

Universidad Nacional de San Martín

Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN, UNSAM)

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán"

Desarrollo de una herramienta analítica basada en Espectrometría de Masas aplicable a la producción de antígenos recombinantes de STEC

Tesis presentada para obtener el título de
Magister en Microbiología Molecular

Autora: Lic. Lucía Ávila

Director: Dr. Matías Fingeremann

Lugar de trabajo: Laboratorio I+D+i, Instituto Nacional de Producción de
Biológicos (INPB) ANLIS, "Dr. Carlos G. Malbrán"

Ciudad Autónoma de Buenos Aires - 2024

A Pablo, Salvador y Mercedes

Agradecimientos

A la ANLIS – Malbrán, por fomentar la formación de los profesionales de salud y darme la oportunidad de realizar esta Maestría.

Al INPB y al Dr. Christian Dokmetjian, que me dieron el espacio y el tiempo necesario para realizar las cursadas y los ensayos pertinentes al trabajo de tesis.

Al Dr. Matías Fingeremann, director y amigo, por haber sido mi guía no sólo durante esta tesis sino durante todos los años de trabajo que compartimos en el Malbrán, por enseñarme tanto, por confiar en mí, por hacerme pensar y razonar, por valorar mis decisiones, por ponerse a la par pero también ponerse en su merecido lugar de director y jefe, por ser desinteresado y empático, por compartir charlas eternas de ciencia pero sobre todo también de vida. Gracias por siempre, Mati querido!!!!!!

Al Dr. Osvaldo Cascone, por acompañar al grupo de I+D+i durante tantos años y siempre tener la palabra justa, por ser tan brillante y tan sencillo a la vez, por siempre estar dispuesto a ayudar y dar un consejo u opinión.

A mis compañeros del laboratorio de I+D+i del INPB, que siempre fue tan dinámico, pero a algunos quiero mencionar por haber marcado mi vida de alguna manera: Belén De Marco, Pato, Bea, Julia, Belén Gonzalez, José Luis y Carolina Guilleron. Quiero hacer una mención especial a Nico, con quien compartí mi último año de trabajo, pero con quien disfruté de trabajar, sobre todo de charlar y reirme, y desinteresadamente me ayudó con todos los ensayos de MS y terminó muchos de ellos cuando inicié mi nuevo trabajo. Gracias eternas, Nico!!!!!!

A los organizadores de la Maestría en Microbiología Molecular, docentes, directores y secretarios.

A mis compañeros de Maestría, de lo mejor que me llevo para siempre: Gachi, Andre, Noe, Carmencita, Vivi, Marce/Tío, Diego, Fabri, Coki, Juanma, Octavio, Jime y todos los de la mejor cohorte!

A mi familia, mi Papá y Mamá, por darme la oportunidad de estudiar y motivarme siempre a ser mejor profesional y persona.

A mi compañero y sostén, Pablo, y a lo más importante de mi vida, mis hijos Salvador y Mercedes.

iiiiGracias!!!!

INDICE

Introducción general	7
<i>Escherichia coli</i>	7
<i>Escherichia coli</i> productora de Toxina Shiga	8
El SUH y su situación epidemiológica en Argentina	12
Prevención de STEC.....	14
Parte 1	17
Expresión recombinante de antígenos STEC.....	17
Introducción	17
1.1- Toxina Shiga.....	17
1.2- EspA (<i>E. coli</i> secreted protein A)	19
1.3- Intimina	22
Objetivos	24
2- Materiales y métodos	24
3- Resultados y discusión	27
3.1- Optimización de la expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	27
Stx2B.....	27
EspA.....	30
Intimina	33
3.2- Generación de sueros policlonales para su uso en el desarrollo de técnicas analíticas y/o diagnósticas.....	36
Desarrollo de anticuerpos policlonales contra rStx2B	37
Desarrollo de anticuerpos policlonales contra rEspA	38
Evaluación de anticuerpos policlonales contra rInt	40
4- Conclusiones	41
Parte 2	42
Desarrollo de herramientas analíticas basadas en Espectrometría de Masas	42
Introducción	42
1.1- Espectrometría de masas como una herramienta para el control de calidad	42
1.2- LC-MSMS.	43
1.3- MRM y cuantificación de péptidos y proteínas.....	47
Objetivos	50
2- Materiales y métodos	51
3- Resultados y discusión	56

3.1- Versión recombinante de la subunidad B de la Toxina Shiga 2 (rStx2B)	56
3.2- Versión recombinante de la Proteína Secretada A de <i>Escherichia coli</i> (rEspA)	63
4- Conclusiones	69
Conclusiones generales	70

Resumen

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de Toxina Shiga (STEC) son patógenos de transmisión alimentaria con un alto carácter zoonótico. Éstas representan un grave problema para la Salud Pública siendo las principales responsables de la enfermedad conocida como Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), endémica en Argentina.

Las bases moleculares del mecanismo de infección son complejas, interviniendo varios factores de virulencia. Las proteínas codificadas por el Locus de Desprendimiento de Enterocitos (LEE) han sido ensayadas como componentes de formulaciones vacunales contra la portación de cepas STEC en ganado bovino. Este *locus* incluye a las proteínas EspA y EspB, y al receptor de traslocación para la Intimina (Tir), los cuales son secretados a través de un sistema de secreción de tipo III (TTSS), y la adhesina Intimina.

En este trabajo de tesis se desarrolló una herramienta para el análisis de la expresión de proteínas recombinantes, aplicable a otras de interés. Esta herramienta es útil para la evaluar la composición antigénica de formulaciones vacunales y para el control de calidad de los procesos productivos de las mismas, entre otros.

Se trabajó con tres factores de virulencia recombinantes: EspA, Intimina y la subunidad B de la toxina Shiga 2 (Stx2B). Esta última, tiene un rol en la colonización del ganado bovino y es responsable de la patogenicidad en humanos.

En la primera parte de este trabajo se optimizaron las condiciones de expresión y purificación de las mencionadas proteínas recombinantes y se generaron sueros policlonales en conejos y ratones dirigidos a un reconocimiento específico de las mismas.

En función de las limitaciones observadas durante la primera parte, en la segunda parte, se abordó una estrategia diferente mediante el desarrollo de una herramienta analítica basada en cromatografía líquida (LC) acoplada a Espectrometría de Masas (MS).

Se optimizaron las condiciones de separación por LC y, dentro de las técnicas basadas en MS, se trabajó en la cuantificación de proteínas en su estructura completa a través del monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Se realizó una optimización automatizada de todas las variables ensayadas a través del software Labsolutions provisto por el equipo Shimadzu LC-MS 8030. A partir de estas condiciones optimizadas se efectuó una curva de calibración sobre muestras conteniendo cantidades conocidas de proteínas de interés, contrastando intensidad de señal en los MRM vs concentración de proteína en la muestra.

Este trabajo aporta una metodología de detección/cuantificación que es aplicable para muestras más complejas y como herramienta de control en un laboratorio de referencia a nivel nacional como es el de I+D+i dentro del Instituto Nacional de Producción de Biológicos de la ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Palabras clave: SUH, proteína recombinante, Espectrometría de Masas, cuantificación.

Abstract

Shiga Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) strains are highly zoonotic foodborne pathogens. These represent a serious problem for public health, being the main responsible for the disease known as Hemolytic Uremic Syndrome (HUS), endemic in Argentina.

The molecular bases of the infection mechanism are complex, involving several virulence factors. The proteins encoded by the Locus of Enterocytes Effacement (LEE) have been tested as components of vaccine formulations against carriage of STEC in cattle. This locus includes EspA and EspB, and the translocation receptor for Intimin (Tir), which are secreted through a type III secretion system (TTSS), and the adhesin Intimin.

In this thesis work, a tool was developed for the analysis of the expression of recombinant proteins, applicable to others of interest. This tool is useful for evaluating the antigenic composition of vaccine formulations and for quality control of their production processes, among others.

We worked with three recombinant virulence factors: EspA, Intimin and the B subunit of the Shiga Toxin 2 (Stx2B). This protein plays a main role in the colonization of cattle and is responsible for pathogenicity in humans.

In the first part of this work, the expression and purification conditions of the recombinant proteins were optimized, and polyclonal sera in rabbit and mice were generated aimed at their specific recognition.

During the development of the first part of this project, some limitations were evident. As a result, the second part addressed with a different strategy where we developed an analytical tool based on liquid chromatography (LC) coupled to Mass Spectrometry (MS).

LC separation conditions were optimized and, within MS-based techniques, we worked on the quantification of proteins in their complete structure using multiple reaction monitoring (MRM). An automated optimization of all the variables tested was carried out through the Labsolutions software provided by the Shimadzu LC-MS 8030 equipment. From these optimized conditions, a calibration curve was carried out on samples containing known quantities of proteins of interest, contrasting the signal intensity in the MRMs with the protein concentration in the sample. This work provides a detection/quantification methodology that is applicable for more complex samples and as a control tool in a national reference laboratory such as the R&D&i within the National Institute of Biological Production of the ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Keywords: HUS, recombinant protein, mass spectrometry, quantification.

Introducción general

Escherichia coli

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria miembro de las enterobacterias. Su principal reservorio ecológico es la microbiota del tracto intestinal humano, esencial para el correcto funcionamiento del proceso digestivo, y de la mayoría de los animales homeotermos. Es un bacilo Gram negativo, oxidasa negativa, catalasa positiva, anaerobio facultativo, cuya temperatura de crecimiento es preferentemente a 37°C (mesófilo), fimbriado y comúnmente móvil por flagelos peritricos.

E. coli es un microorganismo modelo utilizado ampliamente en el laboratorio por su velocidad de crecimiento, sus pocos requerimientos nutricionales y a su amplio conocimiento bibliográfico. Además, esta bacteria se utiliza en experimentos de genética y biología molecular dado a que la estructura de su genoma es altamente flexible, permitiendo la movilidad de material genético por medio de trasposones, secuencias de inserción, bacteriófagos y plásmidos (Croxen et al., 2013). Fue descrita por primera vez en 1885 por el bacteriólogo alemán Theodore von Escherich, quien la denominó *Bacterium coli commune*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli* en honor a su descubridor.

La clasificación serológica de las cepas de *E. coli* se realizaba comúnmente mediante la identificación serológica según el esquema de Kauffman, basada en el uso de anticuerpos, que determinan las variaciones naturales en la composición de los antígenos somático “O” determinado por el lipopolisacárido (LPS), el flagelar “H” determinado por la proteína fliC del flagelo, y capsular “K” determinado por la envoltura y la cápsula de la bacteria. Se han reconocido alrededor de ciento ochenta y seis tipos diferentes de antígeno O y cincuenta y tres antígenos H, sin embargo, sólo un pequeño grupo de combinaciones O:H se asocian con cepas patógenas. Los antígenos O definen un serogupo, y una combinación específica de antígenos O y H definen el serotipo de un aislamiento.

Los patotipos asociados a infecciones gastrointestinales se clasifican según sus manifestaciones clínicas, patogenicidad, y características epidemiológicas en:

- *E. coli* enteropatógeno (EPEC, por sus siglas en inglés *enteropathogenic E. coli*).
- *E. coli* enterotoxigénico (ETEC, por sus siglas en inglés *enterotoxigenic E. coli*).
- *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC, por sus siglas en inglés *Shiga toxin producing E. coli*).
- *E. coli* enteroinvasivo (EIEC, por sus siglas en inglés *enteroinvasive E. coli*).
- *E. coli* enteroagregativo (EAEC, por sus siglas en inglés *enteroaggregative E. coli*).
- *E. coli* de adherencia difusa (DAEC, por sus siglas en inglés *diffuse-adherent E. coli*).

En este trabajo se trata principalmente el serotipo STEC O157:H7.

Escherichia coli productora de Toxina Shiga

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC), son patógenos de transmisión alimentaria con un alto carácter zoonótico. Seguido a la ingestión de comida o agua contaminada, la bacteria muestra una maquinaria molecular sofisticada que consiste en una estrategia dual: la colonización del intestino y la producción de toxina Shiga. Las STEC representan un grave problema para la Salud Pública, provocando brotes ocasionales, siendo las principales responsables de la enfermedad conocida como Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Estudios recientes para entender los mecanismos del SUH resaltan el rol de la vía del complemento en el daño endotelial y continúa el estudio para descifrar el tráfico intracelular de la toxina Shiga (Joseph et al., 2020). En Argentina, el SUH es endémico y constituye la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños menores de 5 años (Minsal, 2021). Dado que el principal reservorio de STEC es el ganado bovino, las principales estrategias preventivas de la enfermedad procuran disminuir el riesgo de infección a partir de éste. Aproximadamente el 52% de los brotes de SUH se han asociado a productos de origen bovino. La contaminación de las carcasas con STEC ocurre cuando el contenido intestinal o la materia fecal hacen contacto con la superficie de la carne; asimismo la contaminación cruzada puede generarse entre carcasas durante el faenado (Brusa et al., 2013). Así, una de las intervenciones con mayor

potencial es la vacunación del ganado bovino a fin de limitar el carácter portador de cepas STEC. La capacidad patogénica de STEC en humanos está asociada estrechamente con la expresión y tipo de toxina Shiga (Stx1 y Stx2) (Ibarra et al., 2008). Sin embargo, si bien posee un rol inmunosupresivo que estaría vinculado con la reinfección, la Stx no es el principal factor de colonización de sus hospedadores. Las bases moleculares del mecanismo de infección son complejas, interviniendo varios grupos diferentes de proteínas microbianas. Dentro de ellas, las proteínas codificadas en la isla de patogenicidad de *E. coli* (de 34 kb, identificada por primera vez en la cepa EPEC O127:H6 E2348/69 (Stevens & Frankel, 2014), el *Locus* de Desprendimiento de Enterocitos (LEE por sus siglas en inglés), han mostrado un rol crítico en la adhesión de la bacteria a las células del folículo asociado al epitelio. El LEE incluye a las proteínas de secreción EspA y EspB, y el receptor de translocación para la Intimina (Tir), los cuales son secretados a través del sistema de secreción de tipo III (T3SS), y la adhesina Intimina (gen *eae*), una proteína de membrana externa que permite la íntima adherencia con las células del epitelio intestinal del huésped. Existen cepas STEC LEE-negativas capaces de causar enfermedad severa, por lo tanto, resulta adecuada la utilización de un término más general, como STEC, para referirse a todas las cepas de *E. coli* capaces de producir Stx (Farfan & Torres, 2012).

