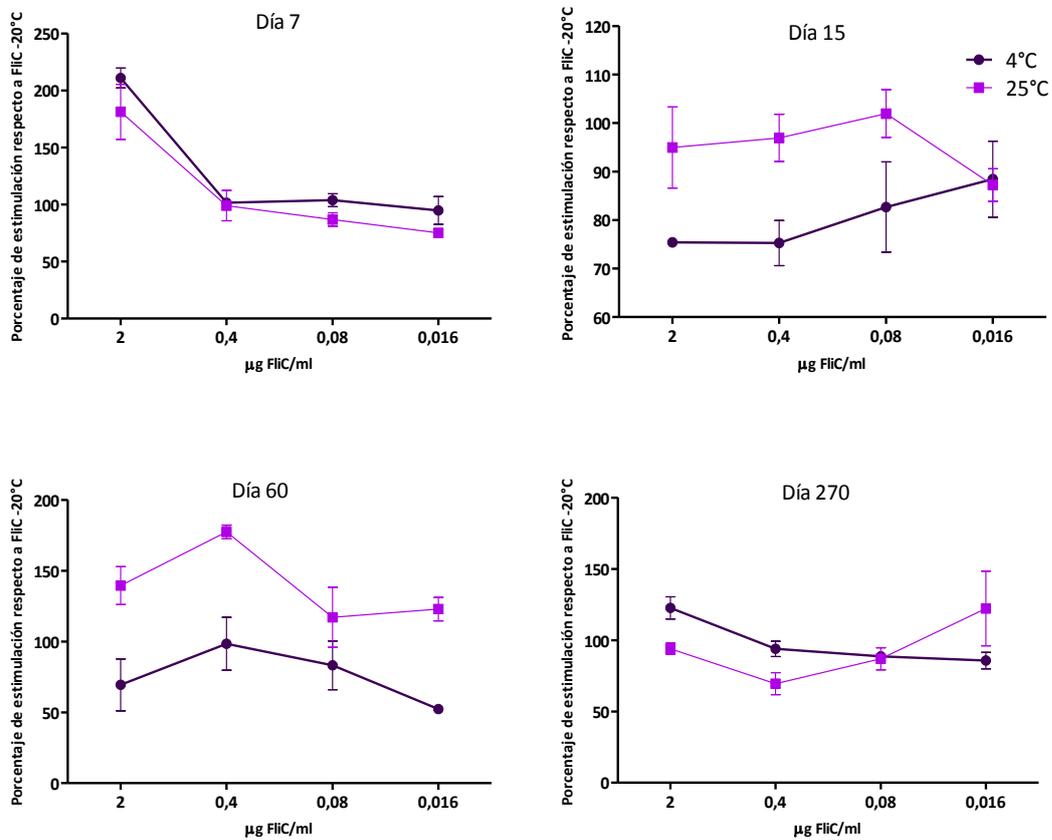


Figura 22: Análisis de la estabilidad de flagelina a distintas temperaturas de almacenamiento Se almacenó flagelina en viales con 100µl (100µg/ml) a -20°C, 4°C y 25°C. A los tiempos indicados se tomaron 3 viales al azar de cada temperatura y se realizó el ensayo de actividad biológica. Células caco-CCL20-luciferasa en placa de 48 fosas fueron incubadas con flagelina a las concentraciones indicadas durante 6hs, posteriormente se midió actividad luciferasa en luminómetro. Los datos corresponden al promedio \pm SD de medidas por duplicado de 3 viales diferentes para cada condición.

CONCLUSIONES

En vista de las cualidades de flagelina como adyuvante y demás propiedades de interés que se le atribuyen, nos propusimos desarrollar un protocolo que permitiera obtener flagelina en cantidad, de calidad adecuada, para poder desarrollar distintas líneas de trabajo dentro de nuestro grupo, como así también abastecer a grupos colaboradores. Además, teniendo en cuenta el uso potencial de flagelina en distintas líneas de trabajo, consideramos de utilidad contar con un protocolo que permita su producción a escala piloto.

De las actividades realizadas en el presente capítulo en pos del objetivo propuesto se destacan los siguientes resultados:

- ✓ Se logró optimizar un protocolo para la obtención de flagelina a gran escala utilizando filtración tangencial. Esto permitió simplificar el protocolo convencional al desprender los flagelos y concentrar el cultivo en el mismo paso evitando la centrifugación y resuspensión del pellet. Además, el desprendimiento de flagelo generado durante la recirculación del cultivo permitió prescindir del paso de agitación en vortex del protocolo convencional.
- ✓ El procesamiento del cultivo por filtración tangencial permitió la realización de cultivos en condiciones que favorecen la obtención de biomasa como la aireación y la agitación, lo que se tradujo en un incremento de 4 veces en la cantidad de flagelina obtenida y en una reducción de los tiempos de trabajo (72 hs del cultivo estático vs. 3 horas del cultivo aireado y agitado).
- ✓ El protocolo de producción de flagelina adaptado a escala piloto es fácilmente escalable a volúmenes de cultivo mayores a los empleados en este trabajo.
- ✓ La flagelina obtenida con este nuevo protocolo presentó actividad biológica comparable a la producida en el laboratorio y mostró ser estable en todas las temperaturas de almacenamiento evaluadas.

La aplicación del nuevo protocolo permitió la producción de varios cientos de miligramos de flagelina que fueron utilizados en el desarrollo de varias líneas de trabajo dentro de nuestro laboratorio y de grupos colaboradores.

En virtud de mejorar la calidad de las preparaciones de flagelina se generaron anticuerpos monoclonales factibles de ser utilizados en cromatografía de afinidad. Se obtuvieron 4 clones denominados: 2B3C5, 5B4H2, 4C1H7 y 2D11A1. Las conclusiones de la caracterización de los AcMos se detallan a continuación:

- ✓ Los anticuerpos 2B3C5 y 4C1H7 reconocen porciones conservadas de la estructura de flagelina, mientras que los AcMos 5B4H2 y 2D11A1 presentan como blanco el dominio antigénico
- ✓ El anticuerpo 2B3C5 se utilizó para detoxificar la flagelina mediante cromatografía de afinidad en batch logrando preparaciones libres de LPS de acuerdo al análisis por western-blot empleando un suero con reactividad frente a LPS y flagelina.
- ✓ Ninguno de los anticuerpos mostró reactividad frente a flagelina de microorganismos de especies distintas a *Salmonella*.
- ✓ Los anticuerpos 5B4H2 y 2D11A1 fueron capaces de reconocer solo flagelina de *Salmonella* serovar Typhimurium.
- ✓ El anticuerpo 5B4H2 resultó capaz de aglutinar de manera específica *Salmonella* Typhimurium, lo cual lo postula como una herramienta para ser utilizada en ensayos de serotipificación

En resumen, se obtuvo un panel de 4 anticuerpos monoclonales anti-flagelina que fueron utilizados en diversas aplicaciones en base a sus cualidades

CAPÍTULO II

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN ENTRE
DOS AGONISTAS DE TLR: FLIC Y BLS

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el diseño de vacunas a componentes ha incrementado la necesidad de incorporar adyuvantes a la formulación dado que los antígenos seleccionados suelen ser inmunógenos débiles. En este sentido los agonistas de receptores tipo Toll (TLRs) resultan candidatos atractivos para ser utilizados como adyuvantes gracias a su capacidad de estimular las células presentadoras de antígenos y desencadenar una consecuente respuesta inmune adaptativa⁹⁴.

Lumazina sintasa de *Brucella abortus*. (BLS) es una proteína decamérica (180KDa) muy estable y autoensamblable¹⁶⁸ que ha resultado altamente inmunogénica cuando se administra como proteína o como vacuna DNA^{169,170}. Esta alta inmunogenicidad se debe a varios factores. Por un lado, su estructura es termodinámicamente muy estable y resistente a muchos agentes proteolíticos, lo que permitiría una mayor exposición del huésped a la BLS cuando esta es administrada. Por otra parte su estructura decamérica presentando epitopes repetitivos es altamente inductora de respuesta inmune¹⁷¹. A su vez, es capaz de activar y madurar células dendríticas (DC) provenientes de médula ósea, a través de un mecanismo dependiente de TLR4⁷¹.

Se ha determinado que BLS puede actuar como un carrier para incrementar la inmunogenicidad de péptidos fusionados a su extremo N-terminal¹¹³ sin alterar su estabilidad o plegamiento, constituyendo una plataforma de direccionamiento de antígenos vacunales con potenciales aplicaciones de alto impacto¹¹².

La capacidad adyuvante de BLS ha sido ensayada junto a otro antígeno de *Brucella* como es la proteína de membrana externa Omp31, logrando niveles de protección contra *B. ovis* aún mayores a los obtenidos con la mejor vacuna disponible (Rev.1)¹¹⁴. Trabajos más recientes, empleando fragmentos de la proteína de cápside VP8d de rotavirus han demostrado la factibilidad de generar proteínas quiméricas manteniendo la estructura decamérica de BLS, a pesar de incorporar polipéptidos de más de 150 aminoácidos, manteniendo sus propiedades estructurales y de inmunoadyuvante¹⁷².

La alta estabilidad estructural de BLS y su capacidad potenciadora de la respuesta inmune también fue demostrada por la generación de proteínas de fusión de BLS con

péptidos de *Taenia solium* que demostraron capacidad protectora aumentada en un modelo murino de cisticercosis. En este modelo, la proteína quimérica fue administrada en forma oral, sin otros adyuvantes asociados, logrando generar una respuesta inmune protectora a través del tracto gastrointestinal. Este resultado es altamente llamativo, teniendo en cuenta la baja inmunogenicidad que mantienen los antígenos al ser administrados por vía oral, indicando prometedoras aplicaciones en administración por vía mucosal.

Además, gracias al conocimiento de los mecanismos de disociación y desplegamiento de BLS, es posible la generación de quimeras polivalentes que presentan diferentes péptidos en el mismo andamiaje molecular¹¹³.

La capacidad adyuvante de flagelina ha sido discutida en el capítulo anterior utilizando ovoalbúmina como antígeno modelo. Además se han reportado incrementos en la respuesta mediada por anticuerpos obtenida luego de la coadministración de flagelina con antígenos recombinantes provenientes de *Yersinia pestis* o Influenza A, lo cual se tradujo en un aumento en la sobrevivencia ante el desafío con dosis letales de estos patógenos^{136,173}. Esta capacidad de flagelina de mejorar la respuesta desencadenada contra el antígeno que acompaña se vio aumentada cuando el antígeno y la flagelina se administran como proteína de fusión, formando parte de una misma estructura^{102,103,105,107}.

Atendiendo este concepto y considerando lo expuesto en la introducción general del presente trabajo respecto de las combinaciones de agonistas TLR que permitan aumentar la respuesta inmune generada frente a un antígeno, nos propusimos generar una molécula novedosa que tenga la capacidad de señalar a través de 2 receptores tipo toll simultáneamente. En vista de las actividades biológicas de la flagelina y la lumazina sintasa, se espera que una proteína de fusión entre ambas moléculas combine el poder activador de la respuesta innata mucosal de la flagelina con la estabilidad estructural y capacidad como plataforma vacunal de lumazina sintasa, obteniendo así una molécula que permita potenciar las capacidades y aplicaciones de ambas.

En el presente capítulo nos propusimos generar una proteína recombinante entre la flagelina de *S. Typhimurium* (FliC) y la Lumazina Sintasa de *Brucella abortus* (BLS).

A continuación se describirán las actividades realizadas para la obtención de la proteína quimérica FliC-BLS. Haremos un recorrido desde el diseño de la construcción, planteando diferentes estrategias de obtención, pasando por la etapa de purificación para concluir con la caracterización estructural y biológica de la proteína como agonista de TLR-4 y TLR-5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.I ESTRATEGIA DE OBTENCIÓN DE LA QUIMERA FLIC-BLS

En vista de la capacidad de BLS de actuar como carrier de péptidos fusionados a su extremo N-terminal, se generó una construcción en el plásmido pET11a habiéndose insertado en la misma los sitios de restricción de las endonucleasas Nsi I y Afl II que pueden ser empleados para el reemplazo parcial de la secuencia nativa por secuencias de polipéptidos de interés¹¹³. La idea de obtener una proteína de fusión entre flagelina y BLS despertaba interrogantes respecto del correcto plegado de BLS y la conservación de su estructura decamérica frente a la inserción de una proteína completa (50KDa) en su extremo N-terminal dado que hasta el momento de iniciar el proyecto se habían obtenido exitosamente quimeras con insertos de hasta 150 aminoácidos¹⁷². Por este motivo se decidió utilizar la secuencia de una flagelina recombinante, que carece del dominio antigénico, pero mantiene la capacidad de estimular TLR-5. Inicialmente se seleccionó una flagelina mutante que contiene una delección entre los aminoácidos 174 y 400 (FliC $\Delta_{174-400}$)¹¹¹. A partir del plásmido que contiene la secuencia correspondiente a FliC $\Delta_{174-400}$ se obtuvo el fragmento de flagelina a clonar. Se dispuso de dicha construcción gracias al trabajo en colaboración que nuestro grupo mantiene con el grupo de investigación del Dr. Jean Claude Sirard del Instituto Pasteur de Lille quien oficiara de coordinador de los grupos europeos participantes del proyecto de cooperación internacional “Novel Therapeutic and Prophylactic Strategies to Control Mucosal Infections by South American bacterial strains (SavinMucoPath)” mencionado anteriormente.

Se diseñaron primers que permitiesen obtener fragmentos de 483pb y 723pb flanqueados por los sitios de restricción necesarios para su inserción en el extremo N-terminal de BLS. Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el plásmido Topo blunt luego de chequear su tamaño por electroforesis en gel de agarosa (**Figura 23a**)

Un plásmido recombinante de cada tamaño de fragmento con la secuencia nucleotídica correcta fue seleccionado al azar y digerido con las enzimas Afl II y Nsi I

(Figura 23b). El fragmento liberado fue insertado en el plásmido pET11a, portador de la secuencia de BLS, digerido con las mismas enzimas. De esta manera se obtuvo el plásmido pet11a con la construcción FliC723-BLS y FliC483-BLS.

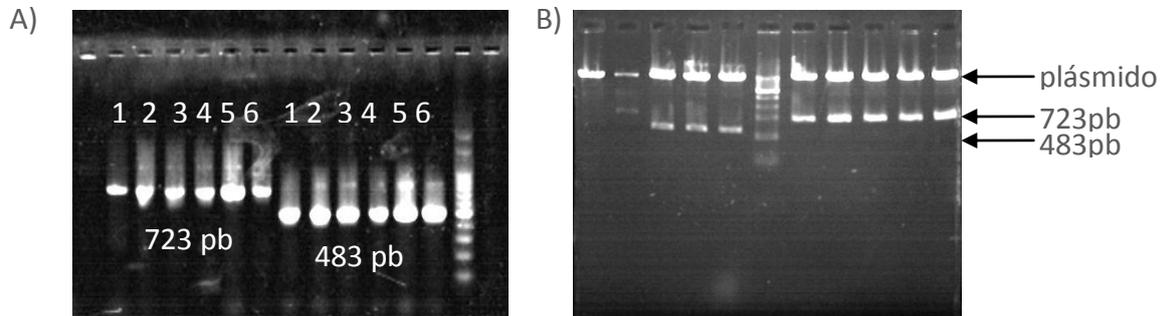


Figura 23: Obtención del fragmento a clonar de flagelina de *S. Typhimurium*
Los fragmentos de flagelina que serían insertados en el extremo N-terminal de BLS se obtuvieron mediante PCR utilizando como molde el plásmido MR que contiene la secuencia de FliC ($\Delta_{174-400}$) que carece del dominio antigénico (A) Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR obtenido a 3 temperaturas de hibridación diferentes 1y2)55°C, 3y4)57,7°C y 5y6)60°C. Las calles de la izquierda corresponden al fragmento de 723pb mientras que las de la derecha pertenecen al fragmento de 483pb (B) Plásmidos purificados por miniprep a partir de *E.coli* DH5 α digeridos con EcoRI para evaluar la presencia de inserto. Los plásmidos recombinantes fueron enviados a secuenciar.

Mientras se llevaban adelante las actividades para obtener la proteína de fusión FliC-BLS habiendo utilizado la construcción FliC($\Delta_{174-400}$) como molde, el Dr. Sirard realizó una cesión de los derechos de explotación de dicha secuencia a una empresa farmacéutica internacional que estuvo interesada en las potenciales aplicaciones de esta flagelina recombinante. Debido a que esto podría condicionar nuestra capacidad de aplicar y divulgar libremente los resultados que surgieran del uso de la quimera FliC-BLS, se decidió cambiar la secuencia de flagelina recombinante por una de dominio público como es C131¹⁶⁵. A fin de avanzar lo más rápidamente posible en este proyecto, se encargó la síntesis de la secuencia de FliC-BLS a una empresa especializada en la síntesis de ácidos nucleicos.