La adherencia a células epiteliales intestinales es una de las características de la infección por STEC. El patrón de adherencia e interacción con células epiteliales es notablemente diferente entre las cepas STEC LEE-positivas y LEE-negativas. En las cepas LEE-positivas, la adherencia inicial es mediada por la fimbria polar larga (Lpf, por sus siglas en inglés *Long polar fimbriae*), seguida por la producción de una histopatología característica denominada lesión A/E (por sus siglas en inglés *attaching and effacing*), que involucra cambios estructurales en las células epiteliales y adherencia íntima de la bacteria al enterocito. Los cambios estructurales incluyen el barrido de las microvellosidades y la formación de pedestales, debido a la acumulación de filamentos de actina debajo de la membrana apical del enterocito (Fig. 1a y 1b). Los genes bacterianos requeridos para formar la lesión A/E están en la isla de patogenicidad LEE, y se conservan en cepas EPEC y STEC capaces de inducir este tipo de lesión. La adherencia de las cepas LEE-negativas no se ha investigado ampliamente y solo se realizaron trabajos puntuales para ciertos

serotipos de STEC en los que no se observa la típica lesión A/E producida por las cepas LEE-positivas. La producción de Stx ocurre en el tracto intestinal y la translocación a través del lumen intestinal hacia el torrente sanguíneo resulta en su distribución hacia los órganos *target*, como los riñones (Fig. 2a).

Las cepas STEC O157 y no-O157 también pueden adherirse y colonizar otras superficies, como el epitelio bovino o vegetales, como la lechuga. Varias adhesinas, como HCP, ECP y flagelo, han sido asociadas con la persistencia en el intestino bovino y en la formación de *biofilms* (Fig. 2b).

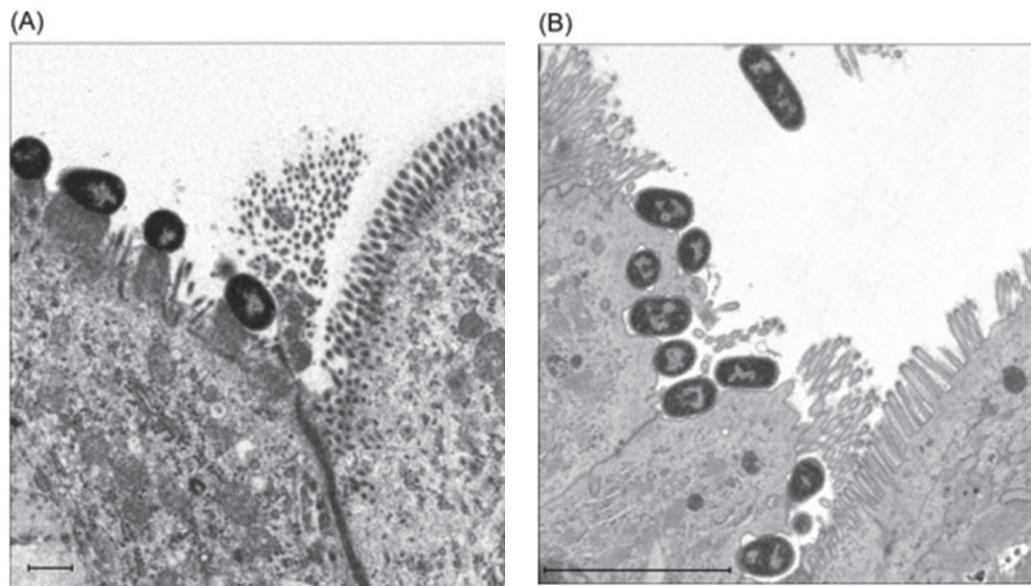


Figura 1. (A) Microscopía de transmisión electrónica (TEM por sus siglas *Transmission electron micrograph*) que muestra la lesión A/E inducida por la cepa EHEC O111:H- E45035N en el colon de un ternero neonato (notar la densidad de los pedestales elevados y el borramiento de las microvellosidades relativo a los enterocitos próximos sin infectar). Barra de escalado = 1 μm . (B) TEM de la lesión A/E inducida por la cepa EHEC O157:H7, 12 h luego de la inoculación del asa intestinal bovina (notar la íntima adherencia, pero ausencia relativa de los pedestales elongados)- Barra de escalado = 5 μm (Stevens et al., 2013).

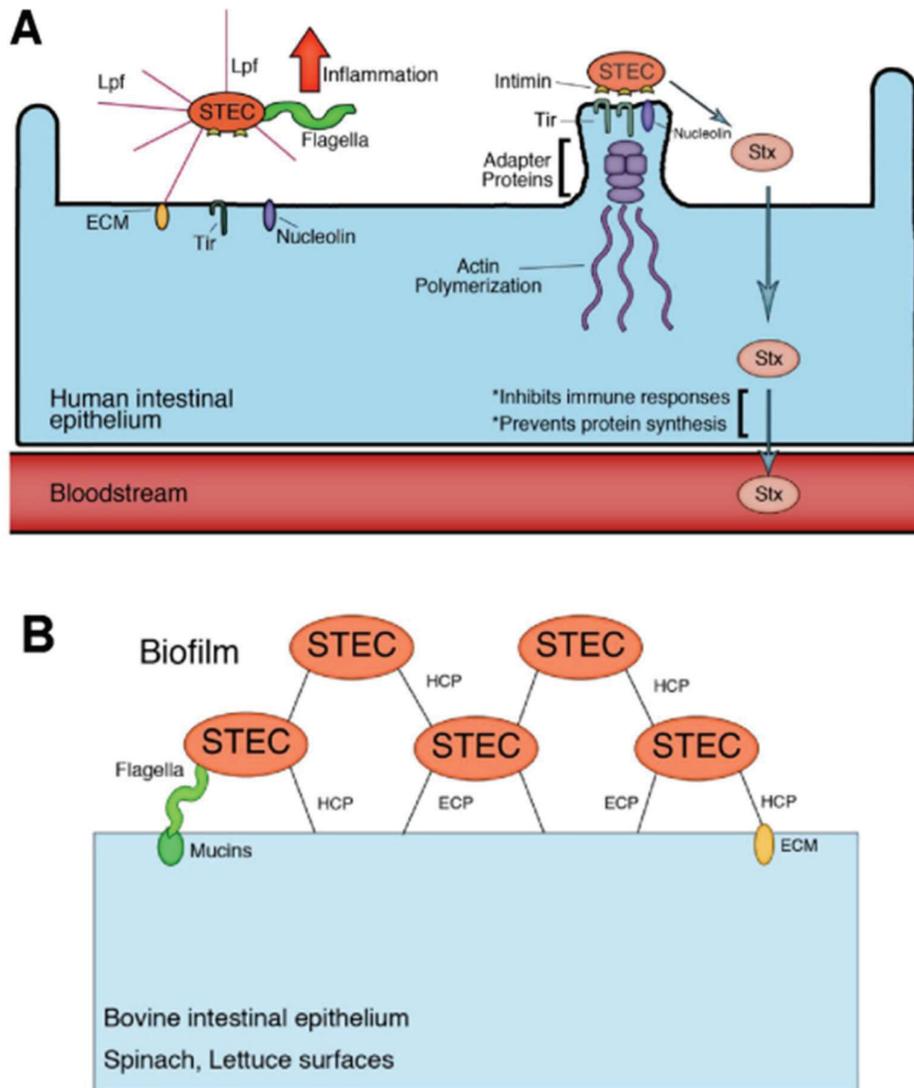


Figura 2. Modelo de colonización para las STEC que infectan a humanos y persisten en rumiantes. (A) El diagrama muestra una célula epitelial intestinal humana en las primeras etapas de colonización por STEC. Las cepas STEC O157 o no O157 interactúan con el intestino a través de las fimbrias Lpf; esto es seguido por la formación de lesiones de A/E. La producción de Stx ocurre en el tracto intestinal y luego la translocación a través de la luz intestinal hasta el torrente sanguíneo donde se distribuye y afecta órganos, como los riñones. (B) Las cepas STEC O157 y no O157 también son capaces de adherirse y colonizar otras superficies, como el epitelio intestinal bovino y las superficies de diferentes vegetales. Varias adhesinas, como HCP, ECP y flagelos, se han asociado con la persistencia en el intestino del ganado bovino y la formación de *biofilms* (Farfan & Torres, 2012).

Las toxinas Stx son consideradas el principal factor de virulencia de STEC, pero no las únicas responsables de la patogenicidad bacteriana completa. Tal es así, que se describieron factores de virulencia adicionales, incluyendo adhesinas, proteasas,

sistemas de captura de hierro, LPS, flagelos y otras toxinas, que podrían contribuir en la patogénesis de estas (Biscola et al., 2011).

Por su reconocido rol en la infección, las proteínas codificadas por el locus LEE han sido ensayadas como componentes de formulaciones vacunales contra la portación de cepas STEC en ganado bovino (Kudva et al., 2012). De hecho, una de las únicas dos formulaciones vacunales comercializadas para tales efectos se basa en los anteriores inmunógenos (S. E. Allen et al., 2011).

El SUH y su situación epidemiológica en Argentina

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad de comienzo agudo con anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia (bajo recuento de plaquetas) y daño renal que se presenta generalmente a continuación de un episodio de diarrea con o sin sangre, principalmente en lactantes y niños en la primera infancia (Fernandez-Brando et al., 2011). Puede presentarse con fiebre, vómitos, dolor abdominal y anuria u oliguria. Además, puede afectar otros órganos como sistema nervioso central, pulmones, páncreas y corazón (Biscola et al., 2011), y puede llevar a la muerte debido a complicaciones neurológicas, intestinales, cardíacas o a infecciones intercurrentes (Repetto, 2005). El período de incubación es de dos a diez días, con una media de tres a cuatro días, y el de transmisibilidad hasta tres semanas en los niños y de una semana o menos en los adultos, después del comienzo de la diarrea.

En Argentina, el agente etiológico más comúnmente asociado al SUH es un patógeno zoonótico transmitido por los alimentos y el agua: la bacteria *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC), cuyo serotipo más frecuente es O157:H7, aunque hay más de 100 serotipos que poseen un potencial patogénico similar. Argentina presenta la mayor tasa de incidencia a nivel mundial de SUH en niños menores a 5 años, constituyendo un problema crítico para la salud pública. El SUH es la principal causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica, siendo además responsable del 20% de los trasplantes de riñón en niños y adolescentes en Argentina. En la última década, se reportaron anualmente entre 300 a 400 casos nuevos. La

incidencia de casos es de aproximadamente 0,8 casos/100.000 habitantes y 7,29 casos/100.000 niños menores de 5 años. La letalidad es del 1 al 5%. El SUH no sólo se observa en niños, sino también en adolescentes y en personas ancianas. Se considera como factor desencadenante de enfermedad por STEC la falta de inmunidad en los niños y la disminución o pérdida de esta en las personas adultas. Si bien la infección por STEC puede afectar a niños de ambos sexos, se demostró que las niñas son más propensas a enfermar que los niños (Rowe et al., 1991). La infección por STEC muestra una variación estacional, con aumento de casos en primavera y verano, épocas que coinciden con el período en que aumenta la portación de STEC en el ganado bovino (Miliwebsky E, 2019).

La relevancia de la situación epidemiológica en nuestro país ha llevado a la implementación de distintas políticas y marcos regulatorios para combatir la transmisión de esta enfermedad. Éstos incluyen reglamentaciones relativas al ganado en pie, a la faena, y finalmente al procesamiento y expedición de productos derivados de carne vacuna, por parte del SENASA, el INAL y la CONAL (Ibarra et al., 2008). Más aún se encuentran publicados los datos provenientes de las tres estrategias formales de vigilancia del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS) existentes actualmente: módulo de Vigilancia Clínica (C2), módulo de Vigilancia por Laboratorios (SIVILA) y módulo de Unidades Centinela (UC-SUH) (Antman, n.d.). Además, se aportan datos de la vigilancia molecular, a través de la red PulseNet. Para conocer el estado actual de SUH en Argentina existe el acceso público a los Boletines Integrados de Vigilancia disponibles en: <http://www.msal.gov.ar/index.php/home/boletin-integrado-de-vigilancia> (Miliwebsky E, 2019).

No se recomienda el empleo de antibióticos para el tratamiento de la infección puesto que estos inducen un incremento en la producción de Toxina Shiga, agravando el cuadro. Así, la única terapia disponible hoy se basa principalmente en dar apoyo con hidratación y diálisis si fuera necesario. Hace pocos años se han desarrollado y evaluado, en modelos animales e *in vitro*, una variedad de tratamientos alternativos como anticuerpos monoclonales o antisueros dirigidos a la toxina Shiga, análogos de receptores de toxina y estrategias de vacunación. Unas pocas de dichas estrategias han progresado hacia la fase clínica (Mühlen & Dersch, 2020). Sin embargo, al día de la fecha no existen medidas

protectoras o terapias para las infecciones por STEC en humanos (Hiriart et al., 2024). En distintos países, entre los que se incluye a Argentina, se realizaron numerosos estudios sobre la prevalencia de STEC que permitieron confirmar el rol del ganado vacuno como principal reservorio (Chinen et al., 2003) (Masana et al., 2010; Parma et al., 2000). La principal vía de transmisión de STEC O157 y no-O157 son los alimentos contaminados como, por ejemplo, carne picada, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros (Svendson et al., 2023). Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales, la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral, y la contaminación fecal de aguas de recreación o aguas de pozo. Diversos trabajos han descrito que la excreción de STEC O157 en humanos es prolongada e intermitente (Swerdlow & Griffin, 1997). En niños pequeños, a diferencia de lo que ocurre en niños mayores y adultos, el tiempo de excreción de O157 supera ampliamente el tiempo de resolución de los síntomas. Toda persona con infección por STEC, sintomática o asintomática, no deberá obtener el alta médica hasta no tener dos coprocultivos negativos sucesivos con intervalos de 48 h entre ellos. Es importante destacar que la dosis infectiva de este grupo bacteriano para ocasionar enfermedad es de 10 a 100 bacterias por gramo de alimento.

Prevención de STEC

Las infecciones en humanos suelen estar asociadas al consumo de carne poco cocida ó preparada en condiciones bromatológicas deficientes. Dado que el ganado vacuno se encuentra colonizado o con infecciones subclínicas por serotipos diferentes de STEC, se considera uno de los más importantes reservorios del patógeno y, por ende, fuente de zoonosis. La contaminación de carcazas durante el faenado representa un punto de riesgo elevado, siendo habitualmente el primer paso en la posterior transmisión de las cepas STEC al humano. Varios estudios han propuesto que la vacunación del ganado doméstico es una de las estrategias con mayor potencial de éxito para reducir la

incidencia del SUH en humanos (D. R. Smith, 2014; Snedeker et al., 2012; Walle et al., 2013). Se han ensayado varios tipos de formulaciones vacunales, tanto en ganado en pie como en modelos murinos de colonización, las cuales pueden agruparse en las siguientes categorías:

- Factores de virulencia expresados en forma recombinante, tales como EspB, EspA, Tir, Intimina (fragmentos C280 y C531), Toxina tipo Shiga y Flagelina (Dean-Nystrom et al., 2002; Dziva et al., 2007; McNeilly et al., 2010, 2015).
- Sobrenadantes de cultivo enriquecidos en proteínas excretadas por TTSS (K. J. Allen et al., 2011; Potter et al., 2004).
- Componentes o subunidades extraídos directamente de cepas STEC, tales como “fantasmas” bacterianos, porinas, sideróforos y Vesículas de Membrana Externa (OMV) (Cull et al., 2012; Fingerhann et al., 2018; Vilte et al., 2012).
- Expresión heteróloga de los factores de virulencia en bacterias atenuadas (Khare et al., 2010).

Los trabajos anteriores permiten concluir que para alcanzar una protección efectiva contra la colonización es necesario el empleo de formulaciones multiantigénicas. Más aún, algunos de estos estudios han observado que una adecuada relación en la proporción de cada uno de los antígenos en las formulaciones permite mejorar los resultados (McNeilly et al., 2015). Hasta este momento solamente han sido comercializadas dos formulaciones vacunales: Econiche® (Vetòquinol) y Epitopix® (Pfizer). La primera de esas se basa en proteínas obtenidas a partir de sobrenadantes de cultivo de cepas STEC y la segunda a partir de la biomasa de cultivos de las cepas mencionadas.

En nuestro grupo, en colaboración con el Instituto Finlay de la República de Cuba, hemos trabajado en el desarrollo de una formulación vacunal para disminuir la portación en el ganado bovino de cepas responsables del SUH, en una estrategia alternativa a las anteriores. Esta se basa en una tecnología desarrollada en el Instituto Finlay, basada en vesículas de membrana externa (OMV) obtenidas a partir de cepas STEC. Las OMV contienen en su estructura Proteínas, Lipopolisacáridos (LPS) y fosfolípidos purificados a

partir de la superficie celular, mediante una metodología estandarizada, con un bajo costo de producción. Dadas sus características intrínsecas se trata de materiales nanoparticulados, multiantigénicos e inmunogénicos, que permiten además incorporar cantidades controladas de antígenos externos (por ejemplo, antígenos recombinantes) durante su proceso de producción (Fingermann et al., 2018; O. Pérez et al., 2004).

Sus propiedades inmunológicas han sido ampliamente estudiadas, demostrando una habilidad para inducir una respuesta de tipo Th1, mostrando una alta capacidad inmunopotenciadora e inmuno-moduladora, lo cual los vuelve interesantes candidatos vacunales y/o adyuvantes (J. L. Pérez et al., 2007). Su uso con proteínas recombinantes permite alcanzar respuestas inmunes protectoras más robustas, durante períodos más largos que el uso de proteínas recombinantes solas (Cecil et al., 2019). Por otra parte, el proceso desarrollado de extracción de OMV por el Instituto Finlay permite obtener partículas con cantidades controladas de lipopolisacárido de membrana (LPS), un potente estimulador de respuesta inmune, pero con capacidad de desarrollar respuestas adversas cuando está presente por encima de ciertos límites. El uso de detergentes en el proceso de extracción mencionado limita así la toxicidad de las vesículas al controlar el contenido en estas de LPS, permitiendo obtener así partículas con excelentes propiedades adyuvantes y baja toxicidad.

En el presente trabajo de Tesis hemos trabajado con tres factores de virulencia relevantes para el desarrollo de la colonización de cepas STEC en ganado bovino y para el posterior desarrollo de la enfermedad en humanos: la subunidad B de la Toxina Shiga 2, EspA y la región variable C-terminal de Intimina. En la Parte 1 explicamos cómo llegamos a obtenerlas de manera recombinante y pura, para luego utilizarlas en la generación de sueros y en el análisis por Espectrometría de Masas, en la Parte 2.

Parte 1

Expresión recombinante de antígenos STEC

Introducción

1.1- Toxina Shiga

Los miembros de la familia Stx poseen una estructura conservada de subunidades AB₅, codificadas por bacteriófagos insertos en el cromosoma bacteriano. La subunidad A (33 kDa) es la parte biológicamente activa, responsable de la actividad catalítica, y la subunidad pentamérica B (7,5 kDa cada monómero), es la responsable de la unión de la toxina al receptor celular específico Gb3 en las células blanco (A D O'Brien, 1987).

El proceso inicial de endocitosis depende de la conexión de Gb3 a balsas lipídicas en las membranas celulares. Estas balsas lipídicas contienen caveolina –proteína integral de membrana plasmática- donde la polimerización proporciona la plataforma sobre la cual se forman los endosomas tempranos. La movilización de los microtúbulos pone en juego las vías dependiente e independiente de clatrina. Luego, el complejo Stx-Gb3 es dirigido desde el endosoma temprano hacia el retículo endoplasmático a través de un transporte retrógrado, haciendo posible que Stx-Gb3 escape a la degradación lisosomal. Durante el transporte, la subunidad catalítica A es escindida por la proteasa furina en dos fragmentos: A1 y A2. En el retículo endoplasmático, el puente disulfuro entre los dos fragmentos es reducido, y el fragmento A1 es translocado hacia el citoplasma (transporte anterógrado) donde queda libre para ejercer su efecto citotóxico, que consiste en la eliminación de una base de adenina específica del extremo N-glicosídico del rRNA 28S de la subunidad ribosomal 60S dentro de las células infectadas, inhibiendo la síntesis proteica y por lo tanto generando una muerte celular. La patofisiología del tráfico de la toxina Shiga y su acción intracelular se esquematiza en la Figura 3. La citotoxicidad de Stx está ligada a la expresión del receptor Gb3 en la superficie de las células blanco. Comparado con otros órganos, el riñón expresa niveles relativamente altos de Gb3, razón

por la cual resulta uno de los órganos target fundamentales en el desarrollo del SUH (Ibarra et al., 2008).

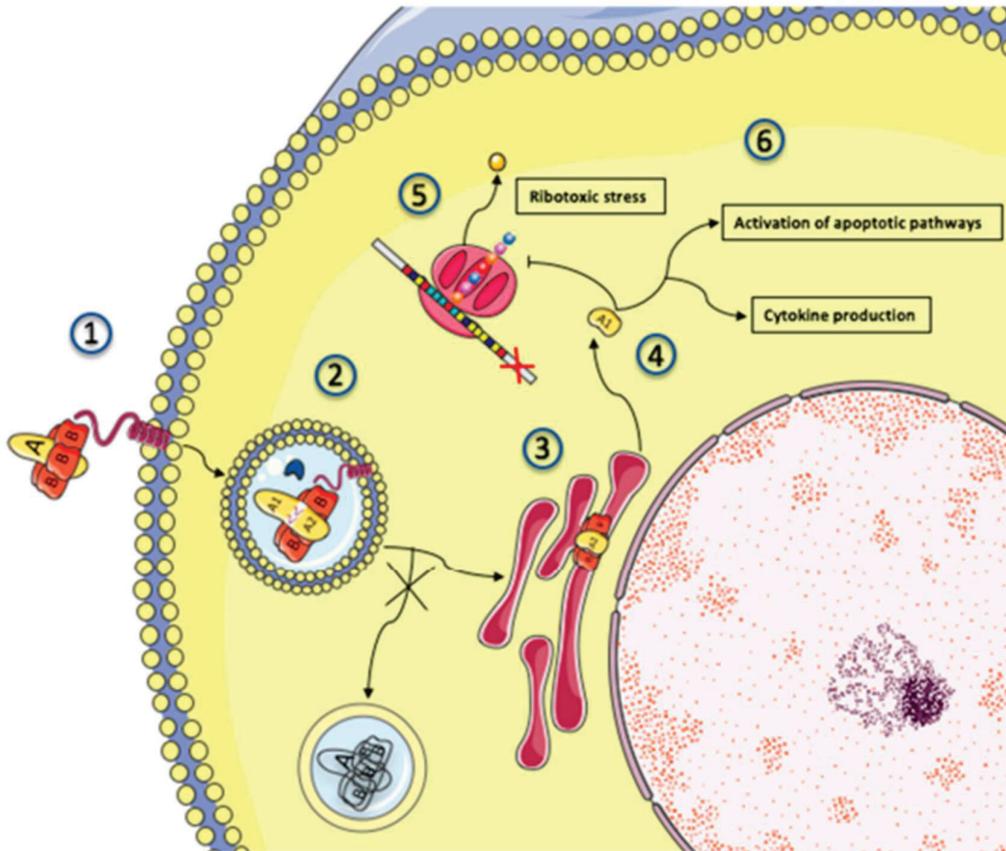


Figura 3. 1. La subunidad B de la Toxina Shiga se une al receptor Gb3, presente en balsas lipídicas en la superficie de las células target. 2. La Stx y su receptor son internalizados (endocitosis), y Stx es activada mediante el clivaje de la subunidad A en dos fragmentos por la proteasa furina (representada por la medialuna azul). Los puentes disulfuro mantienen a los dos fragmentos juntos en el endosoma. 3. La Stx evade la vía lisosomal y se dirige a través del retículo endoplasmático (transporte retrógrado) donde es reducido el puente disulfuro. 4. La subunidad A1 es traslocada al citoplasma (transporte anterógrado) donde ejerce sus efectos citotóxicos. 5. El fragmento A1 cliva una adenina del rRNA 28S de la subunidad ribosomal 60S, inhibiendo la síntesis de proteínas y disparando una respuesta ribotóxica y estrés del retículo endoplasmático. 6. Stx también activa múltiples señales de estrés y vías apoptóticas, y es responsable de la producción de citoquinas inflamatorias por parte de la célula invadida (Adrien Joseph et al., 2020).

Las Stx se pueden clasificar según sus secuencias aminoacídicas en dos grandes grupos, Stx1 y Stx2. Cada grupo, a su vez, posee un creciente número de variantes. El grupo de las Stx1 está compuesto por los subtipos Stx1a, que es idéntica a Stx de *S. dysenteriae* tipo 1; Stx1c (Zhang et al., 2002); y Stx1d. A pesar de que Stx1 y Stx2 poseen el mismo

mecanismo de acción, comparten sólo un 55% de similitud en la secuencia aminoacídica. El grupo de las Stx2 es más heterogéneo, y comprende a los subtipos Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g. Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos pueden producir variantes de Stx1 y Stx2, solas o combinadas. Si bien los miembros de la familia de Stx muestran similitud en su estructura y función, cada uno de los subtipos presenta grandes diferencias en su toxicidad *in vitro* e *in vivo*. Con lo que a esto respecta, se ha demostrado que Stx2 tiene una actividad citotóxica de 100 a 1000 veces superior a Stx1 (Eppinger et al., 2022). Dentro de las cepas productoras de Stx2, los subtipos Stx2a, Stx2c y Stx2d se han visto asociados con mayor frecuencia a casos de colitis hemorrágica (CH) y SUH (Hiriart et al., 2018). Por lo tanto, la caracterización de Stx posee un importante valor predictivo de evolución a SUH en un paciente infectado por STEC (Friedrich et al., 2002).

1.2-EspA (*E. coli* secreted protein A)

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) y enterohemorrágica (EHEC) colonizan el epitelio intestinal causando la lesión A/E mediante un mecanismo que involucra la estrecha unión de la bacteria a la célula huésped. Los factores de virulencia esenciales para este proceso están codificados en una isla de patogenicidad, el *locus* de desprendimiento de enterocitos (LEE, por sus siglas en inglés *locus of enterocyte effacement*), que incluye la Intimina (gen *eae*), EspA (gen *espA*) y Tir (gen *tir*, receptor para la translocación de Intimina) (Praekelt et al., 2014) (Fig. 4). La expresión del LEE y la formación de los pedestales se ven reforzados luego del pasaje de la bacteria al mamífero, existe evidencia de que la expresión del LEE es sensible a las hormonas catecolaminas relacionadas con el estrés del huésped, detectado por sensores adrenérgicos de quinasas bacterianos (Hughes & Sperandio, 2008).