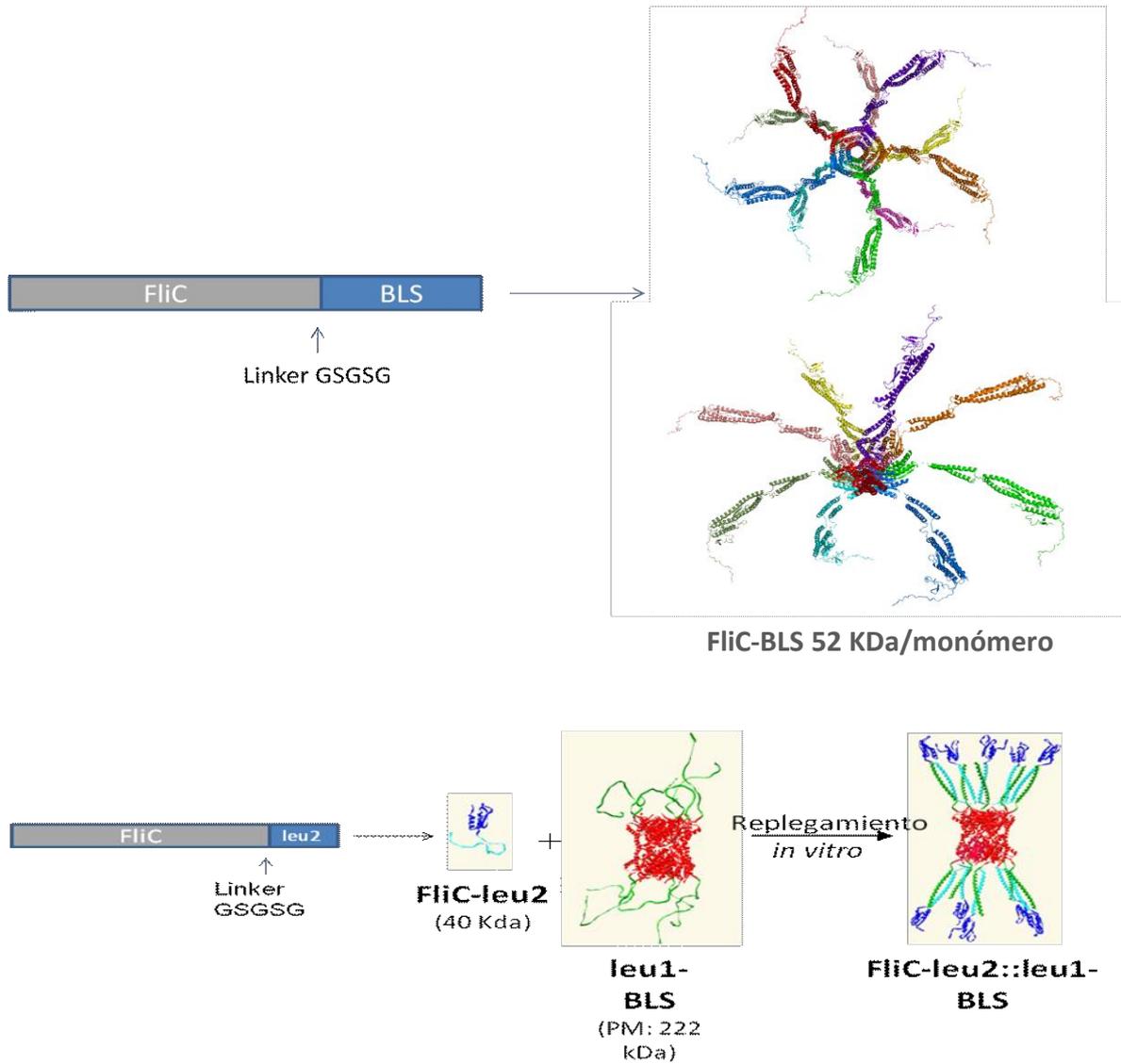


Figura 24: Representación esquemática de las construcciones generadas Arriba: construcción FliC-BLS. La secuencia correspondiente a la variante de flagelina C131 codifica para 329 aminoácidos unidos a los 151 aminoácidos correspondientes a BLS mediante el linker señalado. Los monómeros FliC-BLS, mostrados todos en diferente color, posteriormente se ordenan en la estructura decamérica propia de BLS. Se muestran 2 vistas de la molécula decamérica. Se utilizó el programa PyMOL(TM) Copyright (C) 2006 **Abajo:** construcción FliC-leu2. En este caso la secuencia de C131 se encuentra unida a 45 aminoácidos correspondientes a leu2. FliC-leu2 puede unirse a BLS-leu1 mediante interacciones electrostáticas entre leu1 y leu2 que estabilizan la formación de un heterodímero. La generación de la quimera FliC-BLS mediante un leucine-zipper entre leu2 y leu1 se planteó como una estrategia alternativa a la obtención de la quimera como proteína de fusión, en caso de presentar problemas de plegamiento.

En la **Figura 24** puede verse una representación esquemática de la construcción la cual se empleó inserta en el plásmido pET11a bajo el promotor *Lac* inducible por IPTG. La secuencia correspondiente a C131 codifica para 329 aminoácidos que se unen a los 151 aminoácidos correspondientes a BLS mediante el linker señalado. Esto constituye el monómero FliC-BLS que posteriormente se ordena en la estructura decamérica propia de BLS.

Considerando la posibilidad de que se presentaran inconvenientes en el correcto plegamiento de BLS por la inserción de C131, se diseñó también una construcción que codifica para la proteína FliC-leu2. Dicha proteína consiste en la secuencia de C131 fusionada a un péptido de 45 aminoácidos rico en leucina mediante el linker señalado, que puede unirse a BLS-leu1 mediante interacciones electrostáticas entre leu1 y leu2 que estabilizan la formación de un heterodímero¹⁷⁴. Esto constituye una estrategia alternativa de obtención de la quimera mediante un leucine-zipper entre ambas proteínas, en lugar de generarla como una proteína de fusión, si se presentaran problemas de plegamiento.

II.II OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE FLIC-BLS

Una vez que se dispuso de las construcciones, se transformaron células de *E. coli* BL21 para lograr la expresión y purificación de FliC-BLS y FliC-leu2. Con el objetivo de optimizar un protocolo de purificación de dichas proteínas, se comenzó realizando un ensayo para determinar en qué fracción se recuperaba mayormente la quimera luego de realizar la lisis bacteriana. De esta manera, a partir de un cultivo de BL21 transformada con el plásmido pET11a FliC-BLS o pET11a FliC-leu2 se tomaron alícuotas a distintos tiempos post-inducción, las que fueron sonicadas y separadas por centrifugación en sobrenadante y pellet. Todas las fracciones fueron analizadas por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida y western blot (**Figura 25**). En la figura se observa que ambas construcciones se expresaron correctamente, ya que en ambos casos, a las 4 hs post-inducción puede apreciarse una nueva banda que no estaba presente en el cultivo pre-inducido (**Figura 25** arriba, círculos rojos).

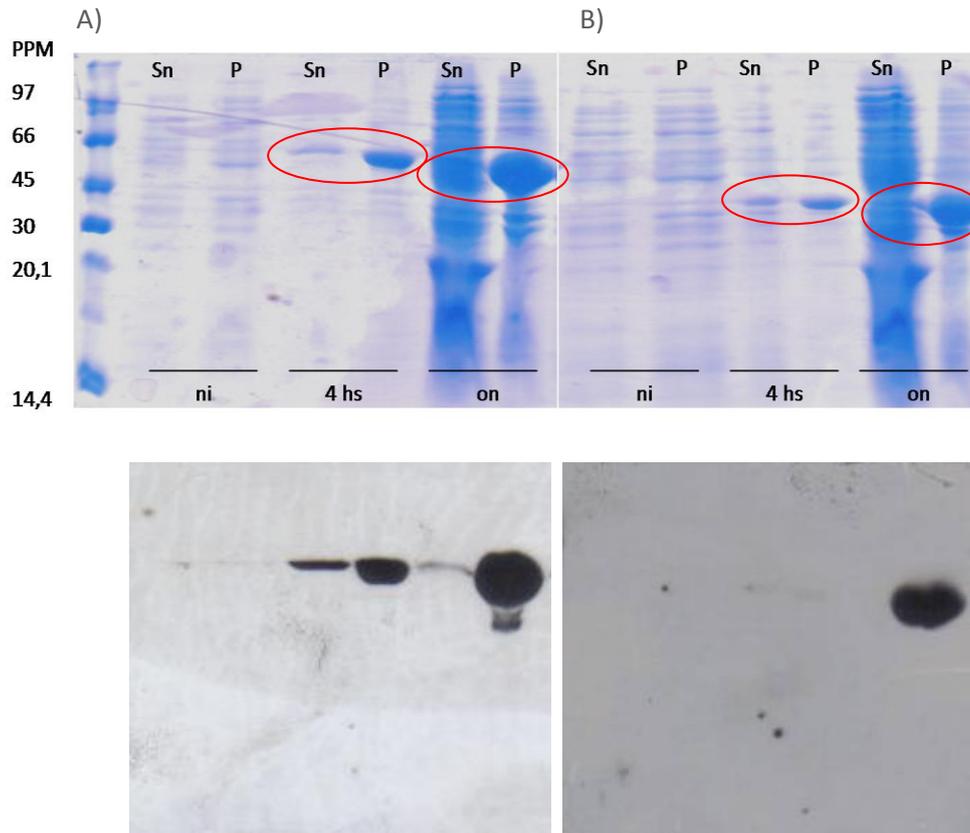


Figura 25: Ensayo de solubilidad de las quimeras FliC-BLS y FliC-leu2 Un cultivo de BL21 portando el plásmido pET11a con la construcción FliC-BLS o FliC-leu2 fue inducido con IPTG 1mM a $DO_{600}=0,6-0,8$. A los tiempos indicados se tomaron muestras de 1ml que fueron sonicadas y centrifugadas para separar sobrenadante (Sn) y pellet (P) **Arriba)** Todas las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y se evidenciaron bandas con los tamaños esperados correspondientes a ambas quimeras, 52 KDa para FliC-BLS (A) y 40 KDa para FliC-leu2 (B). **Abajo)** Todas las fracciones se evaluaron por western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-FliC 2B3C5. Se respetó el orden de siembra utilizado arriba. El pellet del cultivo ON fue la fracción con mayor cantidad de quimera en ambos casos (cuerpos de inclusión) por lo que se seleccionó este tiempo de cultivo y fracción para la purificación de la proteína de interés. Sn: sobrenadante, P: pellet, ni: no inducido, ON: over night, inducido toda la noche.

Las bandas presentaron los pesos moleculares esperados para cada quimera, 52 KDa para FliC-BLS y 40 KDa para FliC-leu2, y fueron reconocidas por el anticuerpo 2B3C5 en el ensayo de westernblot (**Figura 25** abajo). La fracción que presentó la mayor cantidad de quimera fue el pellet (cuerpos de inclusión) del cultivo ON para ambas

construcciones. De esta manera se seleccionó la purificación a partir de los cuerpos de inclusión como metodología para maximizar la recuperación de las proteínas de interés.

En base a los resultados, el pellet correspondiente al cultivo de FliC-BLS ON sonicado fue resuspendido en urea 8M para desnaturalizar los cuerpos de inclusión, que fueron posteriormente renaturalizados por diálisis contra buffer Tris. Luego se continuó con la purificación de la proteína de fusión FliC-BLS de acuerdo al protocolo habitual de purificación para quimeras de BLS, el cual consiste en una cromatografía de intercambio iónico (CII) de los cuerpos de inclusión renaturalizados seguido de un paso de cromatografía de exclusión molecular (CEM). Este protocolo presentó un rendimiento muy bajo en proteína que no coincidía con la abundante expresión de la construcción observada por SDS-PAGE. Por otro lado, la proteína obtenida de esta manera sufría proteólisis a corto plazo como pudo evidenciarse mediante WB con anticuerpos anti-BLS donde se observaba una banda de bajo peso molecular correspondiente al core de BLS (resultado no mostrado). Este hecho introdujo la necesidad de un cambio en la estrategia utilizada para la purificación de la quimera.

II.III PURIFICACIÓN DE LA QUIMERA FLIC-BLS UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Teniendo en cuenta que el protocolo habitual de purificación para quimeras de BLS no resultó adecuado para purificar FliC-BLS se decidió recurrir a una herramienta generada previamente: los anticuerpos monoclonales anti-flagelina. Se utilizó una resina conjugada al anticuerpo 2B3C5 que fuera utilizada para la detoxificación de flagelina, tal como se describió en el capítulo anterior (sección I.III.III). Este anticuerpo había mostrado reactividad frente a regiones conservadas de flagelina que están presentes en la secuencia insertada en la quimera FliC-BLS. Los cuerpos de inclusión renaturalizados en buffer TBS pH: 8,3 fueron purificados por cromatografía de afinidad (CA) en batch y se evaluó el resultado del procedimiento por SDS-PAGE (**Figura 26**).

Las calles correspondientes a las fracciones eluidas con glicina presentan una banda limpia que indica la eficacia del método para purificar la quimera. La gran cantidad de

quimera presente en el Vo puede deberse a que se haya saturado la cantidad de resina utilizada, por lo que esta fracción se purificó nuevamente.

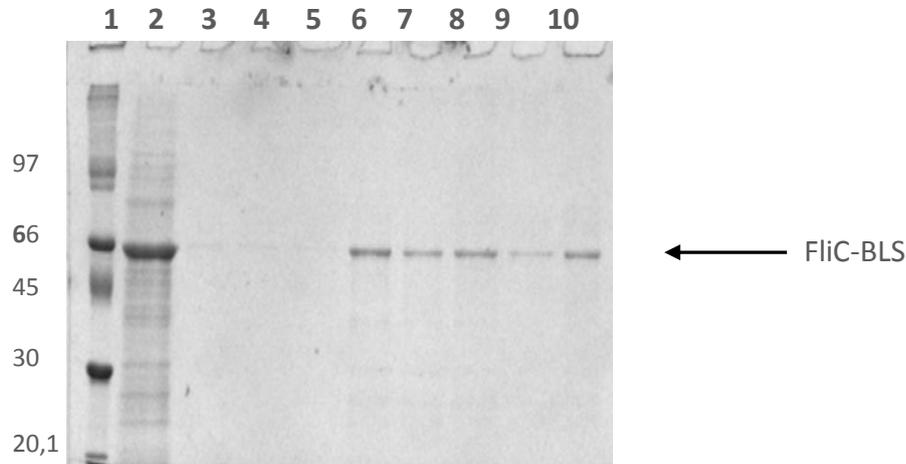


Figura 26: Purificación de la quimera FliC-BLS por cromatografía de afinidad en batch utilizando el AcMo anti-FliC 2B3C5. Se purificó FliC-BLS a partir de los cuerpos de inclusión renaturalizados en TBS por cromatografía de afinidad. El resultado de la purificación se evaluó por SDS-PAGE, calle 1: patrones de peso molecular, calle 2: Vo, calle 3: primer y segundo lavado, calle 4: tercer y cuarto lavado, calle 5: quinto y sexto lavado, calles 6 a 9: eluciones con glicina pH3 colectadas en Tris pH=8 para neutralizar, calle 10: lavado con TBS post-elusión. La purificación por CA resultó exitosa, como evidencia la banda única aparecida en las fracciones de elusión.

II.IV EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE FliC-BLS PURIFICADA POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Dado que la proteólisis de la quimera purificada por cromatografía de intercambio iónico seguido de cromatografía de exclusión molecular fue un factor determinante en la recuperación, se realizó un ensayo de estabilidad de FliC-BLS purificada por cromatografía de afinidad. La fracción purificada se dividió para su almacenamiento bajo diferentes condiciones que involucraron distintas temperaturas (4°C y -20°C) como así también el agregado de glicerol o de seroalbúmina bovina (BSA). El agregado de glicerol aumenta la estabilidad de la proteína ante los ciclos de congelamiento/descongelamiento que puedan realizarse, mientras que el agregado de BSA contribuye a disminuir la pérdida de proteína por unión a las paredes del tubo que la contiene y eventualmente puede actuar

como inhibidor competitivo de proteasas. Se almacenó la quimera en alícuotas de 50µl en las siguientes condiciones:

- Sola a 4°C,
- Sola a -20°C,
- Con BSA 5mg/ml a -20°C,
- Con glicerol al 50% a -20°C o,
- Con BSA 5mg/ml en glicerol 50% a -20°C.

La estabilidad de la quimera fue evaluada por SDS-PAGE para evidenciar proteólisis y por medida de la actividad biológica sobre la línea reportera Caco-ccl20-luciferasa.

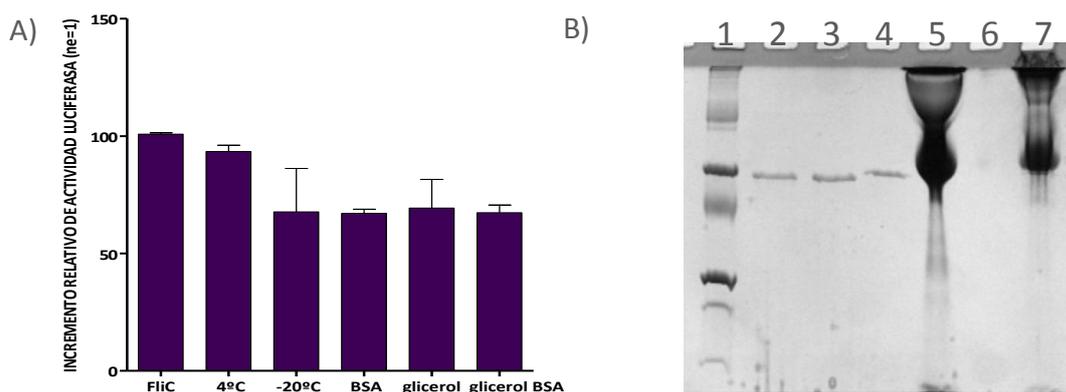


Figura 27: Ensayo de estabilidad de la quimera FliC-BLS purificada por cromatografía de afinidad utilizando el AcMo anti-FliC 2B3C5 Las fracciones eluídas de la cromatografía de afinidad se homogeneizaron en una única muestra que luego se separó en viales con 50 µl para almacenarse en las siguientes condiciones: 4°C, -20°C, BSA 5 mg/ml -20°C, glicerol 50% -20°C, BSA 5 mg/ml en glicerol 50% -20°C. Se evaluó la integridad de la quimera por ensayo de actividad biológica sobre la línea reportera Caco-ccl20-luciferasa(A) y SDS-PAGE (B) a los días 7, 15, y 27. Los resultados que se muestran corresponden al día 27. (A) Medida de actividad luciferasa en lisados de células Caco-luc incubadas con la quimera mantenida en distintas condiciones 1/10 durante 6 hs en placa de 48 fosas, los resultados corresponden al promedio de 3 fosas +SD, se utilizó Flic 1µg/ml como control positivo. (B) SDS-PAGE de las fracciones de quimera almacenadas en distintas condiciones calle 1) patrones de peso molecular 2) 4°C, 3) -20°C, 4) glicerol 50%, 5) BSA 5 mg/ml, 6) calle vacía 7) BSA 5 mg/ml en glicerol 50%.

Como puede verse todas las condiciones contribuyeron al mantenimiento de la quimera, la cual resultó estable aún a 4°C sin perder actividad biológica ni evidenciar signos de proteólisis. De esta manera, podemos concluir que la utilización de cromatografía de afinidad con el anticuerpo monoclonal anti-flagelina 2B3C5 en la purificación de la quimera mejora la pureza de la proteína obtenida al lograr separarla de proteasas que permanecían en la muestra al aplicar el protocolo habitual.

II.V CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE FLIC-BLS

Para comenzar a caracterizar la proteína de fusión FliC-BLS se determinó la presencia en su estructura de las regiones correspondientes a C131 y BLS. Para ello se analizó la reactividad frente a la quimera de anticuerpos monoclonales anti-flagelina y anti-BLS mediante un ensayo de western-blot utilizando flagelina de *Salmonella* Typhimurium y BLS como controles (**Figura 28**). En la figura se muestran, hacia la izquierda, el inmuno-blotting revelado con anticuerpos anti-BLS donde se observan bandas correspondientes a BLS (18 KDa) y FliC-BLS (52 KDa), calles 2 y 3 respectivamente, mientras que no se evidenció reactividad en la calle donde se sembró flagelina (calle 1); y hacia la derecha se muestra el inmuno-blotting revelado con anticuerpos anti-FliC donde aparecieron bandas sólo en las calles correspondientes a FliC (52 KDa) y FliC-BLS (52 KDa). De esta manera pudo corroborarse que la quimera presenta las estructuras con inmunoreactividad correspondientes a C131 y BLS en la misma molécula.

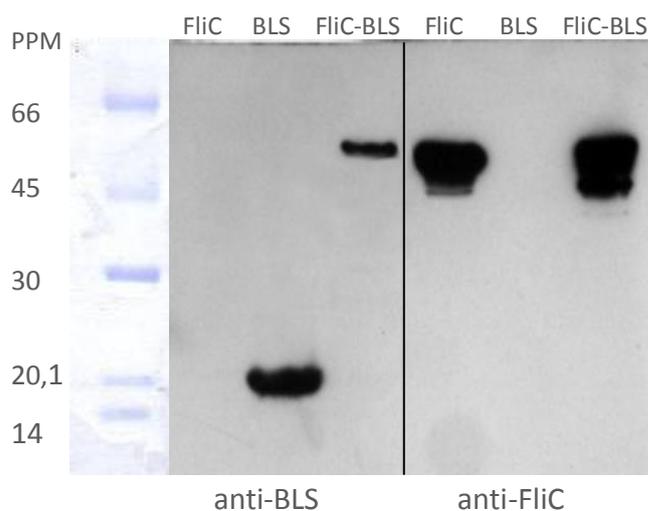


Figura 28: Análisis de la estructura de la quimera mediante Western-blot empleando anticuerpos monoclonales anti-flagelina y anti-BLS Se realizó un ensayo de inmunotransferencia de las proteínas FliC, BLS y FliC-BLS para corroborar la presencia de las secuencias correspondientes a flagelina y BLS en la molécula quimérica. En las calles de la izquierda se utilizó anti-BLS como anticuerpo primario, mientras que en las calles de la derecha se utilizó el anti-fliC 2B3C5. En ambos casos se reveló con un anti-IgG murino conjugado a peroxidasa.

Habiendo determinado que la quimera era reconocida por anticuerpos contra las proteínas que le dieron origen, se continuó con la caracterización analizando la estructura de la proteína utilizando la técnica de dicroísmo circular (DC). Esta técnica permite estudiar la estructura de proteínas en solución mediante el análisis de la absorbancia de luz circularmente polarizada. Los instrumentos de DC expresan la diferencia entre los componentes de absorbancia a izquierda y derecha de la luz circularmente polarizada como un parámetro denominado “elipticidad” (θ), expresada en grados. El espectro de elipticidad se construye en función de la longitud de onda y los distintos tipos de estructura secundaria presentes en las proteínas dan origen a espectros de DC característicos en el UV lejano¹⁷⁵. En particular la estructura α -hélice genera un espectro en forma de valle como los mostrados en la **Figura 29**. El espectro obtenido para FliC-BLS resultó similar al teórico, calculado a partir de los espectros correspondientes a las proteínas por separado, por lo que puede concluirse que las proteínas mantienen la misma estructura que en la conformación nativa.

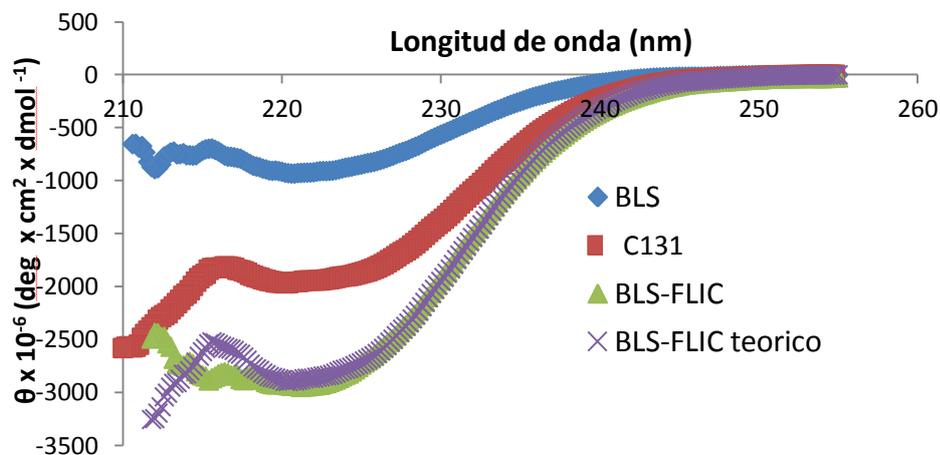


Figura 29: Evaluación de la estructura secundaria de FliC-BLS. Se muestran los espectros de diroísmo circular obtenidos para BLS (azul), C131 (rojo) y FliC-BLS (verde). La forma de la curva corresponde a estructura secundaria de α -hélice. Nótese que el espectro obtenido experimentalmente para la quimera coincide con el calculado teóricamente (cruces violetas) a partir de los espectros correspondientes a ambas proteínas por separado.

Utilizando DC es posible evaluar la pérdida de estructura secundaria en función de la temperatura en base a las señales de θ obtenidas a una longitud de onda fija en el UV lejano (222 nm). Un ensayo de este tipo fue realizado para C131, BLS y la quimera FliC-BLS, obteniéndose los resultados mostrados en la **Figura 30**.

Las proteínas C131 y BLS mostraron transiciones que evidenciaron la alteración de su estructura secundaria con el incremento de temperatura. C131 (rojo) mostró una transición en el valor de θ alrededor de los 30°C, mientras que BLS (azul) evidenció un cambio a una temperatura de 90°C. El espectro obtenido para la quimera FliC-BLS (verde) presentó las transiciones sufridas por ambas proteínas por separado, evidenciando nuevamente que ambas estructuras nativas están presentes en la proteína quimérica.

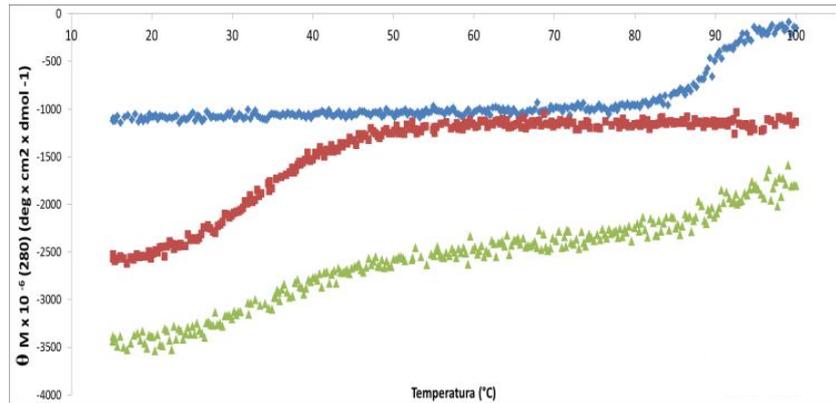


Figura 30: Seguimiento de la pérdida de la θ (222nm) en función de la temperatura. Se obtuvo el espectro de variación de elipticidad (θ) a 222 nm en función del aumento de temperatura de las proteínas en buffer PBS. Se muestran BLS (azul), C131 (rojo) y FliC-BLS (verde). Puede apreciarse que los cambios en la estructura secundaria sufridos por la quimera están presentes en ambas proteínas por separado.

Considerando los resultados de los ensayos de inmunoblotting y dicroísmo circular puede concluirse que la quimera presenta no solo las secuencias correspondientes a FliC C131 y BLS sino que además las estructuras propias resultantes del plegamiento nativo de ambas proteínas están presentes en la quimera, tal como se esperaba de acuerdo al diseño de la construcción empleado. Esto concuerda con el modelado estructural mostrado en la **Figura 24** donde puede observarse que la quimera presenta principalmente estructura secundaria de α -hélice.

A continuación nos propusimos analizar si la quimera presenta la actividad biológica propia de ambas proteínas por separado, es decir si mantiene la capacidad agonista de TLR-5 propia de FliC C131 y la capacidad como agonista de TLR-4 presentada por BLS.

II.VI CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FLIC-BLS COMO AGONISTA DE TLR-4/TLR-5

Para poder determinar la capacidad agonista de la quimera a través de TLR-4 y TLR-5 se requiere de sistemas que permitan la anulación de la señalización dependiente de alguno de los receptores. Considerando que la línea reportera Caco-ccl20-luciferasa no responde a la estimulación por LPS ni otros estímulos de TLR-4, resulta un buen sistema

para evaluar la actividad biológica de la quimera a través de TLR-5. En la **Figura 31** se muestra el resultado obtenido para el ensayo de actividad biológica sobre células Caco-luciferasa con la quimera FliC-BLS. Puede observarse que la quimera FliC-BLS aumentó la expresión de luciferasa de manera similar al incremento generado por la flagelina de *Salmonella Typhimurium*, que se utilizó como control positivo. Por su parte la proteína de fusión BLS-OVA no mostró capacidad de estimular la expresión de luciferasa al igual que el LPS utilizado como control negativo. El ensayo realizado incorporando FliC C131 como estímulo arrojó resultados similares.

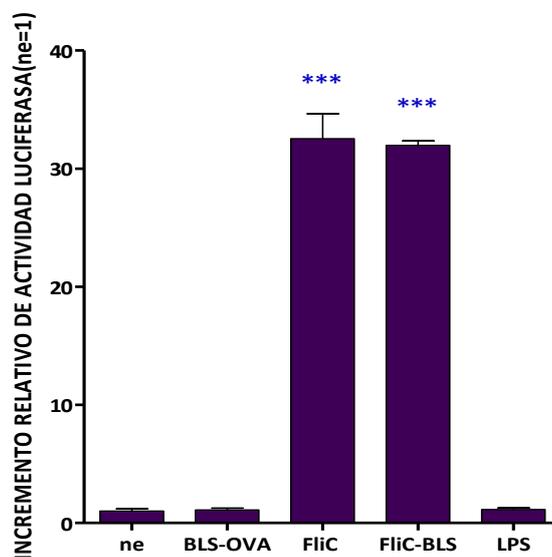


Figura 31: Análisis de la capacidad de FliC-BLS como agonista de TLR5 *in vitro* utilizando la línea reportera Caco-ccl20-luciferasa Células Caco-ccl20-luciferasa en placa de 48 fosas fueron estimuladas con FliC (1µg/ml), LPS (100ng/ml), FliC-BLS (1 µg/ml) o BLS-OVA (1µg/ml), luego de 6 horas se midió actividad luciferasa en el lisado celular utilizando un luminómetro. Los resultados corresponden a triplicados de cada condición analizados mediante ANOVA de una vía seguido de test Tukey para comparar todas las condiciones con un control no estimulado ***=(P<0,001)

Otra forma de evaluar la capacidad de señalización a través de TLR-5 en ensayos *in vivo* es utilizando la cepa murina C3H/HeJ, la cual presenta un receptor TLR-4 no funcional debido a la presencia de una mutación puntual.

En esta cepa se evaluó el reclutamiento de neutrófilos a vías aéreas o a la cavidad peritoneal en respuesta a la estimulación con FliC-BLS por vía intranasal o intraperitoneal respectivamente. Por citometría de flujo se evaluó la llegada de células polimorfonucleares (PMN) caracterizadas como CD11b+ Ly6G+ Ly6C+. La quimera resultó capaz de reclutar neutrófilos en respuesta a la administración por ambas vías, de manera similar a flagelina de *Salmonella Typhimurium* (Figura 32) habiéndose utilizado cantidades equimolares de las proteínas administradas.

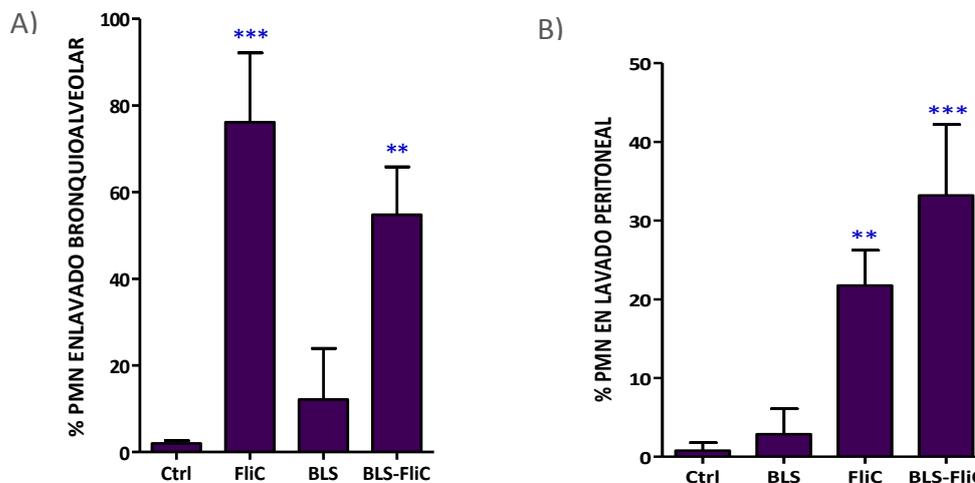


Figura 32: Análisis de la capacidad de FliC-BLS como agonista de TLR5. Evaluación del reclutamiento de neutrófilos en respuesta a la estimulación con la quimera. A) Grupos de ratones C3H/HeJ fueron estimulados por vía intranasal con FliC (6 µg), FliC-BLS (6 µg) o BLS (1,8 µg) en 40 µl de PBS libre de pirógenos como vehículo. El grupo control recibió 40 µl de vehículo. **B)** Grupos de ratones C3H/HeJ fueron estimulados por vía intraperitoneal con FliC (6 µg), FliC-BLS (6 µg) o BLS (1,8 µg) en 300 µl de PBS libre de pirógenos. El grupo control recibió 300 µl de PBS. Luego de 16 hs se caracterizó la población de PMN en ambas cavidades mediante citometría de flujo como CD11b+ Ly6G+ Ly6C+. Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes. Se muestra el valor medio ± SD analizado mediante ANOVA de una vía seguido de test Tukey, se muestra la significancia de los grupos respecto al control (n=3). **= (P<0.01) ***= (P<0.001)

Los ensayos realizados hasta el momento permitieron determinar que la quimera FliC-BLS tiene la capacidad de desencadenar una respuesta inmune innata gracias a la señalización a través de TLR-5. Para poder caracterizar la capacidad de señalización TLR-4

dependiente resulta necesario un modelo en el cual se encuentre anulada, o pueda inhibirse, la señalización vía TLR5. De acuerdo con esto se realizó un ensayo de estimulación *in vitro* de un cultivo enriquecido en células adherentes de bazo, consideradas poco respondedoras a flagelina (JC Sirard, datos no publicados). Los resultados obtenidos mostraron que la quimera pudo desencadenar una respuesta biológica a través de la señalización vía TLR-4 la cual no fue inhibida por la polimixina B (Figura 33). El agregado de polimixina B inhibió totalmente la capacidad estimuladora del LPS, mientras que disminuyó el efecto observado para FliC. Esta variación estaría evidenciando la presencia de contaminación por LPS en la muestra, o una interacción inespecífica de flagelina con el antibiótico que se traduciría en una disminución de su capacidad como agonista de TLR-5. Esto último podría suceder como consecuencia de las condiciones en las que se realiza el ensayo, al no tratarse de una línea celular sino de un cultivo enriquecido en células adherentes de bazo las poblaciones presentes no están bien caracterizadas por lo que, si bien el resultado parece claro puede ser sujeto de cuestionamientos. En tal caso, el modelo propuesto para la evaluación de la capacidad estimuladora de la quimera a través de TLR-4 no sería el más adecuado, considerando que la manera de obtener resultados inequívocos sería la repetición de los ensayos realizados en una cepa TLR-5^{-/-}.