Utilizan un sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) para inyectar sus proteínas efectoras en las células eucariotas. Este aparato abarca las membranas interna y externa de la bacteria e incluye una aguja helicoidal que sobresale al espacio extracelular. Hasta el momento se observa sólo en EPEC y en EHEC y no en otras bacterias Gram negativas

patogénicas que contienen el T3SS, un filamento conformado por la proteína EspA que actúa como extensión de la aguja, mediando tanto la unión a las células eucariotas como el transporte de proteínas efectoras a través de la capa mucosa intestinal (Fig. 5).

La estructura del filamento de EspA comprende un tubo helicoidal de 12 nm de diámetro, compuesto por 5.6 subunidades de EspA por vuelta, que sirve como extensión de la aguja, formando un canal central de ~ 25 Å de diámetro. Esta estructura evoluciona adaptándose al ambiente, en el cual la aguja sola no sería lo suficientemente larga para atravesar la capa mucosal del intestino. Los filamentos de EspA y la aguja comparten una simetría helicoidal similar con estructuras flagelares y son alargados por adición de subunidades de EspA en la punta del filamento en crecimiento, de la misma manera que ocurre en los filamentos de flagela (Zheng et al., n.d.).

Funcionalmente, los filamentos forman un conducto helicoidal largo y flexible que conecta la punta de la aguja con el poro de translocación (conformado por las proteínas EspB y EspD), por el cual median la translocación de los efectores. En efecto, EspA interactúa con EspB y EspD. Además de su actividad de translocación de proteínas, los filamentos de EspA son importantes adhesinas, mediando la unión tanto a las células epiteliales como a hojas comestibles. En ausencia de los filamentos de EspA, los efectores podrían ser secretados, pero no translocados.

Por otra parte, los filamentos de EspA son importantes antígenos *in vivo*. Se han encontrado anticuerpos contra EspA tanto en calostro humano como en suero de pacientes infectados con EHEC. En modelos animales, los anticuerpos IgG anti EspA juegan un rol principal en la eliminación del patógeno (Jenkins et al., 2000). Por tanto, se considera que EspA es un constituyente fundamental para formar parte de una vacuna para el control de EHEC en ganado bovino.

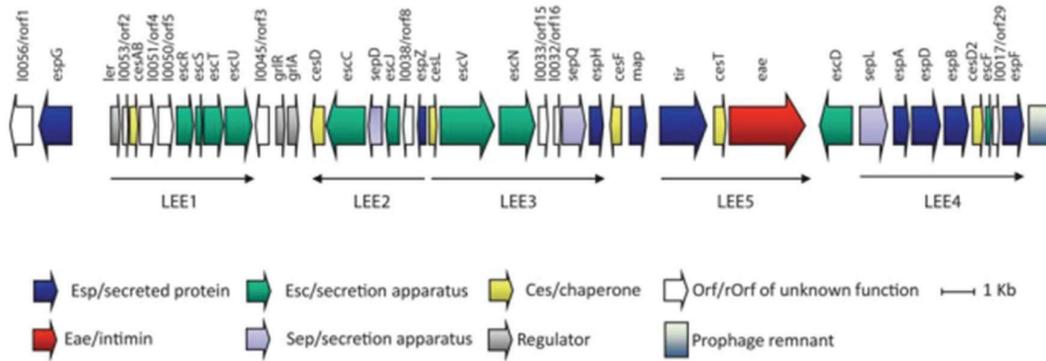


Figura 4. Organización genética del locus LEE de *E. coli* O157:H7. Los marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés “*Open Reading Frames*”) están representados por flechas gruesas, y los operones policistrónicos putativos están designados por las flechas finas (LEE1, LEE2...). Las flechas gruesas blancas representan ORFs de función desconocida y se designan como “orf” o “rorf”, dependiendo de la dirección de transcripción de eae (Stevens & Frankel, 2014).

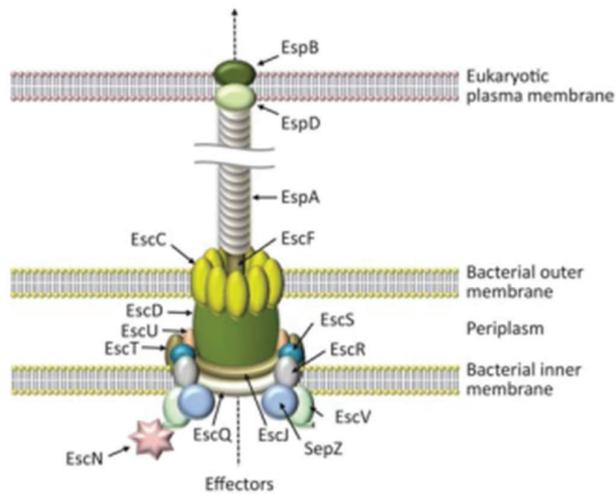


Figura 5. Representación esquemática del sistema de secreción de tipo 3, demostrando la organización espacial predicha por LEE (Stevens et al., 2014).

1.3- Intimina

Además de los genes *stx*, las cepas STEC más virulentas poseen el gen *eae*, que expresa la proteína de membrana externa Intimina. El gen *eae* se encuentra codificado en la isla de patogenicidad LEE, la cual contiene 41 genes organizados en 5 operones policistrónicos denominados LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 y LEE5 (Figura 4). Esta compleja isla de 35,6 kb está regulada y contiene todos los genes necesarios para la formación de la lesión A/E. Los operones LEE1, LEE2 y LEE3 codifican los genes de las proteínas del sistema de secreción tipo III (T3SS) que forman el complejo de aguja. En el LEE4 se codifican los genes de las proteínas que se secretan a través del T3SS, las cuales se conocen de forma colectiva con el nombre de Esp (del inglés, *E. coli* secreted proteins). En el operón LEE5 se encuentran codificados los genes de las proteínas del sistema de adherencia propiamente dicho, la Intimina y su receptor Tir (del inglés, translocated intimin receptor) (Castillo et al., 2005). Intimina es una adhesina de membrana externa de 94 a 97 kDa producida por las cepas EHEC patogénicas relacionadas con la lesión A/E. Su secuencia de 939 aminoácidos se distingue por una región altamente conservada en su extremo N-terminal (aminoácidos 388 al 667), y variable en los últimos 280 aminoácidos de la región C-terminal (Int₂₈₀). Es en este extremo C-terminal donde se encuentra el dominio de ligación de la Intimina a su receptor Tir (Frankel et al., 1994) (Figura 6). Frankel et al. demostraron que estos 280 aminoácidos del carboxilo terminal de Intimina de EPEC 127:H6 y EHEC O157:H7 se unen directamente a células Hep-2, y la misma región también media la unión entre la Intimina de EHEC O26:H- a las células huésped. Más aun, la expresión de dos tercios del C-terminal de la Intimina fue suficiente para restaurar la adherencia de una cepa EHEC O157:H7 Δeae mutante (Mckee & O'Brien, 1996). Otros estudios indicaron que la unión de Intimina purificada a células eucariotas sólo se puede detectar si dichas células son pre-infectadas con EPEC o EHEC, indicando que el factor bacteriano influye en la adherencia mediada por la Intimina (Stevens et al., 2014). Aunque en principio fue identificada en EPEC O127:H6, un homólogo en EHEC O157:H7 que exhibía 83% de identidad en su secuencia aminoacídica fue luego reportado como mediador de la adherencia bacteriana en cultivo de células y colonización intestinal en cerdos (Donnenberg et al., 1993). Estudios subsecuentes

establecieron que la Intimina de O157:H7 juega un rol fundamental en la persistencia y patogénesis en ratones, conejos jóvenes, terneros neonatos y corderos, y ganado bovino adulto y ovejas. También se ha reportado que la Intimina induce respuestas inflamatorias en la mucosa; por ejemplo, induce la respuesta celular Th1 (linfocitos T “helper” tipo 1), que se caracteriza por el engrosamiento de la mucosa e infiltración de linfocitos T CD4+ durante la infección de ratones con *C. rodentium* (Higgins et al., 1999), y puede aumentar la proliferación estimulada por mitógenos de linfocitos T CD4+ del bazo y células de tejidos linfoides.

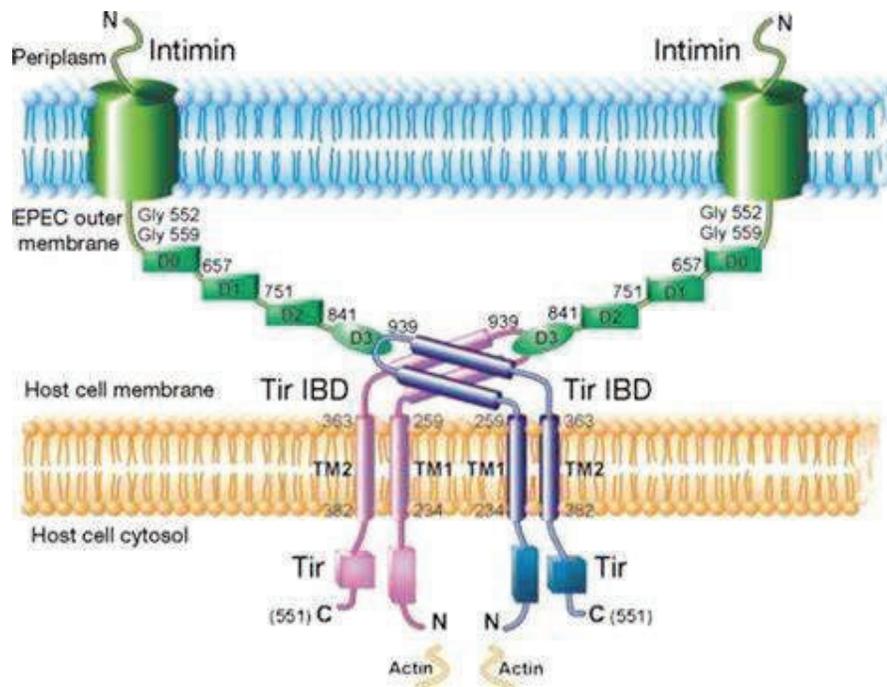


Figura 6. Interacción entre la Intimina y su receptor Tir en la membrana de la célula huésped. Intimina está representada en verde con sus residuos de la porción C-terminal numerados. Tir está representado como un dímero (en azul y rosa) con el dominio de ligación a Intimina (IBD) extracelular y las porciones N- y C-terminales intracelulares (Luo et al., 2000).

En análisis filogenéticos de los genes eae se identificaron diferentes subtipos, designados como Int- α , - β , - γ , - δ , - ϵ , and - θ (Zhang et al., 2002), aunque otros subtipos de Intimina se han identificado en los años subsiguientes. La diferencia se da en la secuencia del C-terminal que es el dominio de unión a la célula diana, y en general está asociada a linajes específicos de EPEC y EHEC. Por ejemplo, Int- α está asociada con los serotipos de EPEC

O55:H6 y O127:H6, mientras que Int-y se encuentra en los serotipos de EHEC O157:H7 y EPEC O55:H7. Como se mencionó anteriormente, el dominio C-terminal de la Intimina interviene en la unión a Tir y por consiguiente a la superficie de la célula huésped, por lo que esta divergencia en los subtipos de la adhesina podría incidir en la avidéz y especificidad de adherencia.

Objetivos

Objetivos generales:

Expresar, de manera recombinante, factores de virulencia de STEC y purificarlos para el desarrollo de herramientas analíticas e inmunoensayos.

Objetivos específicos:

- Transformar, expresar y purificar las proteínas seleccionadas: Stx2B, EspA e Intimina.
- Evaluar su inmunogenicidad mediante la obtención de sueros policlonales dirigidos a un reconocimiento específico de las mismas.

2- Materiales y métodos

Preparación de bacterias competentes y evaluación

Se cultivaron las cepas bacterianas de clonado y expresión: *Escherichia coli* DH5 α , Rosseta pLysS, M15 y BL21. Con el fin de obtener bacterias competentes, se siguió la metodología descrita por Hanahan y colaboradores para bacterias competentes a ser crioconservadas (Hanahan et al., 1991). La eficiencia de transformación alcanzada se evaluó a partir de realizar un ensayo de transformación química por shock térmico con una suspensión de plásmido de interés (pET28a:1BStx2B, pET28a:EspA, pFL3 β). Se descartaron aquellas placas de medio LB con antibiótico de interés (kanamicina, ampicilina ó cloranfenicol, según corresponda) en las cuales se observó una eficiencia de transformación inferior a 10⁷ UFC/ μ g de ADN.

Expresión de proteínas recombinantes

Las cepas de expresión (*E. coli* DH5a, BL21, *Rosetta* y M15, según corresponda) se transformaron químicamente con los plásmidos que contienen las secuencias codificantes para la expresión de los inmunógenos de interés (Stx2B, EspA e Intimina) siguiendo la metodología descrita por Hanahan (Hanahan 1991). Los plásmidos conteniendo la secuencia codificante para la proteína recombinante EspA y la región variable C-terminal de Intimina fueron cedidos gentilmente por la Dra. Roxane Piazza del Instituto Butantán (Sao Paulo, Brasil). La selección de las bacterias positivas fue mediante la confirmación en medio de cultivo sólido de la inducción de resistencia a antibióticos aportada por el plásmido de expresión. La expresión de las proteínas recombinantes se realizó en cultivos inducidos en fase exponencial (DO 600 nm 0,6 - 0,8) por el reactivo IPTG. Los tiempos y temperaturas de inducción se optimizaron para cada proteína en particular, tomando muestra en cada paso del proceso. A partir de las muestras anteriores, se analizó su composición proteica mediante corridas electroforéticas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12,5% ó 15%) (Laemmli, 1970). Esta información se empleó para la expresión de las proteínas recombinantes a una escala mayor. La biomasa bacteriana obtenida en la condición de cultivo seleccionada se recuperó mediante centrifugación (10.000 G, 20 min, 4°C), se resuspendió en *buffer* de lisis (50 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl, PMSF 1 mM y 5mM Imidazol) y se procedió a la lisis bacteriana mediante sonicación, analizando la presencia de la proteína recombinante en las fracciones obtenidas luego de la centrifugación del lisado (fracción sobrenadante ó precipitado).