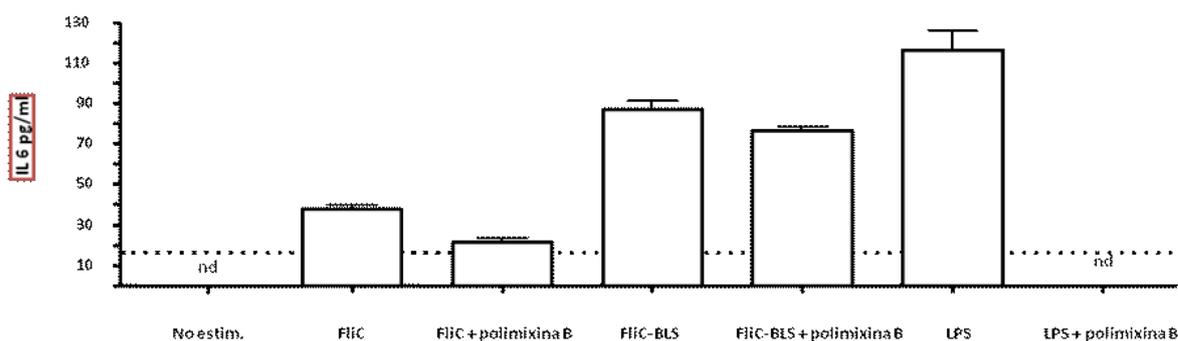


Figura 33: Evaluación de la señalización TLR-4 dependiente de la quimera FliC-BLS Células adherentes de bazo de ratones Balb/C fueron estimuladas en placa de 48 fosas con 1 µg/ml de FliC, 1 µg/ml de FliC-BLS o 100 ng/ml de LPS de E. coli en RPMI con/sin polimixina B 10 µg/ml. Luego de 6 horas de estimulación se midió la concentración de IL-6 en los sobrenadantes mediante ELISA. Se muestra el promedio ± SD (n=3). nd= no detectable

Considerando una potencial utilidad de la quimera como adyuvante, resultó de interés evaluar la intensidad de la expresión de citoquinas proinflamatorias luego de la administración de quimera ya que un aumento exacerbado de moléculas proinflamatorias puede correlacionarse con el efecto tóxico de una vacuna. En este sentido, luego de la administración por vía intranasal de FliC-BLS se analizó la expresión de IL-6 en pulmón mediante RT-qPCR.

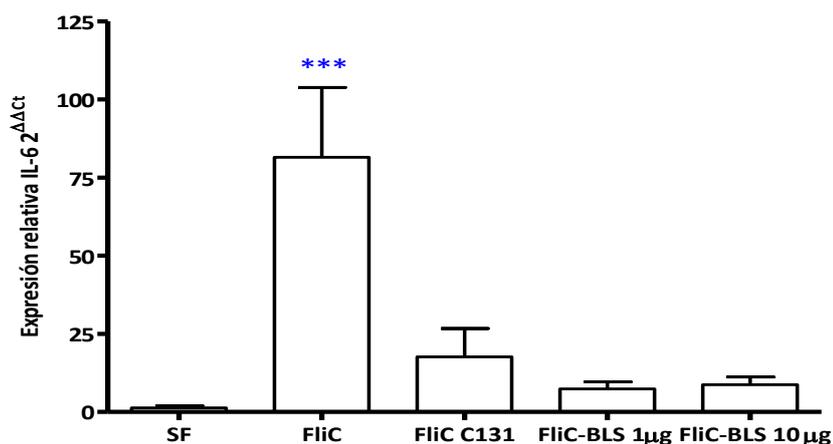


Figura 34: Análisis de la expresión de IL-6 desencadenada por la administración intranasal de FliC-BLS Grupos de ratones Balb/C fueron estimulados con FliC (1μg), C131 (0,7μg), FliC-BLS (1μg) todas éstas cantidades equimolares, o FliC-BLS (10 μg) en 40 μl de PBS libre de pirógenos como vehículo. El grupo control recibió 40 μl de PBS libre de pirógenos. Luego de 2 horas los animales fueron sacrificados y se procesó el pulmón izquierdo para medir la expresión de IL-6 mediante RT-qPCR. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de test Tukey. Se muestra la significancia respecto al control, ***= (P < 0.001, n=3). El ensayo se repitió 3 veces obteniéndose resultados similares.

En la **Figura 34** se muestra el resultado obtenido luego de la administración de cantidades equimolares de FliC-BLS, la flagelina recombinante corta cuya secuencia se utilizó en la quimera (C131) y la flagelina de *Salmonella* Typhimurium (FliC); también se muestra el resultado obtenido para la administración de una dosis mayor de quimera (10 μg). Puede apreciarse que la quimera no produjo un incremento significativo en la expresión de IL-6 a cualquiera de las dosis empleadas mientras que FliC indujo un fuerte incremento en los niveles de mRNA para IL-6. Si se realiza un correlato entre la expresión

de citoquinas proinflamatorias y la toxicidad de una molécula, el resultado obtenido para la quimera resulta alentador debido a que no induce un aumento severo de IL-6 pero igualmente es capaz de reclutar neutrófilos y estimular una respuesta inmune innata como se mostró en la sección anterior.

CONCLUSIONES

A lo largo del capítulo se han mostrado y discutido los resultados surgidos de las actividades realizadas para generar la proteína quimérica FliC-BLS. En base a los resultados alcanzados podemos destacar las siguientes conclusiones:

- ✓ Se diseñó una proteína recombinante entre la flagelina de *Salmonella* Typhimurium y la lumazina sintasa de *Brucella* abortus. En virtud del desconocimiento respecto de la afectación de la estructura de BLS en presencia de un inserto del tamaño de FliC se seleccionó una secuencia recombinante con delección en el dominio antigénico denominada C131.
- ✓ Se abordaron 2 estrategias distintas de obtención de la quimera: como proteína de fusión o a través de la unión de las proteínas mediante una estructura secundaria rica en leucinas.
- ✓ Se logró purificar la quimera FliC-BLS como proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad empleando el anticuerpo monoclonal anti-flagelina 2B3C5 desarrollado en el presente trabajo de Tesis.
- ✓ Mediante Western blot pudo evidenciarse que la quimera generada presenta en su estructura, las correspondientes a las proteínas que le dieron origen como puede concluirse por su reconocimiento por parte de anticuerpos monoclonales anti-flagelina y anti-BLS.
- ✓ El análisis estructural de la quimera FliC-BLS mediante difracción circular permitió determinar la presencia de las estructuras secundarias correspondientes a ambas proteínas por separado.
- ✓ Pudo demostrarse la capacidad de la quimera de estimular el sistema inmune innato a través de TLR-5 tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando la línea reportera Caco-ccl20-luciferasa y la cepa murina C3H/HeJ.
- ✓ Los ensayos de señalización a través de TLR-4 indican que la quimera BLS-FliC mantiene la capacidad de BLS de señalizar por esta vía, pero se espera confirmarlos empleando ratones TLR-5^{-/-}.

DISCUSIÓN GENERAL

El desarrollo de vacunas a subunidades ha cobrado mayor impulso en las últimas décadas. Esto ha requerido la incorporación de adyuvantes en la formulación vacunal con el objeto de potenciar la respuesta inmune inducida y, de este modo, conferir protección frente a posteriores infecciones. El avance en la identificación y testeo de antígenos vacunales para distintas patologías ha sido mayor que el desarrollo y licenciamiento de nuevos adyuvantes⁵⁸. Actualmente se dispone de pocos adyuvantes de uso permitido en humanos. En los últimos años, la acumulación de evidencia a favor del rol fundamental de la respuesta inmune innata en la programación de una respuesta adquirida específica para cada patógeno ha puesto el foco en la búsqueda de moléculas que posean la capacidad de estimular/modular el sistema inmune innato. Como componente fundamental de la respuesta inmune innata podemos mencionar los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) destacándose entre ellos la familia de receptores tipo Toll por ser los más estudiados hasta el momento. Gracias al conocimiento de la influencia de los receptores tipo Toll sobre la potencia y características de la respuesta adaptativa se ha postulado la utilización de ligandos naturales o sintéticos para esta familia de PRRs como potenciales adyuvantes de uso a través de diversas vías⁹⁴.

Actualmente se ha licenciado el monofosforil lípido A o MPL de *S. Minnesota* como adyuvante para uso en humanos por vía parenteral. Esta porción del LPS de *S. Minnesota* interactúa con TLR-4 y es capaz de aumentar la respuesta de anticuerpos, facilitar la expansión de células T y generar una respuesta de memoria sin causar efectos colaterales de consideración⁹⁶. El licenciamiento de la incorporación del MPL, un agonista de TLR-4, como componente del sistema adyuvante AS04 en la vacuna Cervarix® contra el HPV, es una prueba de concepto para la utilización de ligandos TLR como agentes inmunoestimuladores en el desarrollo de adyuvantes. Esto ha aumentado el interés en el estudio de distintos agonistas de la innata como potenciales adyuvantes, estando estos estudios en la mayoría de los casos en etapa experimental.

Uno de las moléculas que se encuentra en esta situación es la flagelina, el monómero estructural del flagelo bacteriano que ha sido reconocida como un PAMP gracias a su capacidad de interactuar con distintos receptores de reconocimiento de patrón. Flagelina puede promover una respuesta inmune humoral contra sí mismo o contra un antígeno co-administrado ya sea estimulando la liberación de citoquinas

proinflamatorias por la señalización a través del receptor de superficie celular TLR-5, o por la estimulación de la formación del inflamosoma NLRC4¹²¹; necesitando en este último caso de una molécula colaboradora denominada Naip5¹⁷⁶. Por su capacidad de coordinar de esta manera una respuesta inmune adquirida flagelina ha sido probada como adyuvante en diversos sistemas^{136,173,177,178}

En el presente trabajo, en virtud de las propiedades anteriormente descritas de flagelina se la seleccionó como un candidato para ser producido en escala piloto a fin de estudiar sus propiedades inmunoestimuladoras y potencial aplicación como adyuvante. Pudo optimizarse un protocolo de producción que permitió obtener varios cientos de miligramos de proteína que fueron empleados en diversas líneas de investigación dentro de nuestro grupo de trabajo como así también por grupos con los que realizamos proyectos en colaboración. En concordancia con otros reportes^{136,179}, pudimos corroborar que la co-administración de la flagelina producida con el protocolo que logramos optimizar y ovoalbúmina, desencadena una fuerte respuesta mediada por anticuerpos específica contra OVA.

Distintos autores han propuesto el uso de combinaciones de agonistas de receptores tipo Toll como estrategia para generar, o incluso aumentar, la respuesta necesaria para conferir protección frente a futuras infecciones mediante vacunación. El desarrollo de sistemas adyuvantes basados en la incorporación de múltiples agonistas de receptores de reconocimiento de patrón, pertenecientes o no a la familia Toll, en una formulación resultaría una aproximación más cercana a la entrada de un patógeno por lo que la respuesta inducida resultaría más adecuada^{58,67,94,118}. Algunos trabajos han mostrado que las combinaciones de agonistas Toll que resultaron sinérgicas en el orquestado de una respuesta inflamatoria fueron aquellas que incluyeran un agonista que señalice por la vía MyD-88 dependiente con otro que utilice la vía MyD-88 independiente^{119,120}.

En ese contexto, resultaron de interés los trabajos reportados por el grupo del Dr. Goldbaum y colaboradores, quienes identificaron la capacidad agonista de TLR4 por parte de BLS⁷¹. Esta proteína ha mostrado una gran inmunogenicidad¹⁷⁰ y ha sido propuesta como *carrier vacunal*, dado que se requiere de la unión entre BLS y los antígenos co-administrados para desencadenar la producción de anticuerpos específicos contra dichos

antígenos. La posibilidad de fusionar antígenos a su extremo N-terminal y presentarlos repetidamente sobre su estructura decamérica ha hecho de BLS un interesante candidato a ser utilizado como plataforma vacunal^{112,113}.

Por otra parte, siendo flagelina un ligando TLR de entidad proteica, esto permite la generación de proteínas de fusión con el antígeno deseado mediante técnicas de biología molecular. A pesar de sus propiedades como adyuvante mencionadas previamente, se ha reportado que la promoción de una respuesta de células T CD8+ específica contra el antígeno^{102,108} o la inducción de anticuerpos neutralizantes que confieren protección frente a virus solo se observa en el contexto de una proteína de fusión con flagelina y no si ambas proteínas son administradas como entidades separadas^{103,104}.

La generación de una proteína quimérica entre FliC y BLS ha sido uno de los ejes centrales de este trabajo de tesis. El racional de este proyecto es que la fusión de ambos agonistas TLR generase un producto con propiedades altamente inmunogénicas dadas las cualidades de los agonistas que la componen. En efecto, se logró obtener la quimera FliC-BLS lo que significó un desafío dado que representaba el mayor polipéptido insertado en la estructura decamérica de BLS hasta el momento. El análisis estructural de la quimera por western blot evidenció la presencia de las secuencias correspondientes a flagelina y BLS en la quimera mientras que los ensayos de dicroísmo circular permitieron demostrar un correcto plegamiento de ambos agonistas en la molécula. Por su parte, los ensayos de actividad biológica realizados mostraron que la quimera FliC-BLS mantiene la capacidad como agonista para TLR-4 y TLR-5, propia de los agonistas utilizados en su generación.

Por un lado flagelina desencadena la activación de NFκ-B por la vía MyD-88 dependiente, mientras que BLS, por ser un agonista de TLR-4, podríamos pensar que presenta la capacidad de utilizar tanto la vía dependiente como independiente de MyD-88, como lo hace el LPS, aunque estas cuestiones mecanísticas de la señalización de BLS restan por ser evaluadas. Hace pocos años surgió evidencia respecto de la influencia de los TLR sobre la presentación de antígenos en moléculas del complejo MHC II^{180,181}. En dichos trabajos se demostró la selección de antígenos presentados sobre células dendríticas dependiente de la presencia de agonistas TLR en el mismo fagosoma como un mecanismo para la discriminación de moléculas propias y foráneas. Este mecanismo podría explicar el aumento en la respuesta desencadenada al administrar flagelina y el

antígeno en el contexto de una proteína de fusión ya que posibilitaría la presentación del antígeno y la molécula inmunoestimuladora, en este caso flagelina, en la misma célula presentadora de antígeno e inclusive en el mismo fagosoma.

Considerando este concepto, la quimera FliC-BLS obtenida en el presente trabajo resultaría un adyuvante superior respecto a una formulación incorporando ambos agonistas por separado, gracias a que permitiría la presentación del antígeno y los ligandos TLR en la misma molécula. En relación a esto nos proponemos la generación de quimeras mixtas incorporando antígenos de interés como próximo paso inmediato. La obtención de quimeras FliC-BLS-X, siendo X el antígeno de interés, puede lograrse mediante procedimientos de desnaturalización controlada del decámero y recombinación de los pentámeros resultantes a partir de las quimeras FliC-BLS y BLS-X¹¹³. La quimera de interés será aquella que presente flagelina en una de las caras del decámero y el antígeno seleccionado en la otra, pudiendo purificarse por cromatografía de exclusión molecular en función de su peso ya que presentaría un peso promedio entre las quimeras que le dieron origen. Una estrategia alternativa involucra la generación de la quimera mixta a través de la tecnología de *leucine-zipper*¹⁷⁴. Como se mostró en el capítulo 2 pudimos obtener la proteína FliC-leu2 que puede unirse a BLS-leu1 mediante interacciones electrostáticas entre leu1 y leu2 que estabilizan la formación de un heterodímero. De la misma manera, cualquier antígeno fusionado a leu2 (X-leu2) podría utilizarse en la generación de quimeras mixtas mediante combinación al azar de X-leu2, FliC-leu2 y BLS-leu1 dando como resultado FliC-BLS-X. El empleo de esta última estrategia permite ampliar los casos de aplicación de la estrategia para distintos antígenos pero el procedimiento de obtención de un producto resultante de estequiometría definida es más complejo.

Otro mecanismo que ha sido propuesto para explicar la alta inmunogenicidad de flagelina y la particular respuesta observada frente a antígenos fusionados a su molécula es la función como receptor endocítico propuesta recientemente para TLR-5^{182,183}. Esta función, atribuida al receptor de superficie celular de flagelina, demuestra una relación directa entre la inmunidad innata y adquirida sobre la misma molécula dado que la presentación de péptidos provenientes de flagelina sobre moléculas del MHC II fue dependiente del receptor de inmunidad innata TLR-5. Este mecanismo plantea una

explicación a resultados previos¹⁸⁴, donde el compromiso de TLR-5 sobre células dendríticas resultó un requisito para la estimulación de células T CD4⁺ específicas para ovoalbúmina. Sería esperable que estos mismos mecanismos se pongan en juego para la generación de respuesta frente a formulaciones de BLS-FliC-X, aunque resta comprobarlo experimentalmente.

Contrariamente a lo observado para las células T CD4⁺, la promoción de células T CD8⁺ antígeno específicas resultó ser independiente de TLR-5 y MyD88¹⁰⁸ y solo pudo apreciarse en el contexto de una proteína de fusión con flagelina^{102,107,108}. Esta particularidad de flagelina de desencadenar una respuesta mediada por células T CD8+ resulta de interés ante la necesidad de adyuvantes para la generación de vacunas adecuadas contra diversos virus como el de la gripe, VIH, etc. En efecto, se han obtenido proteínas de fusión entre flagelina y el antígeno evolutivamente conservado del virus de la gripe M2e que han superado exitosamente los ensayos clínicos en los que han sido utilizados (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00921947). Por su parte BLS también ha sido fusionado a M2e y los ensayos de inmunización realizados en un modelo murino mostraron un 60% de sobrevida frente al desafío con *influenza* aún en ausencia de adyuvantes¹⁸⁵. La relevancia de flagelina y BLS en el orquestado de una respuesta eficiente frente al ataque de *influenza* nos permite pensar en la quimera FliC-BLS como un potencial adyuvante a ser utilizado en una vacuna frente a éste virus

En el montaje de una adecuada respuesta inmune antiviral el cambio de isotipo IgM a IgG e IgA resulta crucial. Este proceso llevado a cabo por los linfocitos B es dependiente de células T, por lo que la generación de anticuerpos específicos para el patógeno involucra 5 a 7 días. A su vez existen mecanismos T-independientes que permiten la liberación rápida de anticuerpos de baja afinidad especialmente del tipo IgA, lo que proveería una primera línea de defensa contra infecciones¹⁸⁶. En los últimos años ha surgido evidencia importante respecto del rol de las células dendríticas en el establecimiento de una respuesta de anticuerpos mediante un mecanismo T-independiente. Luego del reconocimiento de patógenos a través de receptores TLR las CD liberan factores inductores de anticuerpos y estimuladores de células B entre los que podemos mencionar a BAFF y APRIL que estimulan el “class switch”¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Simultáneamente, los agonistas TLRs pueden activar células B^{186,189}. En relación a la

capacidad de flagelina de estimular células B ha habido reportes encontrados^{190,191}. En cuanto a la señalización mediada por TLR-4 se ha reportado que los linfocitos B murinos pueden ser fuertemente estimulados por LPS mientras que los linfocitos B humanos no expresan TLR-4 por lo que posiblemente haya otros mecanismos que compensen la ausencia de señalización por este TLR para desencadenar la respuesta de linfocitos B¹⁹². El efecto que ejerciera la quimera sobre esta población linfocitaria es otro aspecto interesante de evaluar.

Recientemente ha surgido evidencia respecto de una propiedad interesante de flagelina como es la capacidad de generar una respuesta mucosal aún habiendo sido administrada por vía sistémica¹⁹³. Esta particularidad de flagelina resulta por demás atractiva asumiendo que posiblemente la quimera mantenga esta propiedad.

Recopilando todo lo expuesto, en favor de los agonistas seleccionados y la combinación de agonistas TLR en el desarrollo de adyuvantes novedosos, podemos considerar que en el presente trabajo de Tesis se ha generado una molécula diferente con capacidad agonista dual cuyas potenciales aplicaciones como adyuvante en formulaciones vacunales deberán ser evaluadas próximamente.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

A modo de resumen del presente trabajo de Tesis pueden resaltarse las siguientes conclusiones generales:

- ✓ Se logró optimizar un protocolo para la obtención de flagelina a gran escala utilizando filtración tangencial, lo que permitió la realización de cultivos en condiciones que favorecen la obtención de biomasa como la aireación y la agitación. Esto se tradujo en un incremento de 4 veces en la cantidad de flagelina obtenida y en una reducción de los tiempos de trabajo.
- ✓ El protocolo de producción de flagelina adaptado a escala piloto es fácilmente escalable a volúmenes de cultivo mayores a los empleados en este trabajo.
- ✓ La flagelina obtenida con este nuevo protocolo presentó actividad biológica comparable a la producida en el laboratorio y mostró ser estable en todas las temperaturas de almacenamiento evaluadas.
- ✓ Se obtuvo un panel de 4 anticuerpos monoclonales anti-flagelina que resultaron de suma utilidad en diversas aplicaciones durante el transcurso del presente trabajo.
- ✓ En particular, el anticuerpo 5B4H2 resultó capaz de aglutinar de manera específica *Salmonella* Typhimurium lo cual lo postula como una herramienta para ser utilizada en ensayos de serotipificación. El anticuerpo 2B3C5 fue empleado exitosamente en la purificación por cromatografía de afinidad de flagelina y proteínas de fusión generadas durante el presente trabajo.
- ✓ Se generó una proteína quimérica a partir de una variante corta de flagelina de *Salmonella* Typhimurium (C131) y la lumazina sintasa de *Brucella abortus*. El análisis estructural de la quimera FliC-BLS mediante dicroísmo circular y el análisis inmunoquímico empleando anticuerpos anti-BLS y anti-flagelina permitió determinar la presencia de las estructuras correspondientes a las conformaciones nativas de ambas proteínas por separado, lo que es evidencia de un correcto plegamiento.
- ✓ Pudo demostrarse la capacidad de la quimera de estimular el sistema inmune innato a través de TLR-5 mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los

resultados obtenidos indican que la quimera es capaz de estimular también la vía de TLR-4.

En virtud de las conclusiones desprendidas de los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Tesis, se plantean las siguientes perspectivas:

- ✓ **Evaluación de la capacidad de la quimera FliC-BLS de estimular el sistema inmune innato a través de TLR-4 empleando animales genéticamente deficientes en TLR5.** Se obtuvo financiamiento para el proyecto “Análisis de la respuesta inmune desencadenada por una nueva Plataforma Vacunal basada en una proteína de fusión entre flagelina de *Salmonella* y Lumazina Sintetasa de *Brucella* (Bls): Empleo de cepas murinas con deficiencias en distintas vías de la respuesta innata para la disección de los mecanismos de acción” a través del programa “ECOS Sud 2013-2015”. Esto nos permitirá realizar estadías en el laboratorio del Dr Jean Claude Sirard en el Instituto Pasteur de Lille donde se dispone de diferentes cepas murinas knockout, entre ellas TLR-5^{-/-} y MyD88^{-/-}, cuyo empleo nos permitirá dilucidar las vías de señalización comprometidas por la quimera.
- ✓ **Generación de quimeras mixtas y diseño de ensayos de adyuvanticidad.** La quimera FliC-BLS resulta una molécula novedosa obtenida a partir de 2 proteínas con capacidad adyuvante y/o carrier comprobada. Atendiendo la posibilidad de generar quimeras mixtas mediante el plegamiento controlado de la estructura de BLS, nos proponemos generar una quimera polivalente FliC-BLS-OVA, la cual resultará un modelo de utilidad para estudiar la ventaja de presentar el antígeno y los adyuvantes en la misma molécula en comparación con la co-administración de los mismos. Para lograr este propósito disponemos de las siguientes proteínas: BLS-OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎, C131-OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎, FliC-BLS, C131 y BLS. La disponibilidad de ratones transgénicos OT-I cuyo receptor de células T reconoce exclusivamente el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ presentado sobre moléculas del MHC clase I nos permitirá diseñar diferentes ensayos de adyuvanticidad basados en la administración de combinaciones de las proteínas mencionadas a fin de evaluar las ventajas de la quimera FliC-BLS como plataforma para el display de antígenos de interés.

- ✓ **Caracterización de los mecanismos de inducción de respuesta inmune por la proteína de fusión FliC-BLS a través de diferentes vías.** Teniendo en cuenta las propiedades de las proteínas empleadas en la generación de la quimera, en particular la capacidad de flagelina como adyuvante mucosal, resulta atractivo evaluar el potencial de la quimera para desencadenar una respuesta inmune luego de su administración por diferentes vías, con especial interés en vías mucosales como intranasal u oral. En este sentido, esperamos que la capacidad de flagelina de activar la vía de TLR5 mejore la captación antigénica y la capacidad de BLS de interactuar con poblaciones de células presentadoras de antígeno de las distintas mucosas.
- ✓ **Uso de FliC-BLS como antígeno vacunal para *Brucella*.** BLS recombinante *per se* ha demostrado ser un antígeno efectivo para la inmunización contra *Brucella abortus*. A su vez, el empleo de diferentes adyuvantes ha aumentado la respuesta generada por lo que nos planteamos la utilización de FliC-BLS como antígeno en ensayos de inmunización y desafío, explotando las propiedades de flagelina como adyuvante.

MATERIALES Y MÉTODOS

III.I CEPAS

En el presente trabajo se utilizaron las cepas murinas Balb/C, criados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP y C3H/HeJ, proveniente de Jackson Laboratories y criados en el Instituto Biológico Argentino BIOL SAIC. Esta última es deficiente en la funcionalidad del receptor TLR-4 debido a una mutación puntual en el gen que sustituye un residuo conservado de prolina en el dominio intracitoplasmático del receptor por un residuo de lisina⁶⁴.

En todos los casos fueron empleados animales hembras de 4 a 6 semanas de edad.

La cepa bacteriana empleada para la obtención de flagelina (FliC) fue *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SIN22¹⁴³. Las cepas *Serratia marcescens*, *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus cereus* B10502 provienen del cepario de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas UNLP facilitadas generosamente por la Dra. Ivanna Rolny.

Los reactivos utilizados provienen de Sigma (St Louis, USA) a menos que se especifique lo contrario.

III.II OBTENCIÓN DE FLAGELINAS DE DISTINTOS MICROORGANISMOS

Se obtuvo flagelina a partir de *Salmonella* Typhimurium SIN 22, *Serratia marcescens*, *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus cereus* B10502. Las bacterias se cultivaron durante 16 horas a 37 ° C, 180 rpm en medio LB. Los flagelos fueron separados de la superficie bacteriana por agitación vigorosa en vortex, recuperados por ultracentrifugación, y sometidos a un tratamiento térmico para liberar monómeros de flagelina (ver detalles más adelante). Las preparaciones de flagelina se almacenaron a -20°C hasta su uso. La flagelina de *B. japonicum* fue suministrada desinteresadamente por la Dra. María Julia Althabegoiti. Una flagelina fase I recombinante de *S. enterica* serovar Typhimurium con una delección entre los aminoácidos 201 a 368 (C131)¹⁶⁵ fue producida en *E. coli* BL21 Codón PLUS. A partir de un cultivo ON se obtuvieron los cuerpos de inclusión que fueron desnaturalizados en urea 8M y replegados para purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad utilizando un His-Tag. El plásmido

portando la secuencia correspondiente a FliC C131 fue provisto por el Dr. Jean Claude Sirard (Instituto Pasteur Lille, Francia).

III.III CONDICIONES DE CULTIVO Y PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE FLAGELINA A GRAN ESCALA

Se inocularon 5 mililitros de medio TSB (Merck Cat. No. 1.05459, Alemania) con *Salmonella* Typhimurium SIN22 y se incubaron durante 6 horas a 37°C con agitación. Un ml de este cultivo fue diluido en 200 ml de medio fresco y crecido durante toda la noche. Este cultivo se utilizó como inóculo de 10 litros de TSB que fueron cultivados bajo las siguientes condiciones: (1) botellón estático durante 72 horas a 37°C (2) biorreactor durante 3 h a 37°C con una tasa de flujo de aire de 10 l/min sin agitación o (3) aireación y agitación en 420 rev/min en un biorreactor durante 3 h a 37°C con una tasa de flujo de aire de 10 l/min.

En los casos donde se indica los cultivos fueron inactivados con formaldehído al 0,6% v/v, azida sódica 0,1% o tindalización (3 rondas de calentamiento a 60°C 30' cada vez); o concentrados mediante filtración tangencial utilizando una columna con cartuchos de fibra hueca con 2.800 cm² de superficie y diámetro de poro de 0.1 µm, modelo # CFP-1-E-6A, GE Healthcare y una bomba peristáltica, modelo 620S, Watson-Marlow, (Brasil).

Para evaluar la conveniencia de combinar la filtración tangencial con procedimientos adicionales posteriores, un cultivo estático de 10L se concentró con filtración tangencial para obtener 1L de cultivo bacteriano. La suspensión bacteriana concentrada se separó en tres fracciones que se procesaron diferencialmente para liberar sus flagelos. Una fracción de 200 ml fue tratada mediante agitación vortex por 2 min a 30 Hz (2X³, VELP científica, Italia). Una segunda alícuota de 400 ml fue tratada con agitación orbital a 200 rpm durante 5 min (M-23, Viking, Argentina) y un tercera (400 ml) fue ultracentrifugada directamente sin tratamiento adicional para evaluar el grado de liberación flagelar alcanzado por la filtración tangencial. En todos los casos, antes de ultracentrifugar, se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 5.000 rpm por 30 min (Himac CR22G II con rotor R9A, Hitachi Co., Japón). Finalmente se recuperaron los flagelos a partir del sobrenadante libre de células por ultracentrifugación a 40000 rpm durante

1.5 h a 4°C (ultracentrífuga Beckman, Fullerton, CA, USA). El pellet flagelar se resuspendió en PBS y se calentó a 70°C para despolimerizar el flagelo. Luego se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 30' a 4°C (Centrífuga 5804, R. Eppendorf, Alemania) para eliminar LPS y otros posibles restos bacterianos. Se recuperó un sobrenadante límpido conteniendo flagelina. La cuantificación de proteína durante los diferentes pasos del proceso se realizó por el método del ácido bicinconínico BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) de acuerdo a indicaciones del fabricante.

III.IV SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

La pureza de todas las proteínas obtenidas en el presente trabajo fue caracterizada por SDS-PAGE¹⁹⁴ utilizando geles de acrilamida/bis-acrilamida 12% para separación y 4% para apilamiento. La corrida electroforética se realizó de la siguiente manera: 15' a 30 mA y luego 1 hora a 50 mA (Mini PROTEAN® Tetra Cell, BIO RAD). La tinción se realizó con Coomassie Blue¹⁹⁴. Para los ensayos de inmunotransferencia el gel sin teñir fue transferido a membrana de nitrocelulosa a 300 mA durante 1 hora (Mini Trans-Blot® Electrophoretic transfer cell, BIO RAD). El bloqueo se realizó con TBS al 5% de leche descremada Molico. Entre cada paso de incubación se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0,05%. El diluyente utilizado fue TBS al 3% de leche descremada Molico. Donde corresponde, los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-flagelina 2B3C5 1/2000, anti-BLS B5D4 1/3000 o suero de ratón inmunizado con flagelina 1/500 en buffer diluyente. En todos los casos el anticuerpo secundario fue anti-IgG murino conjugado a peroxidasa (BIO-RAD) 1/2000 en buffer diluyente.

III.V ANÁLISIS POR MALDI-TOF

Para el análisis de la proteína obtenida utilizando el protocolo a gran escala se utilizó la técnica de masa de huellas (peptide mass fingerprint PMF). Las bandas resultantes del SDS-PAGE fueron recuperadas y enjuagadas tres veces con acetonitrilo, luego de secarse los péptidos fueron metilados con carbamida por reducción con DTT 5 mM en bicarbonato de amonio y se incubaron durante 30 min desde 56 a 60°C. A continuación, fueron tratados con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato de sodio 50 mM

y digeridos con 5 μ l de tripsina 0,02 mg/ml durante 30 min a 4°C. Este extracto se mezcló con 0,4 g de matriz ácida (ácido α -ciano-4-hydroxicinnámico)/l de agua bidestilada:acetoneitrilo en una relación 1:1, con ácido trifluoroacético al 0,5%. Luego se colocó una alícuota de 0,4 μ l en un AnchorChip 384/600 (Bruker, Billerica, MA, USA). Las muestras se analizaron en el espectrómetro de masas TOF de Ultraflex II (Bruker, Billerica, MA, USA) en el modo de reflectron positivo, registrando la intensidad de los picos entre 800 y 3.000 Da para análisis. Para determinar la secuencia correspondiente a los picos se utilizaron los programas Bio-Tools y Mascot.

III.VI DETOXIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

La flagelina fue detoxificada usando columnas de polimixina B (Detoxi- Gel AffinityPak™ Pre-packed Columns 20,344, Pierce, Rockford, IL, USA). Los niveles de endotoxina (2.5×10^{-3} UE/ μ g FliC) se determinaron mediante LAL Test (Limulus Amoebocyte Lysate) en un ensayo de punto final utilizando la técnica Gel-Cloth de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Charles River Endosafe®, San Diego, CA, USA). Se utilizó el reactivo de LAL y un estándar de endotoxinas de *E. coli* 055:B5 (Charles River Endosafe®, San Diego, CA, USA).

III.VII TEST DE PIROGENICIDAD EN CONEJOS

La prueba de pirógenos fue realizada e interpretada según normas de United States Pharmacopeia (USP) <151>. Tres conejos por grupo fueron inyectados con 100 μ g/kg de peso corporal de FliC o FliC detoxificada y se registró cualquier aumento de la temperatura rectal en las siguientes 3 horas.

III.VIII CONTROL DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La actividad biológica de las proteínas centrales de este trabajo se determinó mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* que se detallan a continuación. Para el análisis transcripcional realizado en el capítulo 1 se utilizó una preparación de flagelina digerida con tripsina como control. Una fracción de flagelina purificada fue tratada por 2 h a 37°C

con Tripsina al 5%–EDTA 10 X (GIBCO, Canadá), seguido por una inactivación de 10 min a 80°C. El resultado de la proteólisis se evaluó por SDS-PAGE como se describió anteriormente.

III.IX ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO*

Se utilizó la línea reportera Caco-ccl20-luciferasa como se describió previamente^{111,144}. Las células fueron estimuladas en placa de 48 pocillos (Greiner-Bio-One, Germany) con las cantidades indicadas de cada proteína durante 6 horas, luego de lo cual fueron lisadas y se midió actividad luciferasa utilizando un kit comercial (Luciferase Assay System, Promega, Madison, WI, USA) y un luminómetro (Labsystems, Finlandia) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En todos los casos se utilizaron al menos 3 fosas para calcular el promedio y el resultado se expresó como incremento relativo al control no estimulado o como actividad porcentual de la correspondiente a flagelina en los casos en que se especifica.

III.X ANÁLISIS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VIVO*

Lotes de ratones Balb/c fueron estimulados con 10 µg de flagelina detoxificada en 300 µl de PBS libre de pirógenos por inyección intraperitoneal (IP) ó 1 µg de flagelina detoxificada en 40 µl de PBS libre de pirógenos por vía intranasal (IN) bajo anestesia leve con éter. Después de 2 hs, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se tomó una porción de duodeno, ileum, hígado, pulmón izquierdo o estómago a partir de los estimulados IP y el pulmón izquierdo a partir de los estimulados IN.