Con motivo de recuperar aquellas proteínas que se separaron junto al material insoluble post-sonicación, el precipitado fue resuspendido en el mismo *buffer* de lisis, al cual se le adicionó Urea 8M, lentamente, en agitación y a temperatura ambiente. Esta suspensión se centrifugó a 7000 g durante 20 min y el sobrenadante, conteniendo la proteína deseada, fue el material de partida para comenzar la purificación.

Purificación de proteínas recombinantes

La evaluación preliminar de las condiciones de unión y elución de las proteínas recombinantes, por la metodología de Cromatografía de Afinidad por Iones Metálicos (IMAC), se realizó utilizando columnas de purificación por gravedad con resina de Níquel. Las fracciones colectadas se analizaron mediante la técnica de SDS-PAGE. A partir de la información obtenida en los ensayos anteriores se optimizó la purificación de las proteínas recombinantes y se llevó a cabo a mayor escala mediante el empleo de la técnica de Cromatografía Líquida de Rápida Performance (FPLC) (equipo AKTA explorer 100[®], GE Healthcare, EEUU), monitoreando y analizando los resultados mediante el software Unicorn[®] (versión 4.1, GE Healthcare, EEUU).

Obtención de anticuerpos policlonales con reconocimiento específico por las proteínas de interés

Para el desarrollo de anticuerpos clonales con reconocimiento específico contra las proteínas de interés se emplearon ratones hembra de la cepa CF-1 de 18-21 g y conejos de sexo indistinto de la raza Nueva Zelanda Blanca de 2 a 3 kg de peso. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (entre 20-25°C) y humedad relativa (40-70%), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea con la proteína recombinante pura correspondiente emulsionada en adyuvante completo de Freund, la primera dosis, y con adyuvante incompleto de Freund, la segunda y tercera dosis. Los conejos, por su parte, fueron inmunizados por vía subcutánea con la proteína recombinante pura correspondiente emulsionada en adyuvante completo de Freund la primera dosis, y con adyuvante incompleto de Freund la segunda y tercera dosis.

Al finalizar el calendario, se recolectó sangre de los animales mediante punción cardíaca bajo anestesia general, utilizando tubos con gel separador de suero. Los sueros se almacenaron a -20°C hasta su uso en ensayos de inmunodetección.

Western Blot

Las muestras proteicas resueltas mediante la técnica de SDS-PAGE fueron transferidas por electro transferencia a membranas de nitrocelulosa previamente cortadas acorde con el tamaño de cada gel e hidratadas en buffer de transferencia (Tris/Glicina 25mM/192mM en 20% de Metanol) durante 10 min. La transferencia de las proteínas de los geles a las membranas fue realizada a 80 V durante 1:30 h.

La membrana se bloqueó en solución de leche descremada al 5% en PBS durante 1 h a 37°C. Luego se incubó con el anticuerpo primario específico (sueros policlonales) diluido en solución de leche descremada al 3% en PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T), *overnight* a 4°C y con agitación. Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-T. La membrana se incubó con anticuerpo secundario (anti-*rabbit* ó anti-*mouse* conjugado a HRP, según corresponda) diluido en leche descremada 3% en PBS-T durante 2:30 h a T ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-T y se reveló con una solución de 4-cloronaftol 1/10 en PBS + peróxido de hidrógeno 0,1%, en oscuridad, durante aproximadamente 10 min. La reacción se detuvo mediante el lavado de la membrana con H₂O destilada.

3- Resultados y discusión

3.1- Optimización de la expresión y purificación de proteínas recombinantes

Stx2B

En nuestro grupo de investigación hemos generado previamente un vector que codifica la expresión de la subunidad B de la Stx2B en *E. coli*. Durante la construcción de este vector, a la secuencia que codifica para la expresión de la subunidad 2B, se le adicionó en su extremo 5' la secuencia líder de la subunidad 1B y ésta secuencia final fue en el sitio de clonado múltiple del vector pET28a. De esta manera, el producto maduro

obtenido, luego de la escisión de la secuencia líder por la maquinaria propia de expresión bacteriana, se compone de la secuencia correspondiente a la subunidad B de Stx2B seguida de una etiqueta desde 6 Histidinas en el extremo C de la proteína expresada, lo cual facilita su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). Este vector (denominado 1BStx2B) se encontraba transformado en la cepa de expresión *E. coli* Rosetta pLysS. Se expresó la proteína recombinante, partiendo desde el stock en glicerol, siguiendo las condiciones de expresión optimizadas en trabajos previos (inducción con 1 mM de IPTG, 20°C, 16 h). La masa molecular esperada para el inserto luego de su expresión es de 8,8kDa (Figura 7).

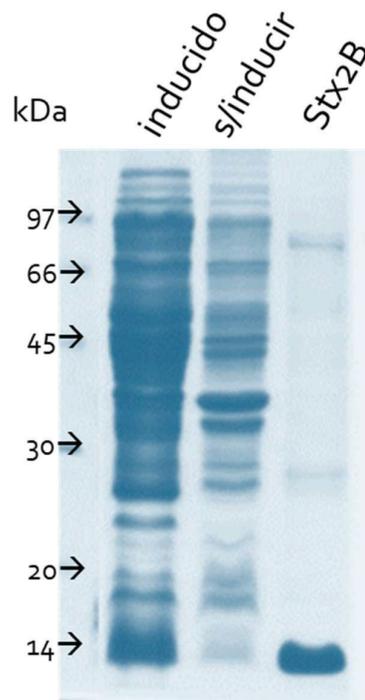


Figura 7. SDS-PAGE 15% para fracciones sin inducir (s/i) e inducidas (i). El gel se tiñó con Coomassie Blue R-250.

La purificación de esta proteína a partir de los extractos solubles, obtenidos luego de la ruptura por sonicación de la biomasa bacteriana, se realizó basada en la afinidad a ligandos metálicos de la proteína merced a la presencia de una etiqueta de poli histidinas. Se siguió un proceso inicial de *screening* de condiciones de unión a una resina cromatográfica de afinidad a ligandos metálicos (IMAC) por gravedad, y luego se trasladaron los resultados obtenidos a una cromatografía rápida en fase líquida (FPLC), siguiendo los pasos descritos en la sección de Materiales y Métodos. En la Figura 8a y 8b se muestra lo observado luego de la resolución de los diferentes eluatos cromatográficos

en geles SDS-PAGE durante la purificación de rStx2B y el correspondiente cromatograma. Una vez concentradas, las purificaciones de rStx2B fueron esterilizadas por filtración (tamaño de poro 0,22 μm), en cabina de bioseguridad, quedando así listas para su uso en la formulación de inmunógenos y/o para su análisis posterior.

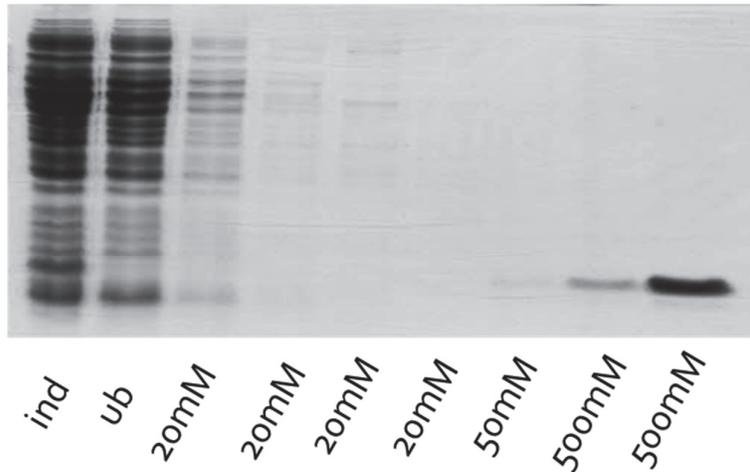
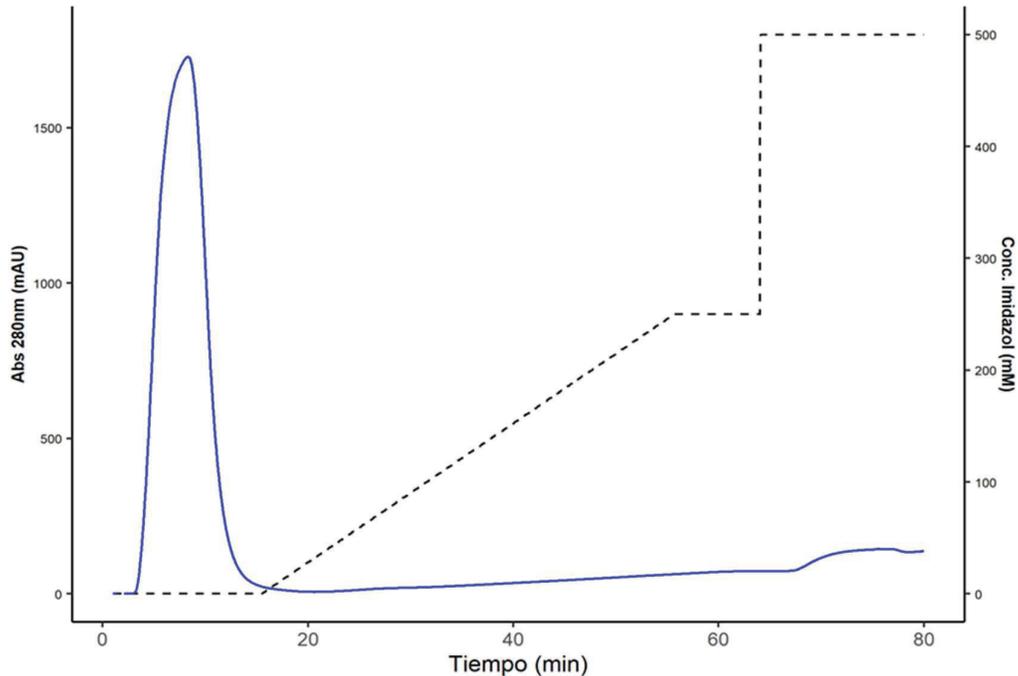


Figura 8. A- SDS-PAGE 15% en condiciones reductoras para purificación de rStx2B por IMAC. Ub: proteínas no unidas a la resina; L1-L6: lavados; E1: 2 eluciones con 500mM Imidazol. Tinción Coomassie Blue R-250.



B- Cromatograma de una purificación automatizada, registro de absorbancia UV a 280 nm.

EspA

La proteína rEspA de 20,5 kDa fue expresada y purificada según se detalló en materiales y métodos, basado en la presencia de una etiqueta de afinidad a ligandos metálicos (His-tag) en su secuencia. Las fracciones de las distintas etapas del cultivo fueron analizadas por SDS-PAGE (Figura 9).

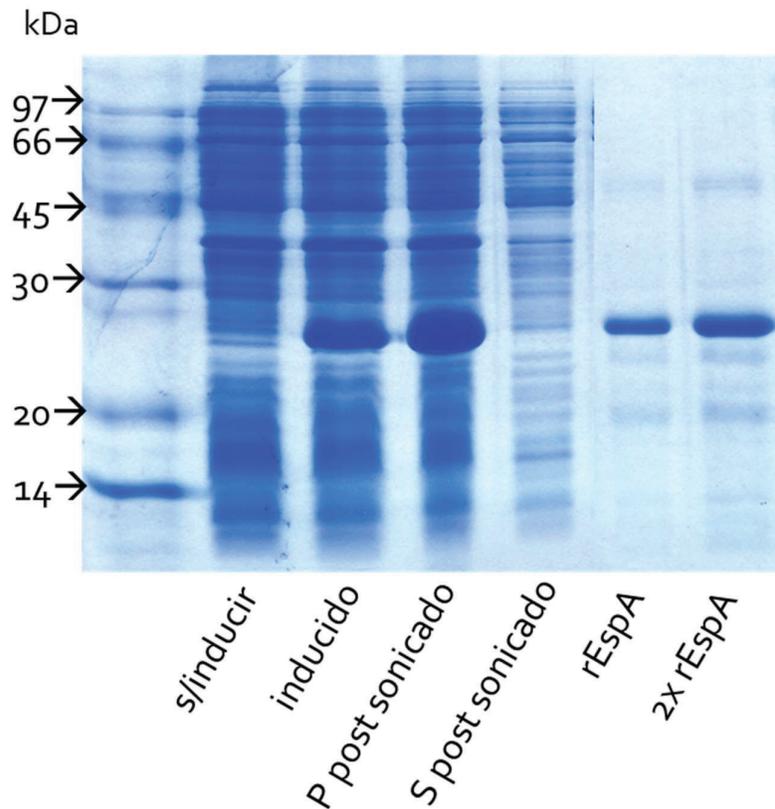


Figura 9. SDS-PAGE 12,5% en condiciones reductoras. Calle 1: patrones de peso molecular expresados en kDa; calle 2: lisado bacteriano sin inducir; calle 3: lisado bacteriano inducido; calle 4: fracción insoluble post sonicación; calle 5: fracción soluble post sonicación. El gel se tiñó con Coomassie Blue G-250 coloidal.

En la Figura 9 puede observarse que, luego de la expresión de la proteína recombinante EspA en este sistema, la mayor parte de esta permanece insoluble, muy probablemente producto de la formación de cuerpos de inclusión. Estos son agregados citoplasmáticos

generados durante la expresión recombinante de la proteína, como consecuencia de problemas de la conformación nativa de la misma.

Dado que, como se ha mencionado, la proteína recombinante posee una etiqueta de afinidad a iones metálicos, la purificación se realizó mediante el empleo de columnas de cromatografía de afinidad a Níquel inmovilizados, de forma equivalente a lo ya descrito para el caso de rStx2b. Nuevamente, se realizó un *screening* inicial por gravedad de las condiciones de purificación. Como puede observarse en la Figura 10, la proteína rEspA fue obtenida a través de este proceso con un alto porcentaje de pureza.

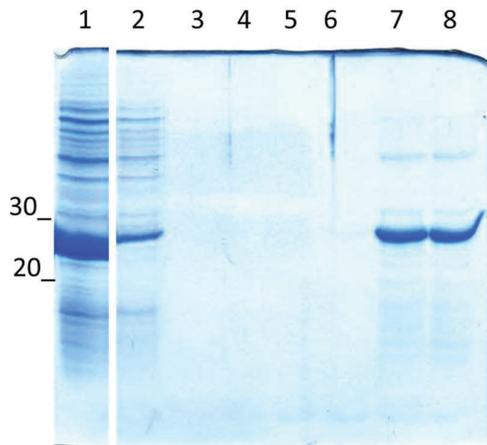


Figura 10. SDS-PAGE 15% en condiciones reductoras. Calle 1: precipitado post-sonicación re disuelto en buffer lisis + Urea 8M. Calle 2: primera fracción de proteínas no unidas a la resina. Calles 3-6: lavados con 20mM y 50mM. Calles 7 y 8: eluidos con 500mM. Tinción Coomassie Blue G-250 coloidal.

Luego, los resultados obtenidos en el *screening* inicial fueron empleados para desarrollar un proceso de purificación de la proteína a mayor escala, mediante el uso de un equipo de FPLC, aumentando el volumen de muestra, flujo y, además, trabajando de forma dinámica con un gradiente de *buffer* hasta llegar a 50 mM. Asimismo, se fue monitoreando por UV el lavado de las proteínas inespecíficas y luego se eluyó la proteína de interés con una concentración de 500mM de Imidazol (Figura 11 A y B).

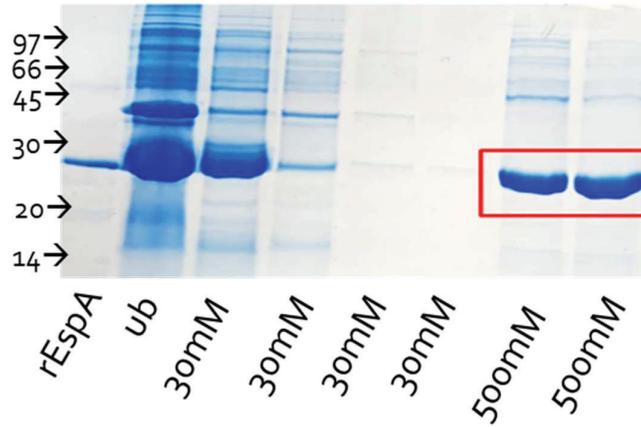
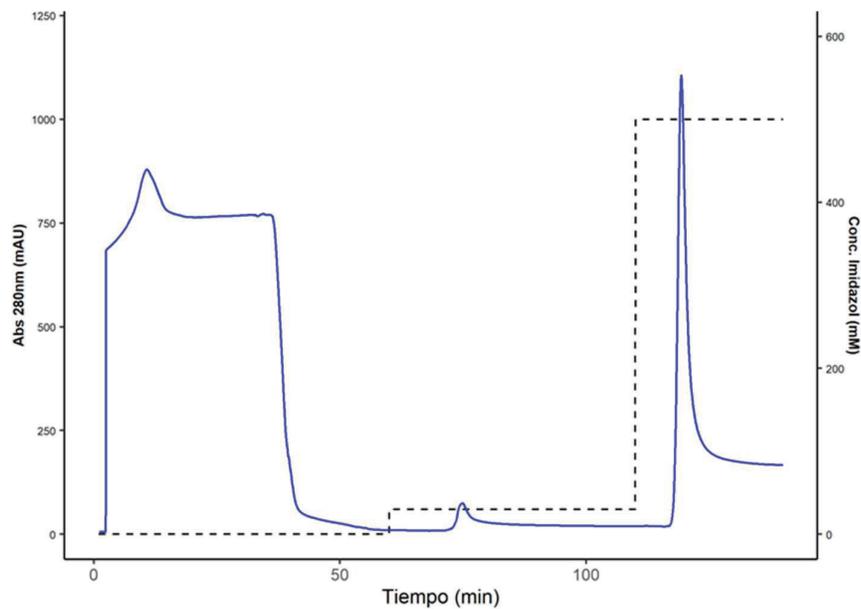


Figura 11. A- SDS-PAGE 12,5% en condiciones reductoras. Calle 1: proteína rEspA purificada anteriormente (control positivo). Calle 2: precipitado post-sonicación rediseuelto en buffer de lisis + urea 8M. calle 3: primera fracción de proteínas no unidas a la resina. Calles 4-6: lavados con 30mM. Calles 7 y 8: eluidos con 500mM. Tinción con Coomassie G-250 coloidal.



B- Cromatograma obtenido en software UNICORN provisto por el equipo de FPLC AKTA explorer. Se muestra el monitoreo de absorbancia UV a 280 nm.

La concentración final de la proteína se mantuvo entre 1-2 mg/ml; se alicuotó y se conservó a -70°C para sus usos posteriores.

Intimina

Al igual que en el caso de la proteína recombinante EspA, el vector codificante para la expresión de la proteína Intimina fue cedido por la Dra Piazza. No obstante, a diferencia del caso de EspA, no se disponía de información relativa tanto a la composición del vector como a las condiciones requeridas para realizar clonado y expresión. La única información disponible era que el vector de Intimina (pFL3 β) contenía los genes de resistencia para kanamicina y ampicilina y que el producto final de expresión poseía un tamaño molecular estimado de 80 kDa. Los primeros intentos de transformación fueron realizados en las cepas de expresión de *E. coli* BL21(DE3) y Rossetta y resultaron infructuosos. Estas cepas basan la expresión recombinante de proteínas a través del uso de la ARN polimerasa dependiente del fago T7. Estas cepas poseen el gen codificante para la expresión de la mencionada ARN polimerasa dentro de su cromosoma, cuya expresión se encuentra regulada por la presencia de un promotor inducible por lactosa (operón *lac UV5*) río arriba de su secuencia. Luego, mediante la elevación de la concentración de lactosa (o el uso de IPTG) se induce la expresión de la ARN polimerasa del fago T7, la cual posee una alta productividad para aquellas secuencias que posean río arriba del inicio de transcripción a la región promotora correspondiente del fago T7. Se especuló entonces con la hipótesis que probablemente el promotor presente en el plásmido pFL3 β fuera inducible por lactosa, utilizando para la expresión a la ARN polimerasa propia de la bacteria y no poseyera una región promotora compatible con la ARN polimerasa del fago T7. Dado que la primera etapa de clonado del vector de origen fue realizada sobre una cepa de *E. coli* DH5 α y considerando que, si bien esta cepa no se encuentra optimizada para la expresión de proteínas pero posee su propia ARN polimerasa, se decidió evaluar la capacidad de inducción de la expresión de la proteína con el análogo de lactosa IPTG de igual manera que se realiza con las cepas comúnmente usadas en expresión. En paralelo, también se transformó la cepa *E. coli* BL21 y, para ambas, se probaron las siguientes condiciones de inducción:

- 1mM IPTG, 4 h, 37°C
- 2mM IPTG, 4 h, 37°C
- 1mM IPTG, 4 h, 25°C
- 2mM IPTG, 4 h, 25°C

- 1mM IPTG, ON, 37°C
- 2mM IPTG, ON, 37°C
- 1mM IPTG, ON, 25°C
- 2mM IPTG, ON, 25°C

Como resultado de estos ensayos, se obtuvo una alta expresión de la proteína de peso molecular esperado (Figura 12) en la cepa DH5 α y no en BL21(DE3) y en todas las condiciones, concluyendo que la cepa de origen del clon pFL3 β contenía un promotor lac/T5 con resistencia a ampicilina.

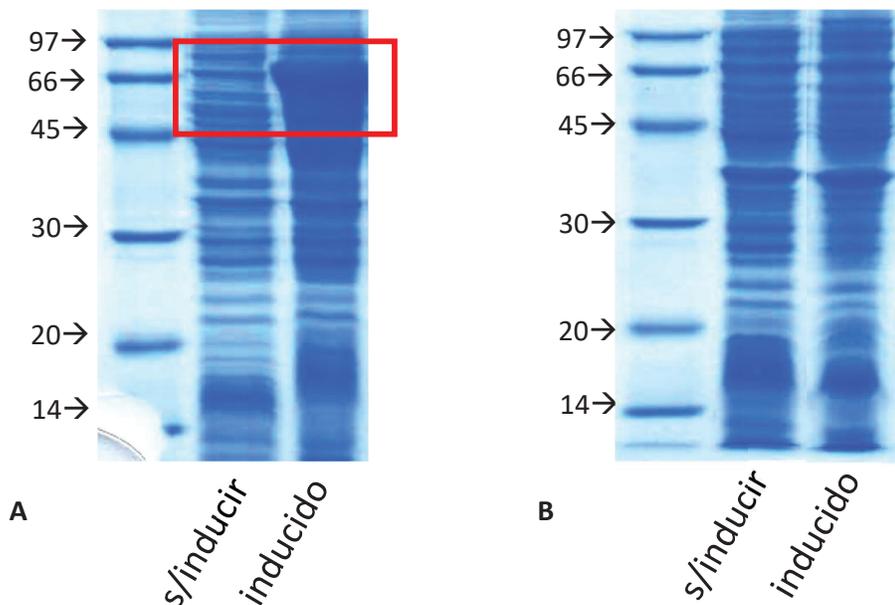


Figura 12. A. SDS-PAGE 12,5% *screening* de condiciones de inducción en cepa DH5 α . Calle 1: marcador de peso molecular. 2: proteínas totales sin inducir. 3: proteínas totales con inducción de la expresión. El gel se tiñó con Coomassie Blue G-250.

B. SDS-PAGE 12,5% *screening* de condiciones de inducción en cepa BL21. Calle 1: marcador de peso molecular. 2: proteínas totales sin inducir. 3: proteínas totales con inducción de la expresión. El gel se tiñó con Coomassie Blue G-250.

Con esta información, el plásmido se transformó en una cepa de expresión compatible con la expresión proteica a través de promotores derivados del promotor del operón lac. Estos sistemas, a diferencia de los empleados en las anteriores construcciones, emplean a la RNA polimerasa dependiente del anfitrión y no a la RNA polimerasa de fago T7, como es el caso de la cepa BL21(DE3). La cepa elegida fue la cepa de *E. coli* M15 (pREP4), que cuenta con un plásmido codificante para la expresión constitutiva del represor del

promotor lac (LacI), junto con resistencia a kanamicina. Los resultados en SDS-PAGE mostraron una expresión de la proteína recombinante de peso molecular esperado (Figura 13). Luego de la ruptura celular, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y, como se observa en la Figura 13, la proteína se encontró en el precipitado post sonicación. Es decir, como en el caso de la proteína recombinante rEspA, la Intimina es insoluble en el sobrenadante luego de la ruptura celular y, para poder solubilizarla y continuar con la purificación, se adiciona Urea 8M.

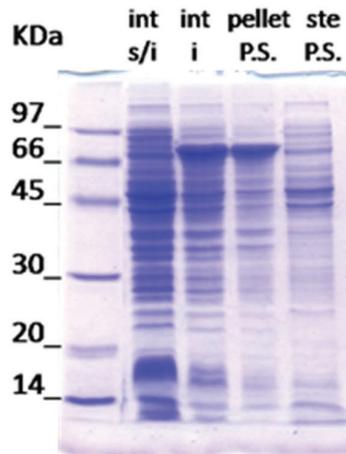


Figura 13. SDS-PAGE 12,5% en condiciones reductoras. Calle 1: patrones de peso molecular expresados en kDa; calle 2: lisado bacteriano de M15 sin inducir; calle 3: lisado bacteriano inducido; calle 4: fracción insoluble post sonicación; calle 5: fracción soluble post sonicación. El gel se tiñó con Comassie Blue R-250.

Para corroborar que la proteína recombinante Intimina (rInt) poseía una etiqueta de Histidina y continuar con la optimización de su purificación, se realizó un western blot utilizando un anticuerpo primario que reconoce dicho aminoácido. Efectivamente, la reacción se vio a la altura del peso molecular que se esperaba (dato no mostrado).

Con respecto a la optimización de su purificación, con esta proteína solo se trabajó en condiciones estáticas por gravedad con resina de Níquel. Como se mencionó anteriormente, se utilizó la fracción insoluble del cultivo bacteriano. En la Figura 14 se muestra un ejemplo de purificación. Las fracciones de cada purificación se juntaron en un pool y el cálculo de proteínas totales mediante método de Bradford en mini escala arrojó una concentración de 0,13 mg/ml de proteína recombinante. La proteína se alicuotó y se reservó a -70°C.

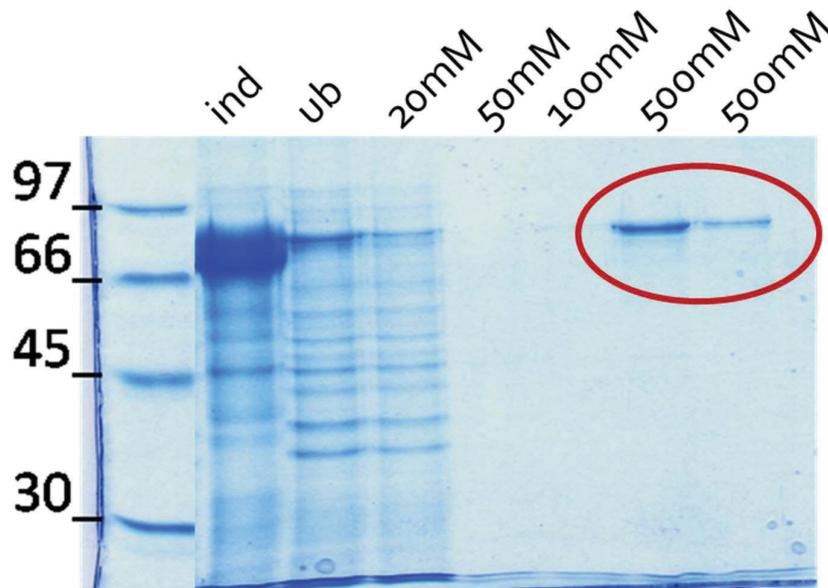


Figura 14. SDS-PAGE 15% en condiciones reductoras para purificación de rInt. Lis: lisado proteico post-sonicación y re suspendido en Urea 8M; ub: fracción no unida por afinidad a la resina IMAC de Níquel; lavados con gradiente de Imidazol 20, 50 y 100 mM; eluciones de la proteína recombinante con 500 mM de Imidazol. Tinción Coomassie Blue R-250.