III.XI ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES MEDIANTE QPCR

Los órganos fueron procesados para extracción de RNA total (illustra RNA spin mini kit (GE Healthcare, Germany) realizando el tratamiento con DNAsa de acuerdo a instrucciones del fabricante. Para la transcripción reversa se utilizó 1 µg de RNA y la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), como fuera descrito previamente^{111,144}. El cDNA fue amplificado por PCR usando los siguientes primers:

CCL20 forward 5'TTTTGGGATGGAATTGGACAC3' y reverse 5'TGCAGGTG AAGCCTTCAACC3', IL-6 forward 5'GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA3' y reverse 5' AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA3' ó β -actina forward 5'CGTCATCCATGGCGAACTG3' y reverse 5'GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT3' y 2X iQ™ 200 SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Se realizó una desnaturalización a 95°C 5 min seguida por 40 ciclos de amplificación consistentes: en 30" a 95°C y 30" a 60°C usando el termociclador iCycler iQ (BioRad, USA). Los datos fueron analizados haciendo el cálculo de $\Delta\Delta C_t$ normalizando los niveles de expresión de todos los genes respecto de los niveles de expresión de β -actina¹⁹⁵. Los resultados fueron expresados como incremento relativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) respecto de los valores correspondientes a los animales controles.

III.XII ENSAYOS DE ADYUVANTICIDAD

Lotes de ratones Balb/c fueron inmunizados con 10 μ g de OVA ó 10 μ g de OVA co-administrados con 1 μ g de FliC bajo el siguiente esquema: día -1 sangrado, días 0 y 21 inmunizaciones, día 25 sacrificio. Se evaluó la presencia de anticuerpos anti-OVA mediante ELISA indirecto y se determinaron isotipos como se detalla en las secciones 16 A) y C) respectivamente.

III.XIII ENSAYOS DE ESTABILIDAD

Se evaluó la estabilidad de flagelina (FliC) de *Salmonella* Typhimurium SIN22 y de la quimera FliC-BLS. Se almacenaron viales de vidrio con 100 μ l de FliC 100 μ g/ml a -20°C, 4°C y 25°C. A los días 7, 15, 60 y 270 se tomaron 3 viales al azar de cada condición y se evaluó la integridad de la proteína mediante SDS-PAGE y medida de actividad biológica sobre células Caco-ccl20-luciferasa como se detalla en las secciones 4 y 9 respectivamente. La quimera FliC-BLS se almacenó en tubos de plástico en alícuotas de 50 μ l en las siguientes condiciones: sola a 4°C, sola a -20°C, con BSA 5mg/ml a -20°C, con glicerol al 50% a -20°C o, con BSA 5mg/ml en glicerol 50% a -20°C. La integridad de la proteína fue evaluada a los días 7, 15 y 27 con los mismos ensayos realizados para FliC.

III.XIV PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Lotes de dos ratones Balb/c recibieron por vía intraperitoneal con 1 µg de FliC con/sin Al(OH)₃ 1µg/µl en 300 µl de PBS; al día 30 se evaluó el título de anticuerpos anti-flagelina mediante ELISA utilizando un anticuerpo anti-IgG murino conjugado a peroxidasa (BIO-RAD) 1/2000 para la detección. El animal con mejor respuesta inmune se utilizó en la producción de anticuerpos monoclonales según la técnica de Kohler y Milstein¹⁶⁴. Tres días previo al sacrificio el animal seleccionado recibió un último estímulo de 1 µg de FliC en ausencia de adyuvante. Se procedió al aislamiento del bazo y las células fueron fusionadas con células de mieloma murino NSO. Las células fusionadas fueron distribuidas en 5 placas de 96 pocillos con medio suplementado con hipoxantina-aminopterinatimina y mantenidas en estufa a 37°C con atmósfera de CO₂ 5%. Las placas fueron alimentadas una semana más tarde y a los 15 días se procedió a la selección de hibridomas productores de anticuerpos anti-flagelina mediante ELISA de los sobrenadantes de cultivo utilizando flagelina detoxificada para sensibilizar las placas. Los hibridomas positivos fueron amplificados y clonados por dilución límite en medio hipoxantina-aminopterinatimina para asegurar la monoclonalidad del hibridoma. Los clones obtenidos se preservaron en crioviales conteniendo 1 ml de suero fetal bovino Gibco con DMSO al 10% y fueron almacenados en nitrógeno líquido.

III.XV PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-FLAGELINA

Grupos de 4 ratones Balb/c fueron administrados con 500 µl de Pristane. Posteriormente, a la semana, se procedió a la inyección intraperitoneal de 2x10⁶ células de hibridoma en 500 µl de PBS en cada animal y al cabo de 2 semanas se colectó el líquido ascítico generado. Toda la ascitis obtenida correspondiente a los diferentes clones se procesó separadamente. Para comenzar se concentró mediante precipitación con sulfato de amonio al 50%, el precipitado se mantuvo a 4°C toda la noche y posteriormente se separó del sobrenadante por centrifugación durante 20' a 5000 rpm para resuspenderse en un tercio del volumen inicial de PBS. Se dializó contra borato de sodio 10 mM pH=7,5 y se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna de proteína A (protein A 5 ml Hi Trap HP G&E). La elusión se realizó con glicina 100mM

pH=3 y se colectaron fracciones de 1ml en 100 µl de Tris-HCl pH=8 para neutralizar. Se seleccionaron las fracciones enriquecidas en anticuerpo por SDS-PAGE y luego de dializarlas contra PBS se almacenaron a -20°C.

III.XVI CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD UTILIZANDO EL ANTICUERPO ANTI-FLIC 2B3C5

El anticuerpo purificado fue conjugado a una resina activada (NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow G&E) de acuerdo a indicaciones del fabricante. La resina se utilizó para detoxificar flagelina y en la purificación de la quimera FliC-BLS. En ambos casos el procedimiento en batch fue el siguiente:

- Incubación de las proteínas en buffer TBS pH: 8,4 con la resina 3 hs a 4°C,
- Centrifugación 3 minutos a 2500 rpm para recuperar la fracción no unida (V0),
- 6 lavados con TBS pH=8,4,
- La elusión se realizó con glicina 100mM pH=3, colectando fracciones de 1 ml en 100 µl de Tris 1M pH= 8 para neutralizar.

Todas las fracciones colectadas fueron analizadas por SDS-PAGE como se detalló anteriormente.

III.XVII CONJUGACIÓN DE LOS ANTICUERPOS CON BIOTINA

Los anticuerpos 2B3C5, 4C1H7 y 5B4H2 fueron conjugados con N-hidroxisuccinamida biotina mediante el siguiente procedimiento: un miligramo de anticuerpo se dializó contra buffer borato 0,1M pH 8,8 ON, se agregó el volumen correspondiente a 125 µg de biotina de una solución 10 mg/ml en DMSO y se incubó durante 4 hs a temperatura ambiente (TA). Se agregaron 10 µl de NH₄Cl 1M y se incubó 10 minutos a TA. Los anticuerpos se dializaron contra PBS pH=7,4 para eliminar la biotina libre y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

III.XVIII ELISA

En todos los casos se procedió a la sensibilización de placas de 96 pocillos (Nunc-Maxisorp®) con 100 µl/pocillo del antígeno en PBS 10µg/ml. El bloqueo se realizó con 200 µl/pocillo de PBS al 3% p/v de leche descremada Molico. El diluyente fue PBS al 1% p/v de leche descremada Molico.

A) Para la evaluación del reconocimiento de flagelinas de distintos microorganismos o FliC C131 se realizó ELISA indirecto utilizando los anticuerpos monoclonales anti-FliC 2B3C5, 4C1H7, 5B4H2 o 2D11A1 diluídos 1/1000 como anticuerpo primario, 100 µl/pocillo. Como anticuerpo secundario se usó un anti-mouse IgG total conjugado a peroxidasa 1/2000. Se reveló con OPD 1 mg/ml en buffer de ácido cítrico y fosfatos 0,1 M (pH= 5) adicionado con H₂O₂ al 30% (1 µl/ml) y se incubó unos minutos hasta observar coloración. La reacción se detuvo por agregado de 50 µl por fosa de H₂SO₄ 4 N. Se midió la absorbancia a 492nm.

B) Para la evaluación de solapamiento de epitopes se realizó un ELISA de competencia usando flagelina de *Salmonella* Typhimurium SIN 22 como antígeno. Se evaluó el desplazamiento de los anticuerpos biotinilados 1/1000 frente a diluciones seriadas 1/3 de los anticuerpos sin marcar comenzando por 1/50. Como conjugado se utilizó estreptavidina-fosfatasa alcalina 1/1000 y se reveló con p-nitrofenilfosfato (PNPP) 1 mg/ml en buffer dietanolamina 1M pH= 9,8 incubándose 20 minutos. La reacción se detuvo por agregado de 50 µl por fosa de EDTA 0,1M. Se midió la absorbancia a 405nm.

C) Para la medida de anticuerpos séricos anti-OVA se realizó ELISA indirecto como se describió en A) empleando una dilución 1/200 del suero murino como anticuerpo primario. La determinación de isotipos se realizó sobre una dilución 1/50 del suero utilizando anti IgG1 murino 1/8000 o anti-IgG2a murino 1/2000 conjugados a peroxidasa (BioRad). Se reveló como se detalla en A).

III.XIX ENSAYOS DE AGLUTINACIÓN

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se enumeran en la Tabla 1. Las cepas se cultivaron a 37° C en placas de agar de soja triptica (TSA) o placas de Sven-

Gard (0,7% de agar en caldo nutritivo) para la evaluación de antígenos somáticos o flagelares respectivamente, mediante pruebas de aglutinación. Todos los aislamientos de Salmonella fueron confirmados bioquímica y serológicamente en el Centro Nacional de Salmonella (NSC, Instituto de Higiene, Universidad de la República, Uruguay).

Para los ensayos de aglutinación bacteriana las cepas fueron crecidas ON a 37°C en placas de agar Sven Gard conteniendo 20 µl de suero hiperinmune específico para el antígeno flagelar de fase 1 o 2 según se requiera. Al día siguiente una ansada del spot inoculado se resuspendió homogéneamente en solución salina (8,5% NaCl) en portaobjetos. La suspensión bacteriana se mezcló con 50 µl de suero hiperinmune específico o el anticuerpo monoclonal puro o diluido. Luego de incubar 30' a 37°C se determinó visualmente la presencia o ausencia de aglutinación.

Tabla 1: Cepas utilizadas en los ensayos de aglutinación

Cepa	Descripción (formula antigénica)	Fuente y/o referencia
<i>S. Typhimurium</i>	NSC Cepa de referencia (4,12:i:1,2)	Instituto Pasteur, Paris*
<i>S. Frankfurt</i>	NSC Cepa de referencia (16:i:e,n,z15)	Instituto Pasteur, Paris
<i>S. Infantis</i>	NSC Cepa de referencia (6,7:r:1,5)	Instituto Pasteur, Paris
<i>S. Makiso</i>	NSC Cepa de referencia (6,7:1,z13,z28:z6)	Instituto Pasteur, Paris
<i>S. Newport</i>	NSC Cepa de referencia (6,8:e,h:1,2)	Instituto Pasteur, Paris
<i>S. Paratyphi B</i>	NSC Cepa de referencia (4,12:b:1,2)	Instituto Pasteur, Paris
<i>S. Enteritidis</i>	NSC Cepa de referencia (9,12:g,m:-)	Instituto Pasteur, Paris
<i>S. Derby</i>	NSC Cepa de referencia (4,12:f,g:-)	Instituto Pasteur, Paris
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	Cepa de referencia (NCTC 13347) (4,12:i:1,2)	National Collection of Type Cultures (NCTC), Inglaterra
<i>S. Enteritidis</i> CIDCA 101	(9,12:g,m:-)	CIDCA, CCT La Plata, CONICET**
<i>S. Bredeney</i> M 655/05	(4,12:l,v:1,7)	Instituto Biológico Dr. Tomás Perón, La Plata***
<i>S. Saintpaul</i> M 213/05	(4,[5],12:e,h:1,2)	Instituto Biológico Dr. Tomás Perón, La Plata
<i>S. Newport</i> M 389/06	(6,8:e,h:1,2)	Instituto Biológico Dr. Tomás Perón, La Plata
<i>S. Anatum</i> OS-A	(3,{10}:e,h:1,6)	Instituto Biológico Dr. Tomás Perón, La Plata
<i>S. Typhimurium</i> SIN 22	(4,12:i:1,2)	Didierlaurent et al
<i>S. Typhimurium</i> SIN 41	(4,12:i:1,2)	Didierlaurent et al

* Cepas obtenidas del centro Internacional de salmonella (CIS), Instituto Pasteur, París, pertenecientes a la colección del NSC.

** Cepas pertenecientes a la colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), La Plata, Argentina.

***Cepas aisladas a partir de alimentos en el Departamento Laboratorio Microbiológico, Dirección de Laboratorio y Control, Instituto Biológico Dr. Tomás Perón, La Plata, Argentina.

III.XIX.I TINCIÓN DE SALMONELLA CON CARBOXIFLUORESCÉINA DIACETATO SUCCINIMIDYL ESTER (CFSE)

Aislados de Salmonella provenientes del cepario del CIDCA y del Instituto Biológico Dr. Tomás Perón, La Plata fueron incubados durante 45 minutos a 37°C en una solución 10 mM en PBS de CFSE (Invitrogen) en una relación 10^9 UFC/ml. El pellet bacteriano obtenido por centrifugación durante 10 minutos a 10000g fue lavado tres veces con PBS resuspendiéndose finalmente en 1 ml de buffer. Se repitió el procedimiento detallado anteriormente y se registró presencia o ausencia de cúmulos de bacterias aglutinadas empleando microscopio de fluorescencia.

III.XX. ESTRATEGIA DE OBTENCIÓN DE LA QUIMERA FLIC-BLS

En principio, a partir de un plásmido portando la construcción codificante para FliC $_{\Delta 174-400}$ se generaron fragmentos de 723pb y 483pb mediante PCR utilizando primers diseñados para insertar los sitios de restricción correspondientes a Afl II y Nsi I. Los fragmentos fueron subclonados en el plásmido TOPO Blunt (Invitrogen). Las construcciones resultantes y el plásmido pET11a portando la secuencia de BLS fueron digeridas con las enzimas Afl II y Nsi I (New England Biolabs). Los fragmentos correspondientes a flagelina y el plásmido portando la secuencia de BLS fueron purificados a partir de gel de agarosa con kit comercial de acuerdo a indicaciones del fabricante (QIAquick®, QIAGEN) y ligados para generar las construcciones FliC-BLS.

Finalmente, los plásmidos pET11a con las construcciones correspondientes a FliC-leu2 y FliC-BLS fueron adquiridos a la empresa especializada en síntesis de genes GenScript. A continuación se muestran las secuencias correspondientes a cada proteína quimérica:

FliC-BLS

GCTAGCATGCATatggcacaagtcattaatacaaacagcctgtcgtgttgaccagaataacctgaacaaatcccagtcgctctggg
caccgctatcgagcgtctgtcttccggctcgtatcaacagcgcgaaagacgatgcggcaggtcaggcgattgctaaccgtttaccgcgaa
catcaaaggtctgactcaggcttccgtaacgctaacgacggtatctcattgcgagaccactgaaggcgcgctgaacgaaatcaacaac
aacctgcagcgtgtcgtgaactggcggttcagtctgctaacagcaccaactcccagtcgacctgactccatccaggctgaaatcaccca
gcgctgaacgaaatcgaccgtgatccggccagactcagttcaacggcgtgaaagtctggcgcaggacaacaccctgaccatccaggtt
ggtgccaacgacggtgaaactatcgatatcgatctgaagcagatcaactctcagaccctgggtctggatacgtgaatgtgcaaaaaat
ataaggtcagcgatacggctgcaactgttacaggatatgccgatactacgattgctttagacaatagtaaaaccgaagttgttctattggg
gtaaaacttacgtgcaagtaaagccgaaggtcaaacctttaaagcacagcctgatctggcggaaaggcgtgctacaaccaccgaaaacc
cgctgcagaaaattgatgctgtttggcacaggttgacacgttacgttctgacctgggtgcggtacagaaccgtttcaactccgctattacca
cctgggcaacaccgtaaacactgacttctgccgtagccgatcgaagattccgactacgcgaccgaagttccaacatgtctcgcgcg
agattctgcagcaggccgtacctccgttctggcgcaggcgaaccaggttccgaaaactcctctcttactgctg**GGTTCTGGTTCTG**
GTCTTAAGACATCCTTTAAAATCGCATTATTAGGCCCGCTGGCACGCCGACATCGTTGACGAAGCGCGC
AAAAGCTTTGTGCCGAACTGGCCGAAAGACGGGTGGCAGCGTCGAGGTAGAGATATTCGACGTGCCG
GGTGATATGAAATCCCCTTACGCCAAGACATTGGCCAGAACCGGGCGCTATGCAGCCATCGTCGGTGC
GGCCTTCGTGATCGACGGCGGCATCTATCGTCATGATTCGTGGCGACGGCCGTATCAACGGCATGATGC
AGGTGCAGCTTAAACGGAAGTGCCGGTCTGAGCGTCGTGACGCCGACCATTTCCATGAAAGCAA
GGAGCATCACGACTTCTCCATGCTCATTTCAGGTGAAGGGCGTGGAAGCGGCCATGCCGCTTGCAGA
TCGTGAGCGAGCGCAGCCGCATCGCGCTTGTCTGA**GCTAGC**