3.2- Generación de sueros policlonales para el desarrollo de técnicas analíticas y/o diagnósticas.

Para evaluar la inmunogenicidad y capacidad de desarrollo de respuestas inmunes específicas de las proteínas recombinantes de la etapa anterior, se decidió generar anticuerpos policlonales en animales de experimentación. Los calendarios de inmunización empleados para cada uno de los antígenos recombinantes se presentan en la Tabla 1.

Día	Ratones	Conejos
0	15 µg Ag + CFA	150 µg Ag + CFA
30	15 µg Ag + IFA	100 µg Ag + IFA
60	15 µg Ag + IFA	100 µg Ag + IFA
90	Sangrado a blanco	Sangrado a blanco

Tabla 1. Calendario de inmunización. Ag: Antígeno (corresponde a la proteína recombinante pura); CFA: Adyuvante de Freund Completo; IFA: Adyuvante de Freund Incompleto

La calidad e inmunoespecificidad de las respuestas inmunes humorales desarrolladas en los animales de experimentación fue estimada mediante la técnica de western blot, según se señala en la sección de materiales y métodos, optimizando las condiciones de trabajo para cada uno de los pares antígeno-anticuerpo. A continuación, se describen los resultados obtenidos.

Desarrollo de anticuerpos policlonales contra rStx2B

Como se muestra en la Figura 15 A y B, no se logró detectar una alta especificidad en los sueros de conejo y ratones inmunizados con rStx2B.

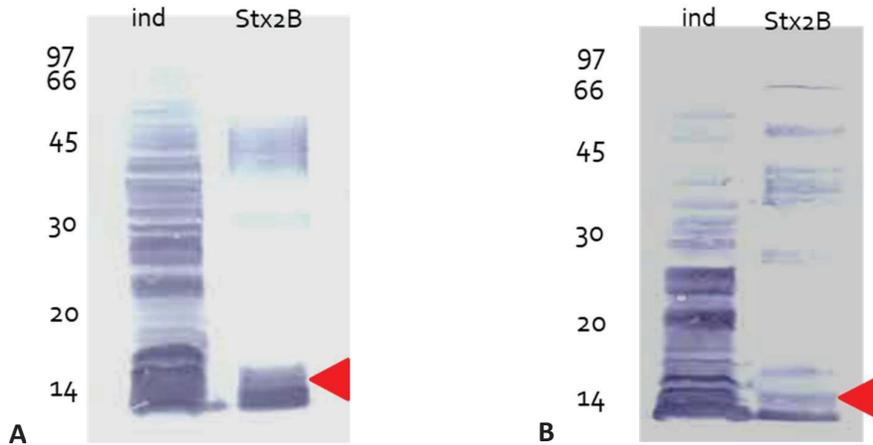


Figura 15. A. Western blot para Stx2B: Identificación del componente esperado de PM aproximado de 8,8 kDa (Stx2B) mediante western blot con suero policlonal de ratón (Anticuerpo primario) y revelado con suero anti-conejo conjugado a peroxidasa alcalina (Anticuerpo secundario). B. Western blot para Stx2B: Identificación del componente esperado de PM aproximado de 8,8 kDa (Stx2B) mediante western blot con suero policlonal de ratón (Anticuerpo primario) y revelado con suero anti-conejo conjugado a peroxidasa alcalina (Anticuerpo secundario).

Diferentes autores han reportado la baja inmunogenicidad de Stx2B, sumada a la pureza inferior al 90 % de la proteína recombinante empleada, justifican los resultados observados. Luego de analizar la estructura de rStx2B por HPLC y por geles de poliacrilamida nativos (datos no mostrados), pudimos observar que la proteína rStx2B se expresa formando diferentes multímeros. Luego, parte de la respuesta inmune humoral desarrollada en los animales de experimentación se encuentra dirigida hacia estos confórmers, originando así al menos parte de las bandas de reconocimiento hacia componentes de mayor peso molecular que el esperado para rStx2B. Dada la limitada especificidad de la respuesta inmune desarrollada hacia el componente deseado se ha decidido, como se describe en la segunda parte de la presente tesis, dirigir la estrategia de desarrollo analítico hacia metodologías basadas en la Espectrometría de Masas.

Desarrollo de anticuerpos policlonales contra rEspA

Los sueros policlonales obtenidos a partir de conejos y ratones inmunizados con rEspA mostraron un reconocimiento no solamente a una banda de peso molecular coincidente

con el de dicha proteína recombinante, sino además a varias otras bandas de tamaños moleculares tanto menores como superiores en los Western Blot (Figura 16 A y B).

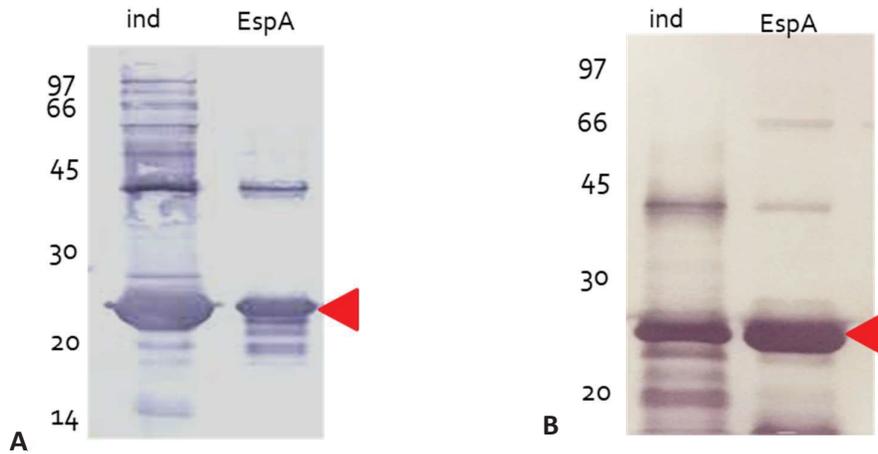


Figura 16. A. Identificación del componente esperado de PM aproximado de 25 kDa (rEspA) mediante Western Blot con suero policlonal de ratón (Anticuerpo primario) y revelado con suero anti-conejo conjugado a peroxidasa alcalina (Anticuerpo secundario). El suero es el correspondiente al final del calendario de vacunación. Se muestra la migración de los patrones de Peso Molecular.

Figura 16. B. Identificación del componente esperado de PM aproximado de 25 kDa (rEspA) mediante Western Blot con suero policlonal de conejo (Anticuerpo primario) y revelado con suero anti-conejo conjugado a peroxidasa alcalina (Anticuerpo secundario). El suero es el correspondiente al final del calendario de vacunación. Se muestra la migración de los patrones de Peso Molecular.

Las bandas correspondientes a cadenas polipeptídicas de menor peso molecular pudieron ser originadas por productos de degradación de rEspA. La banda de alrededor de 45 kDa está presente en la proteína purificada usada para realizar las inmunizaciones, como se muestra en la Figura 16, y podría corresponder a un dímero de EspA. La inmunogenicidad observada para rEspA en los ensayos anteriores, tomando en consideración lo reportado en torno a su rol como factor de virulencia y su potencial como antígeno vacunal, resultan prometedores en cuanto a las posibles aplicaciones en torno de esta proteína.

Evaluación de anticuerpos policlonales contra rInt

Al mismo tiempo, se realizaron los ensayos de Western Blot para evaluar la respuesta inmune desarrollada por los conejos y ratones sometidos al plan de inmunización con proteína recombinante Intimina (rInt) purificada anteriormente. Se observó un reconocimiento específico hacia la proteína de interés (Figura 17, A y B). No obstante, se observó además un reconocimiento hacia otros componentes del lisado la cepa de *Escherichia coli* M15 (reactividad cruzada). Al igual que los sueros anti rEspA, este es un suero que reconoce la proteína de interés, pero es necesario aumentar su especificidad reduciendo el reconocimiento a impurezas propias de una cepa que se encuentra naturalmente en prácticamente todos los animales.

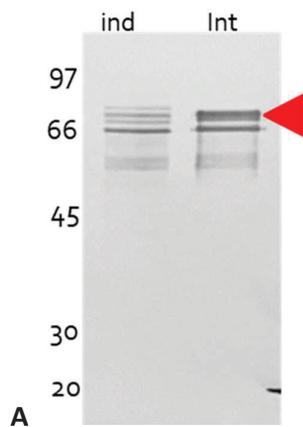


Figura 17. A. Western Blot para suero de ratón inmunizado con rInt (Anticuerpo primario). A la izquierda se indica la migración de los patrones de PM.

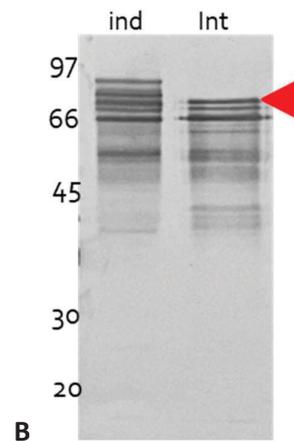


Figura 17. B. Western Blot para suero de conejo inmunizado con rInt. A la izquierda se muestra la migración de los patrones de Peso Molecular.

Los sueros obtenidos se encuentran por lo tanto disponibles para ser ensayados para el desarrollo de métodos analíticos de identificación y eventual cuantificación de la presencia de la proteína Intimina en extractos biológicos.

4- Conclusiones

A lo largo de esta primera etapa se han desarrollado metodologías para la expresión y purificación de versiones recombinantes de 3 factores de virulencia de una cepa STEC. Durante el desarrollo de estas metodologías se analizaron y optimizaron etapas críticas relacionadas con la expresión y con la purificación de estos factores. A pesar de la alta pureza alcanzada para los productos finales, los sueros policlonales obtenidos mediante la inmunización de animales de laboratorio con estos antígenos han mostrado un reconocimiento hacia los mismos, aunque no específicas, observándose respuesta en estos sueros hacia otros antígenos. Considerando que la plataforma de expresión recombinante utilizada se basa en el uso de cepas de *Escherichia coli*, que los factores de virulencia son producidos por cepas patogénicas de este microorganismo y que además es un comensal habitual del intestino de los animales de experimentación empleados, probablemente aún la presencia en muy baja proporción de proteínas contaminantes en los productos finales sea suficiente como para inducir una respuesta hacia éstas que provoque la inespecificidad detectada en los sueros. Luego, para continuar con la evaluación de estos antígenos recombinantes como herramientas de diagnóstico se trabajará en el desarrollo de etapas adicionales que permitan incrementar la pureza en los productos finales. En el caso de los antígenos recombinantes para desarrollar formulaciones vacunales veterinarias, deberá evaluarse en ensayos posteriores si hay que aumentar la pureza para alcanzar un grado satisfactorio de protección inmune.

La disponibilidad de herramientas analíticas simples, específicas y cuantitativas es un requerimiento indispensable para el adecuado desarrollo de procesos de producción de antígenos. Por este motivo, en la siguiente etapa de esta tesis, se abordó el desarrollo de técnicas analíticas basadas en la espectrometría de masas que permitieran el seguimiento específico cuali/cuantitativo de los antígenos recombinantes a lo largo de todo el proceso, esto es, tanto para ser utilizado en las etapas de expresión como de purificación y optimización de las mencionadas proteínas.

Parte 2

Desarrollo de herramientas analíticas basadas en Espectrometría de Masas

Introducción

1.1- Espectrometría de masas como una herramienta para el control de calidad

Las OMV (vesículas de membrana externa) se obtienen a partir de la biomasa de cultivos bacterianos, como se describió en secciones previas. Por lo tanto, su composición antigénica variará según las condiciones de cultivo, fase de cultivos al momento de la cosecha, etc. Esto representa un desafío en los controles de calidad requeridos para caracterizar las formulaciones. Por otra parte, la incorporación de proteínas expresadas en forma recombinante para incrementar su calidad antigénica presenta complejidades adicionales en términos de técnicas analíticas a aplicar para controlar la calidad de las formulaciones en una matriz tan compleja. En la siguiente sección se describen los resultados obtenidos en el proceso de desarrollo de una herramienta analítica basada en la Espectrometría de Masas (UFPLC-MSMS), para ser aplicado a la caracterización del contenido en factores de virulencia de cepas STEC expresadas en forma recombinante, en diferentes intermediarios del proceso.

Dentro de las técnicas basadas en espectrometría de masas, resultan de particular interés las estrategias de identificación de proteínas por la técnica de huella peptídica (PMF) (Cottrell, 1994) y las de cuantificación de péptidos y proteínas seleccionados a través del monitoreo de reacciones múltiples (MRM) (Lange et al., 2008). Esta herramienta será usada para la optimización de la composición antigénica de formulaciones vacunales, las cuales serán posteriormente evaluadas en ensayos de inmuno-prevención de la infección por cepas STEC. El objetivo es asegurar la calidad de un producto fundamental en la Salud Pública Nacional y detectar rápida y eficazmente factores críticos y relevantes en muestras complejas. A continuación, se realiza un

resumen de los aspectos más importantes de la cromatografía de alta presión en fase reversa acoplada a Espectrometría de Masas y las técnicas de detección y cuantificación.

1.2- LC-MSMS.