Letras minúsculas: secuencia C131, letras mayúsculas: secuencia BLS **linker** **sitio Afl II**

sitio NheI **sitio Nsi I**

FliC-leu2

GCTAGCatggcacaagtcattaatacaaacagcctgtcgtgttgaccagaataacctgaacaaatcccagtcgctctggg
caccgctatcgagcgtctgtcttccggctcgtatcaacagcgcgaaagacgatgcggcaggtcaggcgattgctaaccgtttt
accggaacatcaaaggtctgactcaggcttccgtaacgctaacgacggtatctcattgcgagaccactgaaggcgcgctg
aacgaaatcaacaacaacctgcagcgtgtcgtgaactggcggttcagtctgctaacagcaccaactcccagtcgacctcgac
tccatccaggctgaaatcaccagcgcctgaacgaaatcgaccgtgatccggccagactcagttcaacggcgtgaaagtctg
gcgaggacaacaccctgaccatccaggttggtgccaacgacggtgaaactatcgatatcgatctgaagcagatcaactctcag
acctgggtctggatacgtgaatgtgcaaaaaatataaggtcagcgatacggctgcaactgttacaggatatgccgatact
acgattgctttagacaatagtaaaaccgaagttgttctattgggtgtaaaacttacgtgcaagtaaagccgaaggtcacaact
ttaaagcacagcctgatctggcggaaaggcgtgctacaaccaccgaaaaccgctgcagaaaattgatgctgtttggcacagg
ttgacacgttacgttctgacctgggtgcggtacagaaccgtttcaactccgctattaccaactgggcaacaccgtaaacact

gacttctgcccgtagccgtatcgaagattccgactacgcgaccgaagttccaacatgtctcgcgcgagattctgcagcaggcc
ggtacctccgttctggcgcaggcgaaccagggtccgcaaacgtcctctctttactgcgtGGTTCTGGTTCTGGTCTGGA
AATTGAAGCGGCGTTTCTGGAACGTGAAAACACCGCGCTGGAAACCCGTGTGGCGGAACTGCGT
CAGCGTGTGCAGCGTCTGCGTAACCGTGTGAGCCAGTATCGTACCCGTTATGGCCCGCTGGGCG
GCGGCAAATGAGCTAGC

Letras minúsculas: secuencia C131, letras mayúsculas: secuencia leu2 Linker Sitios Nhe I

III.XXI PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS QUIMERAS

Los plásmidos se transformaron en células competentes *E. coli* BL21 Codón Plus para la expresión de la proteínas recombinantes. Los cuerpos de inclusión fueron solubilizados por incubación overnight en buffer 50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA pH 8 con urea 8 M. Las proteínas solubles fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot como se describe en la sección 4. La quimera FliC-BLS se dializó contra buffer Tris y se purificó por cromatografía de afinidad en batch utilizando anticuerpos monoclonales anti-flagelina como se indica en la sección 14. La proteína se cuantificó por determinación de absorbancia a 280nm luego de calcular el coeficiente de absortividad molar (ϵ) en base a la secuencia utilizando el programa ExPASy ProtParam tool.

III.XXII CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE FLIC-BLS

III.XXII.I ANÁLISIS POR DICROÍSMO CIRCULAR

Espectros de dicroísmo circular (DC) de FliC-BLS, BLS y C131 en la región de UV lejano (255–200 nm) se midieron en un espectropolarímetro (JASCO J-810) en buffer PBS pH=7.4 a 25 ° C, utilizando cubetas de cuarzo de 1 o 5 mm de camino óptico. También se obtuvo el espectro de dicroísmo circular a 222nm en función de la temperatura. Los datos fueron convertidos a la elipticidad molar $[\theta]$ por dmol de proteínas (en unidades de grados x cm² x dmol prot⁻¹).

III.XXII.II MODELADO ESTRUCTURAL

La estructura teórica de la quimera FliC-BLS fue modelada con los programas PyMOL(TM) Incentive Product-Copyright (C) 2006 DeLano Scientific LLC, y Coot 0.7 Clayton (revision 4459). Para obtener la secuencia de C131 se quitaron los residuos extra a partir de la secuencia de flagelina de Salmonella Typhimurium (Código PDB 1UCU). Dicha secuencia se fusionó con el extremo N-terminal de la estructura de BLS (código PDB: 1X1N) a través de un pentapéptido linker de secuencia GSGSG.

III.XXIII OBTENCIÓN DE CÉLULAS DEL ESPACIO BRONQUIOALVEOLAR Y PERITONEO

Grupos de ratones C3H/HeJ fueron estimulados con FliC (6 µg), FliC-BLS (6 µg) o BLS (1,8 µg) en 40 µl de PBS libre de pirógenos como vehículo por vía intranasal o en 300 µl de vehículo por vía intraperitoneal. El grupo control recibió 40 o 300 µl de vehículo por la vía correspondiente.

Para estos ensayos los animales fueron estimulados con las dosis mencionadas y luego de 16 hs sacrificados por administración intraperitoneal de dosis apropiadas del compuesto comercial EUTHANYLER, según indicaciones del proveedor.

El lavado bronquioalveolar (BAL) se realizó por canulación de la tráquea e introducción y aspiración de 1 ml de PBS 1% BSA estéril. Este proceso fue repetido tres veces. El líquido de peritoneo se obtuvo por inyección y recuperación de 3 ml de PBS luego de desplazar el embolo de la jeringa hacia adelante y atrás tres veces. Para eliminar la contaminación por células rojas se utilizó buffer de lisis ACK durante tres minutos a temperatura ambiente. El recuento celular fue realizado en cámara de Neubauer.

III.XXIV ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS RECLUTADAS AL ESPACIO BRONQUIOALVEOLAR Y CAVIDAD PERITONEAL

Las células obtenidas como se describió anteriormente fueron teñidas con anticuerpos conjugados a fluorocromos a la dilución adecuada, durante 45 minutos a 4°C para análisis por citometría de flujo en el equipo FACSCalibur de Becton Dickinson. Los

anticuerpos utilizados fueron: CD11c (clon N418, hamster IgG, eBioscience), CD11b (clon M1/70.15, Rat IgG2b, CALTAG Laboratories), Ly6C (clon AL-21, Rat IgM,k BD Bioscience) y Ly6G (clon 1A8, Rat IgG2a BD Bioscience). Para cada caso fueron empleados los controles de isotipos correspondientes. Para cada muestra fueron adquiridos 10.000 eventos en la región de interés. El análisis de los resultados fue realizado con el software Flojow © (Tree Star, Inc.).

III.XXV ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA FLIC-BLS SOBRE UN CULTIVO ENRIQUECIDO EN CÉLULAS ADHERENTES DE BAZO

Se digirió el bazo de un ratón Balb/C en 6 ml de medio RPMI 1640 (Sigma) y se distribuyó la suspensión de células obtenida en una placa de cultivo de 48 pocillos (300 µl/fosa). Se incubó la placa 40' a 37°C y posteriormente se eliminaron las células no adheridas mediante 3 lavados con RPMI. Las células adheridas fueron estimuladas con 1 µg de FliC-BLS, 1 µg de FliC o 100 ng de LPS de *Escherichia coli* 0111: B4 (Sigma) con y sin polimixina B 10 µg/ml. Al cabo de 6 horas se midió la secreción de IL-6 al medio mediante ELISA de captura (BD OptEIA™ Murine IL-6 ELISA Kit).

III.XXVI ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los gráficos y el análisis estadístico fueron realizados con el programa GraphPad version 5.00 (San Diego, California, USA). Para el análisis estadístico se realizaron ANOVA de una o dos vías seguidas del test de Bonferroni o Tukey para la evaluación de diferencias de medias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Papagrigorakis, M. J., Yapijakis, C., Synodinos, P. N. & Baziotopoulou-Valavani, E. DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases* **10**, 206–14 (2006).
2. Shapiro, B., Rambaut, A. & Gilbert, M. T. P. No proof that typhoid caused the Plague of Athens (a reply to Papagrigorakis et al.). *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases* **10**, 334–5; author reply 335–6 (2006).
3. Papagrigorakis, M. J., Synodinos, P. N. & Yapijakis, C. Ancient typhoid epidemic reveals possible ancestral strain of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **7**, 126–7 (2007).
4. Morens, D. M., Folkers, G. K. & Fauci, A. S. Emerging infections: a perpetual challenge. *The Lancet infectious diseases* **8**, 710–9 (2008).
5. Haensch, S. et al. Distinct clones of *Yersinia pestis* caused the black death. *PLoS pathogens* **6**, e1001134 (2010).
6. Bos, K. I. et al. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature* **478**, 506–10 (2011).
7. Crosby, A. The Columbian Exchange: biological consequences of 1492. (1972).at <<http://indianmedicine.eldoc.ub.rug.nl/root/C/12075/>>
8. Rothschild, B. M. History of syphilis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **40**, 1454–63 (2005).
9. Armelagos, G. J., Zuckerman, M. K. & Harper, K. N. The science behind pre-Columbian evidence of syphilis in Europe: research by documentary. *Evolutionary anthropology* **21**, 50–7 (2012).
10. Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Krafft, A. E., Bijwaard, K. E. & Fanning, T. G. Initial genetic characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus. *Science (New York, N.Y.)* **275**, 1793–6 (1997).

11. Plotkin SA, Orenstein WA, editors. V. 3rd edition. P. S. 1999. A. from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7291>. No Title.
12. Deria, A. The Emergency campaign for smallpox eradication from Somalia (1977-1979)--revisited. *Vaccine* **29 Suppl 4**, D36–40 (2011).
13. Pasteur, L. De l'attenuation du virus du cholera des poules. *CR Acad. Sci. Paris* (1880).at <<http://scholar.google.com/scholar?hl=es&q=Pasteur+Louis&btnG=&lr=#9>>
14. Calmette, A., Guerin, C. & Breton, M. Contribution a l'etude de la tuberculose experimental du cobaye (infection et essais de vaccination par la voie digestive). *Ann. Inst. Pasteur Paris* (1907).at <http://scholar.google.com/scholar?q=Calmette+Guerin+Breton+tuberculose+experimental+du+cobaye&btnG=&hl=es&as_sdt=0#0>
15. SALK, J. E. *et al.* Formaldehyde treatment and safety testing of experimental poliomyelitis vaccines. *American journal of public health and the nation's health* **44**, 563–70 (1954).
16. SABIN, A. B., HENNESSEN, W. A. & WINSSER, J. Studies on variants of poliomyelitis virus. I. Experimental segregation and properties of avirulent variants of three immunologic types. *The Journal of experimental medicine* **99**, 551–76 (1954).
17. KATZ, S. L. *et al.* Studies on an attenuated measles-virus vaccine. VIII. General summary and evaluation of the results of vaccination. *American journal of diseases of children (1960)* **100**, 942–6 (1960).
18. Meyer, H. M. & Parkman, P. D. Rubella vaccination. A review of practical experience. *JAMA: the journal of the American Medical Association* **215**, 613–9 (1971).
19. Prinzie, A., Huygelen, C., Gold, J., Farquhar, J. & McKee, J. Experimental live attenuated rubella virus vaccine. Clinical evaluation of Cendehill strain. *American journal of diseases of children (1960)* **118**, 172–7 (1969).
20. Plotkin, S. A., Farquhar, J. D., Katz, M. & Buser, F. Attenuation of RA 27-3 rubella virus in WI-38 human diploid cells. *American journal of diseases of children (1960)* **118**, 178–85 (1969).

-
21. Hilleman, M. R., Buynak, E. B., Weibel, R. E. & Stokes, J. Live, attenuated mumps-virus vaccine. *The New England journal of medicine* **278**, 227–32 (1968).
22. Takahashi, M., Okuno, Y., Otsuka, T., Osame, J. & Takamizawa, A. Development of a live attenuated varicella vaccine. *Biken journal* **18**, 25–33 (1975).
23. Plotkin, S. a & Plotkin, S. L. The development of vaccines: how the past led to the future. *Nature reviews. Microbiology* **9**, 889–93 (2011).
24. Nathanson, N. & Langmuir, A. D. The Cutter incident. Poliomyelitis following formaldehyde-inactivated poliovirus vaccination in the United States during the Spring of 1955. II. Relationship of poliomyelitis to Cutter vaccine. 1963. *American journal of epidemiology* **142**, 109–40; discussion 107–8 (1995).
25. Wilson, G. The hazards of immunization. (1967).at <http://infekt.ch/updown/vortrag/inf06_streit.pdf>
26. Nabel, G. J. & Fauci, A. S. Induction of unnatural immunity: prospects for a broadly protective universal influenza vaccine. *Nature medicine* **16**, 1389–91 (2010).
27. Rappuoli, R. Reverse vaccinology. *Current opinion in microbiology* **3**, 445–50 (2000).
28. Mora, M., Veggi, D., Santini, L., Pizza, M. & Rappuoli, R. Reverse vaccinology. *Drug discovery today* **8**, 459–64 (2003).
29. Kelly, D. F. & Rappuoli, R. Reverse vaccinology and vaccines for serogroup B Neisseria meningitidis. *Advances in experimental medicine and biology* **568**, 217–23 (2005).
30. McAleer, W. J. *et al.* Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. 1984. *Biotechnology (Reading, Mass.)* **24**, 500–2 (1992).
31. Szmuness, W., Stevens, C. E., Zang, E. A., Harley, E. J. & Kellner, A. A controlled clinical trial of the efficacy of the hepatitis B vaccine (Heptavax B): a final report. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **1**, 377–85 (1981).
32. Fikrig, E., Barthold, S. W., Kantor, F. S. & Flavell, R. A. Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA.

-
- Science (New York, N.Y.)* **250**, 553–6 (1990).
33. Spaete, R. R. A recombinant subunit vaccine approach to HCMV vaccine development. *Transplantation proceedings* **23**, 90–6 (1991).
34. Pizza, M. *et al.* Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science (New York, N.Y.)* **246**, 497–500 (1989).
35. Roy, P. & Noad, R. Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Human vaccines* **4**, 5–12 (2008).
36. Rogers, L. J., Eva, L. J. & Luesley, D. M. Vaccines against cervical cancer. *Current opinion in oncology* **20**, 570–4 (2008).
37. Plotkin, S. A. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **47**, 401–9 (2008).
38. Pulendran, B. & Ahmed, R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nature immunology* **12**, 509–17 (2011).
39. Arvin, A. M. Humoral and cellular immunity to varicella-zoster virus: an overview. *The Journal of infectious diseases* **197 Suppl**, S58–60 (2008).
40. Levin, M. J. *et al.* Varicella-zoster virus-specific immune responses in elderly recipients of a herpes zoster vaccine. *The Journal of infectious diseases* **197**, 825–35 (2008).
41. McElhane, J. E. *et al.* T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **176**, 6333–9 (2006).
42. Pulendran, B. & Ahmed, R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**, 849–63 (2006).
43. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (New York, N.Y.)* **327**, 291–5 (2010).
44. Steinman, R. M. & Hemmi, H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Current topics in microbiology and immunology* **311**, 17–58 (2006).
45. Sansonetti, P. J. War and peace at mucosal surfaces. *Nature reviews. Immunology* **4**, 953–64 (2004).

-
46. Zepp, F. Principles of vaccine design- Lessons from nature. *Vaccine* **28 Suppl 3**, C14–24 (2010).
47. Burton, D. R., Poignard, P., Stanfield, R. L. & Wilson, I. A. Broadly neutralizing antibodies present new prospects to counter highly antigenically diverse viruses. *Science (New York, N.Y.)* **337**, 183–6 (2012).
48. Sullivan, N. J. *et al.* CD8+ cellular immunity mediates rAd5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. *Nature medicine* **17**, 1128–31 (2011).
49. Banatvala, J. E. & Van Damme, P. Hepatitis B vaccine -- do we need boosters? *Journal of viral hepatitis* **10**, 1–6 (2003).
50. Mills, K. H., Ryan, M., Ryan, E. & Mahon, B. P. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against Bordetella pertussis. *Infection and immunity* **66**, 594–602 (1998).
51. Garland, S. M. *et al.* Noninferiority of antibody response to human papillomavirus type 16 in subjects vaccinated with monovalent and quadrivalent L1 virus-like particle vaccines. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **14**, 792–5 (2007).
52. Petrovsky, N. The vaccine renaissance. *Human vaccines* **7**, 149–52 (2011).
53. McKee, A. S., Munks, M. W. & Marrack, P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity* **27**, 687–90 (2007).
54. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* **81**, 1–5 (2007).
55. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**, 197–216 (2002).
56. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications* **388**, 621–5 (2009).
57. Van Vliet, S. J., Den Dunnen, J., Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B. & Van Kooyk, Y. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Current opinion in immunology* **19**, 435–40 (2007).

-
58. Guy, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 505–17 (2007).
59. Kaliński, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A. & Kapsenberg, M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunology today* **20**, 561–7 (1999).
60. Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature reviews. Immunology* **8**, 337–48 (2008).
61. Happel, K. I. *et al.* Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of experimental medicine* **202**, 761–9 (2005).
62. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* **11**, 373–84 (2010).
63. Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. & Kirschning, C. J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of biological chemistry* **274**, 17406–9 (1999).
64. Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, N.Y.)* **282**, 2085–8 (1998).
65. Hoshino, K. *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **162**, 3749–52 (1999).
66. Takeda, K., Takeuchi, O. & Akira, S. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *Journal of endotoxin research* **8**, 459–63 (2002).
67. Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S. & Underhill, D. M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of experimental medicine* **197**, 1107–17 (2003).
68. Zhu, J., Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production

- of IFN-beta. *Blood* **109**, 619–25 (2007).
69. Kurt-Jones, E. A. *et al.* Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature immunology* **1**, 398–401 (2000).
70. Dessing, M. C., Hirst, R. A., De Vos, A. F. & Van der Poll, T. Role of Toll-like receptors 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice. *PloS one* **4**, e7993 (2009).
71. Berguer, P. M., Mundiñano, J., Piazzon, I. & Goldbaum, F. a A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **176**, 2366–72 (2006).
72. Sandri, S. *et al.* Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *Journal of leukocyte biology* **83**, 1174–80 (2008).
73. Vijay-Kumar, M. & Gewirtz, a T. Flagellin: key target of mucosal innate immunity. *Mucosal immunology* **2**, 197–205 (2009).
74. Yarovinsky, F. *et al.* TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science (New York, N.Y.)* **308**, 1626–9 (2005).
75. Kucera, K. *et al.* Structure-based analysis of *Toxoplasma gondii* profilin: a parasite-specific motif is required for recognition by Toll-like receptor 11. *Journal of molecular biology* **403**, 616–29 (2010).
76. Shi, Z. *et al.* Toll-like receptor 11 (TLR11) prevents *Salmonella* penetration into the murine Peyer patches. *The Journal of biological chemistry* **287**, 43417–23 (2012).
77. Andrade, W. A. *et al.* Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell host & microbe* **13**, 42–53 (2013).
78. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–8 (2001).
79. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 1529–31 (2004).

-
80. Mancuso, G. *et al.* Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nature immunology* **10**, 587–94 (2009).
81. Heil, F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 1526–9 (2004).
82. Jenner, R. G. & Young, R. A. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nature reviews. Microbiology* **3**, 281–94 (2005).
83. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637–50 (2011).
84. Kagan, J. C. & Medzhitov, R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* **125**, 943–55 (2006).
85. Kagan, J. C. *et al.* TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature immunology* **9**, 361–8 (2008).
86. Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S. & Miyake, K. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochemical and biophysical research communications* **368**, 94–9 (2008).
87. Gangloff, M. Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? *Trends in biochemical sciences* **37**, 92–8 (2012).
88. Choi, Y. J., Im, E., Chung, H. K., Pothoulakis, C. & Rhee, S. H. TRIF mediates Toll-like receptor 5-induced signaling in intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **285**, 37570–8 (2010).
89. Negishi, H. *et al.* Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 15136–41 (2006).
90. Bozza, S. *et al.* Thymosin alpha1 activates the TLR9/MyD88/IRF7-dependent murine cytomegalovirus sensing for induction of anti-viral responses in vivo. *International immunology* **19**, 1261–70 (2007).

-
91. Takaoka, A. *et al.* Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**, 243–9 (2005).
92. Akira, S. Innate immunity and adjuvants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **366**, 2748–55 (2011).
93. Park, B. *et al.* Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nature immunology* **9**, 1407–14 (2008).
94. Duthie, M. S., Windish, H. P., Fox, C. B. & Reed, S. G. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunological reviews* **239**, 178–96 (2011).
95. Qureshi, N., Takayama, K. & Ribí, E. Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *The Journal of biological chemistry* **257**, 11808–15 (1982).
96. Mata-Haro, V. *et al.* The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science (New York, N.Y.)* **316**, 1628–32 (2007).
97. Schiffman, M. & Wacholder, S. Success of HPV vaccination is now a matter of coverage. *The lancet oncology* **13**, 10–2 (2012).
98. Davey, G. M. *et al.* Cutting edge: priming of CD8 T cell immunity to herpes simplex virus type 1 requires cognate TLR3 expression in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**, 2243–6 (2010).
99. Jongbloed, S. L. *et al.* Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of experimental medicine* **207**, 1247–60 (2010).
100. Schulz, O. *et al.* Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* **433**, 887–92 (2005).
101. Weimer, E. T., Ervin, S. E., Wozniak, D. J. & Mizel, S. B. Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* **27**, 6762–9 (2009).

-
102. Huleatt, J. W. *et al.* Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine* **25**, 763–75 (2007).
103. Huleatt, J. W. *et al.* Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine* **26**, 201–14 (2008).
104. McDonald, W. F. *et al.* A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *The Journal of infectious diseases* **195**, 1607–17 (2007).
105. Bargieri, D. Y. *et al.* New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. *Vaccine* **26**, 6132–42 (2008).
106. Camacho, A. G. A. *et al.* TLR5-dependent immunogenicity of a recombinant fusion protein containing an immunodominant epitope of malarial circumsporozoite protein and the FliC flagellin of Salmonella Typhimurium. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **106 Suppl**, 167–71 (2011).
107. Cuadros, C. *et al.* Flagellin Fusion Proteins as Adjuvants or Vaccines Induce Specific Immune Responses. *Flagellin Fusion Proteins as Adjuvants or Vaccines Induce Specific Immune Responses*. (2004).doi:10.1128/IAI.72.5.2810
108. Bates, J. T., Graff, A. H., Phipps, J. P., Grayson, J. M. & Mizel, S. B. Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8+ T cell response independently of TLR5 and MyD88. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **186**, 6255–62 (2011).
109. Braga, C. J. M. *et al.* CD8+ T cell adjuvant effects of Salmonella FliCd flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. *Vaccine* **28**, 1373–82 (2010).
110. Núñez, G. & Gewirtz, A. T. robust activation of innate immunity. **39**, 359–371 (2009).
111. Nempont, C. & Cayet, D. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *The*

-
- Journal of ...* (2008).at
<<http://www.jimmunol.org/content/181/3/2036.short>>
112. Sciutto, E. *et al.* Brucella spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system. *Vaccine* **23**, 2784–90 (2005).
113. Laplagne, D. a *et al.* Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides. *Proteins* **57**, 820–8 (2004).
114. Cassataro, J. *et al.* A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine* **25**, 4437–46 (2007).
115. Sato, S. *et al.* Synergy and Cross-Tolerance Between Toll-Like Receptor (TLR) 2- and TLR4-Mediated Signaling Pathways. *J. Immunol.* **165**, 7096–7101 (2000).
116. Gao, J. J. *et al.* Cutting Edge: Bacterial DNA and LPS Act in Synergy in Inducing Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Macrophages. *J. Immunol.* **163**, 4095–4099 (1999).
117. Roelofs, M. F. *et al.* The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis and rheumatism* **52**, 2313–22 (2005).
118. Trinchieri, G. & Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature reviews. Immunology* **7**, 179–90 (2007).
119. Bagchi, A. *et al.* MyD88-Dependent and MyD88-Independent Pathways in Synergy, Priming, and Tolerance between TLR Agonists. *J. Immunol.* **178**, 1164–1171 (2007).
120. Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nature immunology* **6**, 769–76 (2005).
121. Vijay-Kumar, M., Carvalho, F. A., Aitken, J. D., Fifadara, N. H. & Gewirtz, A. T. TLR5 or NLRC4 is necessary and sufficient for promotion of humoral immunity by flagellin. *European journal of immunology* **40**, 3528–34 (2010).

-
122. Miao, E. A. *et al.* Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nature immunology* **7**, 569–75 (2006).
123. Miao, E. A., Andersen-Nissen, E., Warren, S. E. & Aderem, A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Seminars in immunopathology* **29**, 275–88 (2007).
124. Lightfield, K. L. *et al.* Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nature immunology* **9**, 1171–8 (2008).
125. Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. & Namba, K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**, 643–50 (2003).
126. Beatson, S. A., Minamino, T. & Pallen, M. J. Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends in microbiology* **14**, 151–5 (2006).
127. Kanto, S., Okino, H., Aizawa, S. & Yamaguchi, S. Amino acids responsible for flagellar shape are distributed in terminal regions of flagellin. *Journal of molecular biology* **219**, 471–80 (1991).
128. Murthy, K. G. K., Deb, A., Goonesekera, S., Szabó, C. & Salzman, A. L. Identification of conserved domains in Salmonella muenchen flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. *The Journal of biological chemistry* **279**, 5667–75 (2004).
129. Smith, K. D. *et al.* Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature immunology* **4**, 1247–53 (2003).
130. Andersen-Nissen, E. *et al.* Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9247–52 (2005).
131. Ramos, C. Cruz Ramos. **115**, (2004).
132. Ivičak-Kocjan, K., Panter, G., Benčina, M. & Jerala, R. Determination of the physiological 2:2 TLR5:flagellin activation stoichiometry revealed by the activity of a fusion receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **435**, 40–5 (2013).

-
133. Honko, A. N. & Mizel, S. B. Mucosal Administration of Flagellin Induces Innate Immunity in the Mouse Lung. *72*, 6676–6679 (2004).
134. McSorley, S. J., Ehst, B. D., Yu, Y. & Gewirtz, A. T. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **169**, 3914–9 (2002).
135. Lee, S. E. *et al.* A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infection and immunity* **74**, 694–702 (2006).
136. Honko, A. & Sriranganathan, N. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infection and ...* **74**, 1113–1120 (2006).
137. Rumbo, M., Nempont, C., Kraehenbuhl, J.-P. & Sirard, J.-C. Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS letters* **580**, 2976–84 (2006).
138. Burdelya, L. G. *et al.* An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science (New York, N.Y.)* **320**, 226–30 (2008).
139. Montie, T. C. & Stover, G. B. Isolation and characterization of flagellar preparations from *Pseudomonas* species. *Journal of clinical microbiology* **18**, 452–6 (1983).
140. Ibrahim, G. F., Fleet, G. H., Lyons, M. J. & Walker, R. a Method for the isolation of highly purified *Salmonella* flagellins. *Journal of clinical microbiology* **22**, 1040–4 (1985).
141. Kelly-Wintenberg, K., Anderson, T. & Montie, T. C. Phosphorylated tyrosine in the flagellum filament protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **172**, 5135–9 (1990).
142. Izadpanah, A., Dwinell, M. B., Eckmann, L., Varki, N. M. & Kagnoff, M. F. Regulated MIP-3{alpha}/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G710–719 (2001).
143. Sierro, F. *et al.* Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

-
- United States of America* **98**, 13722–7 (2001).
144. Rumbo, M., Sierro, F., Debard, N., Kraehenbuhl, J.-P. & Finke, D. Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterology* **127**, 213–23 (2004).
145. Lee, S. E. *et al.* A Bacterial Flagellin , *Vibrio vulnificus* FlaB , Has a Strong Mucosal Adjuvant Activity To Induce Protective Immunity. **74**, 694–702 (2006).
146. Asea, A. *et al.* HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature medicine* **6**, 435–42 (2000).
147. Chen, W., Syldath, U., Bellmann, K., Burkart, V. & Kolb, H. Human 60-kDa Heat-Shock Protein: A Danger Signal to the Innate Immune System. *J. Immunol.* **162**, 3212–3219 (1999).
148. Vabulas, R. M. *et al.* The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *The Journal of biological chemistry* **277**, 20847–53 (2002).
149. Gao, B. & Tsan, M.-F. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *The Journal of biological chemistry* **278**, 174–9 (2003).
150. Bausinger, H. *et al.* Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *European journal of immunology* **32**, 3708–13 (2002).
151. Gao, B. & Tsan, M.-F. Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages. *The Journal of biological chemistry* **278**, 22523–9 (2003).
152. Tsan, M.-F. & Gao, B. Cytokine function of heat shock proteins. *American journal of physiology. Cell physiology* **286**, C739–44 (2004).
153. Velickovic, T. C. *et al.* Low levels of endotoxin enhance allergen-stimulated proliferation and reduce the threshold for activation in human

- peripheral blood cells. *International archives of allergy and immunology* **146**, 1–10 (2008).
154. Petrasek, J., Csak, T. & Szabo, G. Toll-like receptors in liver disease. *Advances in clinical chemistry* **59**, 155–201 (2013).
155. Ortega-Cava, C. F. *et al.* Epithelial toll-like receptor 5 is constitutively localized in the mouse cecum and exhibits distinctive down-regulation during experimental colitis. *Clinical and vaccine immunology: CVI* **13**, 132–8 (2006).
156. Eaves-Pyles, T. *et al.* Flagellin, a Novel Mediator of Salmonella-Induced Epithelial Activation and Systemic Inflammation: $I\{\kappa\}B\{\alpha\}$ Degradation, Induction of Nitric Oxide Synthase, Induction of Proinflammatory Mediators, and Cardiovascular Dysfunction. *J. Immunol.* **166**, 1248–1260 (2001).
157. Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J. & Madara, J. L. Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *J. Immunol.* **167**, 1882–1885 (2001).
158. Strindelius, L., Filler, M. & Sjöholm, I. Mucosal immunization with purified flagellin from Salmonella induces systemic and mucosal immune responses in C3H/HeJ mice. *Vaccine* **22**, 3797–808 (2004).
159. Didierlaurent, A. *et al.* Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, 6922–30 (2004).
160. Cunningham, A. F. *et al.* Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on Salmonella are Th1. *European journal of immunology* **34**, 2986–95 (2004).
161. Yamagishi, T., Leite, J., Ueda, S., Yamaguchi, F. & Suwa, Y. Simultaneous removal of phenol and ammonia by an activated sludge process with cross-flow filtration. *Water research* **35**, 3089–96 (2001).
162. Fischer, R., Liao, Y. C. & Drossard, J. Affinity-purification of a TMV-specific recombinant full-size antibody from a transgenic tobacco suspension culture. *Journal of immunological methods* **226**, 1–10 (1999).

-
163. Pyke, A. T., Phillips, D. a, Chuan, T. F. & Smith, G. a Sucrose density gradient centrifugation and cross-flow filtration methods for the production of arbovirus antigens inactivated by binary ethylenimine. *BMC microbiology* **4**, 3 (2004).
164. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–7 (1975).
165. Malapaka, R. R. V, Adebayo, L. O. & Tripp, B. C. A deletion variant study of the functional role of the Salmonella flagellin hypervariable domain region in motility. *Journal of molecular biology* **365**, 1102–16 (2007).
166. Nelson, P. N. *et al.* Monoclonal antibodies. *Molecular pathology : MP* **53**, 111–7 (2000).
167. Hendriksen, R. S. *et al.* Global monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne pathogens and disease* **8**, 887–900 (2011).
168. Braden, B. C., Velikovsky, C. A., Cauerhff, A. A., Polikarpov, I. & Goldbaum, F. A. Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from *Brucella abortus*. *Journal of molecular biology* **297**, 1031–6 (2000).
169. Velikovsky, C. A. *et al.* A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infection and immunity* **70**, 2507–11 (2002).
170. Velikovsky, C. A. *et al.* *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infection and immunity* **71**, 5750–5 (2003).
171. Zylberman, V. *et al.* High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* sp. lumazine synthase. *The Journal of biological chemistry* **279**, 8093–101 (2004).
172. Bellido, D. *et al.* *Brucella* spp. lumazine synthase as a bovine rotavirus antigen delivery system. *Vaccine* **27**, 136–45 (2009).

-
173. Skountzou, I. *et al.* Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. *Vaccine* **28**, 4103–12 (2010).
174. Craig, P. O., Alzogaray, V. & Goldbaum, F. A. Polymeric Display of Proteins through High Affinity Leucine Zipper Peptide Adaptors. *Biomacromolecules* **13**, 1112–21 (2012).
175. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta* **1751**, 119–39 (2005).
176. Kofoed, E. M. & Vance, R. E. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* **477**, 592–5 (2011).
177. Yang, J. *et al.* Antigen replacement of domains D2 and D3 in flagellin promotes mucosal IgA production and attenuates flagellin-induced inflammatory response after intranasal immunization. *Human vaccines & immunotherapeutics* **9**, 1–9 (2013).
178. Wang, B.-Z. *et al.* Intranasal immunization with influenza VLPs incorporating membrane-anchored flagellin induces strong heterosubtypic protection. *PloS one* **5**, e13972 (2010).
179. Girard, A., Saron, W., Bergeron-Sandoval, L.-P., Sarhan, F. & Archambault, D. Flagellin produced in plants is a potent adjuvant for oral immunization. *Vaccine* **29**, 6695–703 (2011).
180. Blander, J. M. & Medzhitov, R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* **440**, 808–12 (2006).
181. Blander, J. M. & Medzhitov, R. On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nature immunology* **7**, 1029–35 (2006).
182. Letran, S. E. *et al.* TLR5 functions as an endocytic receptor to enhance flagellin-specific adaptive immunity. *European journal of immunology* **41**, 29–38 (2011).
183. Eaves-Pyles, T. *et al.* Luminal-applied flagellin is internalized by polarized intestinal epithelial cells and elicits immune responses via the TLR5 dependent mechanism. *PloS one* **6**, e24869 (2011).

-
184. Bates, J. T., Uematsu, S., Akira, S. & Mizel, S. B. Direct stimulation of tlr5+/+ CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 7539–47 (2009).
185. Alvarez, P. *et al.* Tandem repeats of the extracellular domain of Matrix 2 influenza protein exposed in Brucella lumazine synthase decameric carrier molecule induce protection in mice. *Vaccine* **31**, 806–12 (2013).
186. He, B. *et al.* Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* **26**, 812–26 (2007).
187. Litinskiy, M. B. *et al.* DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nature immunology* **3**, 822–9 (2002).
188. Xu, W. *et al.* Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nature immunology* **8**, 294–303 (2007).
189. Xu, W. *et al.* Activating Upper Respiratory Mucosa B Cells through an Innate TLR3 Pathway Involving BAFF 1. (2008).
190. Pasare, C. & Medzhitov, R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* **438**, 364–8 (2005).
191. Mizel, S. & Bates, J. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *The Journal of Immunology* (2010).doi:10.4049/jimmunol.1002156
192. Browne, E. P. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology* **136**, 370–9 (2012).
193. Flores-Langarica, A. *et al.* Systemic flagellin immunization stimulates mucosal CD103+ dendritic cells and drives Foxp3+ regulatory T cell and IgA responses in the mesenteric lymph node. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **189**, 5745–54 (2012).
194. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5 (1970).
195. Anderle, P. *et al.* Changes in the transcriptional profile of transporters in the intestine along the anterior-

posterior and crypt-villus axes. *BMC genomics* **6**, 69 (2005).