La introducción de técnicas de ionización y transferencia a fase gaseosa de macromoléculas a finales del siglo pasado, tales como MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionisation*) (Michael. Karas and Franz. Hillenkamp, 1988; Tanaka et al., 1988) y ESI (*electro spray ionisation*) (Bruins et al., 1987; Fenn et al., 1989; R. D. Smith et al., 1991) han permitido singulares avances para la caracterización de muestras complejas de proteínas. Las macromoléculas cargadas en fase gaseosa pueden ser analizadas mediante técnicas de alta resolución tales como arreglos lineales de triple cuadrupolo (LTQ), analizadores de tiempo de vuelo (Tof), entre otras. Esas técnicas tienen un amplio campo de aplicación para la caracterización de muestras biológicas complejas.

La Espectrometría de Masas (MS) es una técnica analítica que se utiliza para medir el radio de la masa molecular sobre la carga (m/z) de iones. Los resultados se muestran en un espectro de masas, en gráficos de intensidad de señal en función de la relación masa-carga de cada ion.

Esencialmente un espectrómetro de masas debe cumplir con las siguientes funciones:

- debe ser capaz de vaporizar sustancias de volatilidades muy diferentes
- una vez volatilizada la muestra, el espectrómetro debe ser capaz de originar iones a partir de las moléculas neutras en fase gaseosa
- una vez generados los iones, el espectrómetro debe ser capaz de separarlos en función de su relación masa/carga
- una vez separados los iones, debe poder detectar los formados y registrar la información.

Para todos estos requisitos, el equipo a utilizar cuenta con: un sistema de introducción de muestras, una fuente de ionización, un analizador para la separación de los iones y un sistema de detección y registro.

El campo de aplicación de la proteómica basada en MS ha crecido enormemente en los últimos 15 años y ha tenido un gran impacto en la bioquímica y la biología celular. Quizás el avance más importante de los últimos 5 años ha sido la cuantificación de proteínas con MS. Las limitantes de esta estrategia están cuando se quiere obtener un espectro de un péptido específico en tándem (espectro MS/MS) dentro de un digesto complejo. Esta técnica aísla un solo ion con un m/z específico para mayor análisis. Este análisis se lleva a cabo mediante la fragmentación del ion seleccionado y la determinación de su m/z en un segundo paso de análisis de masa. El término “espectrometría de masas en tándem” implica dos instancias de análisis de masa en un único experimento. Los péptidos de mayor abundancia se medirán con mayor rendimiento y precisión, mientras que los menos abundantes se encuentran con menor frecuencia y su rendimiento y precisión serán bajos. Además, los péptidos menos abundantes se detectarán en algunos análisis, pero no en otros, generando entonces un problema de datos faltantes que complican los análisis estadísticos posteriores (Kinter & Sherman, 2000).

Los métodos de separación de proteínas se utilizan desde hace muchos años. La cromatografía de exclusión molecular (SEC, por *Size Exclusion Chromatography*) separa las proteínas de acuerdo con su volumen hidrodinámico. Es útil para estudiar los agregados proteicos, lo que constituye una consideración importante en el control de calidad de proteínas terapéuticas. La cromatografía de intercambio iónico (IEX, por *Ion Exchange Chromatography*) separa a las proteínas de acuerdo con su carga. Las proteínas difieren en sus valores de pI (punto isoeléctrico) y estas cargas pueden variar debido a modificaciones post-transcripción o por el procesamiento de la muestra. La cromatografía de afinidad (AF, por *Affinity Chromatography*) se refiere a un aislamiento selectivo de proteínas específicas, generalmente a partir de una mezcla compleja. Pero requiere anticuerpos específicos para la proteína de interés, lo cual puede ser costoso o limitado de obtener. La cromatografía líquida en fase reversa (RPLC, por *Reverse Phase Liquid Chromatography*) también ha sido ampliamente utilizada para la separación de

proteínas. La separación se da de acuerdo con la hidrofobicidad y la conformación de las proteínas. Otros beneficios de la RPLC incluyen un alto grado de selectividad y, si se utilizan *buffers* o aditivos volátiles, es considerable la detección posterior por Espectrometría de Masas (Wang, Nagarajan, et al., 2016).

La aplicación de instrumentos de cromatografía líquida en tándem a espectrometría de masas (LC-MS/MS) de nuevas generaciones permitieron el desarrollo de la cuantificación de proteínas y péptidos seleccionados. La UHPLC permite la separación de muestras complejas a flujos que pueden estar comprendidos entre nl/min y ml/min, con la elección de una columna adecuada. Para la fase móvil se deben utilizar soluciones acuosas en mezclas con solventes orgánicos (acetonitrilo, metanol, 2-propanol) más un aditivo, por ejemplo, el ácido trifluoroacético (TFA) favorece la separación cromatográfica, aunque por encima de 0,02% v/v suele generar en ionización positiva una muy importante supresión iónica; también ácidos orgánicos como ácido acético y ácido fórmico (0,01-0,5% v/v) que actúan como donantes de protones. Se aplica alto voltaje al eluido de la columna, formando una niebla por adición de nitrógeno (nebulización). Las gotas cargadas disminuyen su tamaño gradualmente hasta provocar la evaporación de iones. Los iones son separados por tamaño dentro del analizador y, al alcanzar el detector, los iones son contados (Figura 18).

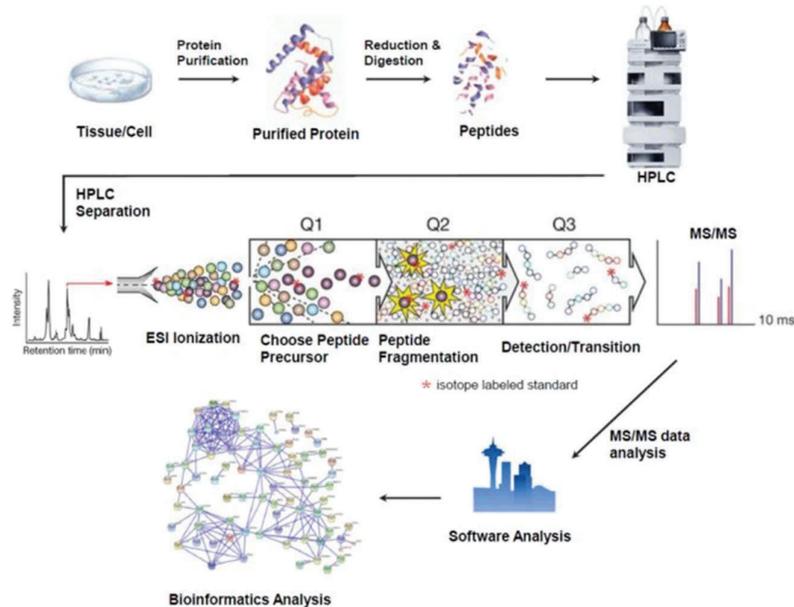


Figura 18. Representación esquemática del análisis mediante cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS). El proceso incluye, a grandes rasgos, la preparación de la muestra, la separación de los compuestos mediante cromatografía líquida, y la detección e identificación de iones específicos usando Espectrometría de Masas. Mediante esta metodología se puede cuantificar y caracterizar de manera precisa una amplia gama de compuestos en diversas matrices biológicas y químicas (fuente: Biorenders).

El concepto principal es que las proteínas, luego de una digestión proteolítica o no – dependiendo de su tamaño molecular-, se pueden cuantificar a través de la medida de sus péptidos constituyentes. La adquisición de datos solo para los péptidos seleccionados permite medidas con una alta precisión, sensibilidad y rendimiento. La cuantificación de proteínas mediante la selección de estos péptidos característicos permitió un gran avance en los análisis de proteomas mediante MS. Estos ensayos ofrecen dos ventajas con respecto a los inmunoensayos: la primera es la habilidad de configurar sistemáticamente un ensayo específico para esencialmente cualquier proteína sin la necesidad de un anticuerpo y la segunda es la capacidad de estos ensayos basados en MS de realizar análisis de muchos péptidos a la vez en un único análisis. Los estudios de proteínas basados en sus péptidos se pueden realizar a gran escala en análisis proteómicos cuantitativos y se ha encontrado una amplia aplicación en el desarrollo sistemático de ensayos para estudios de validación de biomarcadores de proteínas (Liebler & Zimmerman, 2013).

En un instrumento de MS que opera en tándem, cada ion peptídico sufre su fragmentación para producir iones series b- e y- característicos (Figura 19), que son los fragmentos que contienen el N- y C- terminal respectivamente. La combinación de iones peptídicos intactos (precursores) y sus resultantes fragmentaciones características comprenden transiciones que son específicas para el monitoreo de la secuencia del péptido. Aunque cualquier transición precursor-producto puede arrojar múltiples secuencias peptídicas, la coocurrencia de múltiples transiciones de este tipo implican que la secuencia del péptido en estudio posee una alta especificidad. La detección de péptidos mediante señales creadas por este tipo de transiciones se denomina Monitoreo de Reacción Seleccionada (SRM, por *selected reaction monitoring*) o Monitoreo de Múltiples Reacciones (MRM, por *mutiple reaction monitoring*). En métodos que usan UHPLC-MSMS en los que las transiciones MRM se monitorean durante una elución a un

tiempo específico para un péptido, cientos de péptidos representando docenas de proteínas pueden medirse en un solo análisis. Esta capacidad de análisis múltiples permite medidas sistemáticas de múltiples proteínas y sus metabolismos, una tarea que resultaría muy cara y engorrosa si se analizara mediante un Western Blot.

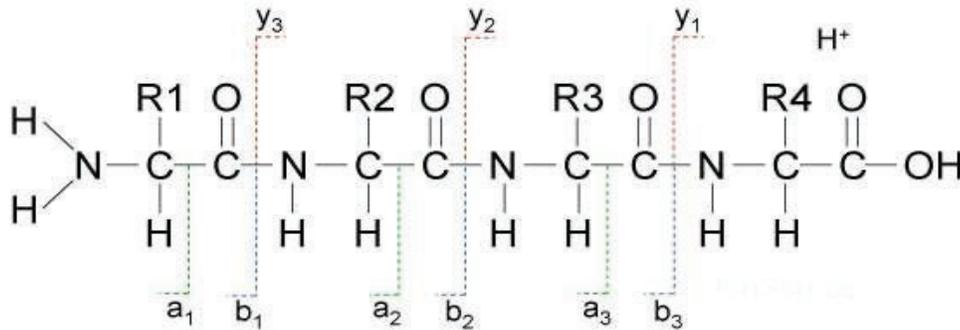


Figura 19. Representación esquemática de los iones serie b y serie y. Los iones serie b se generan cuando el enlace peptídico se rompe en el extremo N-terminal. Estos iones son útiles para determinar las primeras partes de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los iones serie y son fragmentos que resultan cuando el enlace peptídico se rompe en el extremo C-terminal. Estos iones conservan el extremo C-terminal del péptido y son útiles para deducir la secuencia de aminoácidos desde el extremo carboxilo (fuente: https://www.echemi.com/community/are-both-b-and-y-ions-required-to-determine-the-sequence-of-a-protein-by-mass-spectrometry_mjart2205232575_501.html).

La naturaleza del “no escaneo” del espectro total en este modo operativo se traduce en un incremento en la sensibilidad de 1 o 2 órdenes de magnitud en comparación a las técnicas convencionales de escaneo completo. Además, resulta en una respuesta lineal sobre un amplio rango dinámico de más de 5 órdenes de magnitud. Esto permite detectar proteínas poco abundantes en muestras muy complejas, lo cual es crucial en estudios cuantitativos sistemáticos (Lange et al., 2008).

1.3- MRM y cuantificación de péptidos y proteínas

La Espectrometría de Masas, en conjunto con una apropiada preparación de muestra y técnicas de separación, posee la habilidad de analizar muestras complejas y de proveer información de calidad a un nivel superior que no puede ser alcanzado por métodos de cuantificación establecidos, como son los Western Blot o ELISA. Esta capacidad de

identificar y cuantificar proteínas evade la necesidad de generar anticuerpos de alta calidad para su detección.

La espectrometría de masas se ha convertido en un método moderno para la cuantificación de proteínas. Provee la habilidad de medir cientos de proteínas y de modificaciones postraduccionales en paralelo. Se obtiene una gran cantidad de información cualitativa y cuantitativa de proteínas. Por lo tanto, es fundamental poseer un software apropiado para el análisis.

El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo es ampliamente utilizado para moléculas pequeñas y cuantificación de proteínas. Las proteínas se digieren en sus péptidos constituyentes que representan a la proteína de interés, previo a su análisis. Con el monitoreo de reacciones múltiples (MRM), se pueden seleccionar iones precursores específicos para fragmentarse en iones productos únicos del analito de interés. El MRM incrementa de manera significativa el radio señal/ruido, alcanzando niveles muy altos de sensibilidad para la cuantificación. Los beneficios del sistema de análisis por cuadrupolos incluyen: buena reproducibilidad, relativamente bajo costo y permite el desarrollo de un método específico para el ion precursor seleccionado.

La metodología MRM, en su aplicación más difundida, se basa en la digestión química o enzimática de extractos proteicos conteniendo una serie de proteínas de interés cuya secuencia es conocida (Liebler and Zimmerman 2013; Lange et al. 2008). A partir de la estructura primaria pueden deducirse los péptidos formados luego de la digestión enzimática de la proteína de interés. Siguiendo algunos criterios basados en la especificidad de secuencia de los péptidos y su posible estabilidad, pueden seleccionarse para su estudio mediante Espectrometría de Masas a algunos de ellos, denominados péptidos proteotípicos. Algunos de estos criterios incluyen el largo esperado de su secuencia (5 a 25 aminoácidos), la presencia o ausencia de sitios de modificación postraduccionales (según fuera importante para el análisis posterior), su vínculo con isoformas de la proteína, su estabilidad, la presencia de residuos frecuentemente susceptibles a modificaciones durante su procesamiento (metionina, asparagina, etc), entre otros. Las muestras digeridas son sometidas a una resolución de sus péptidos constituyentes mediante técnicas cromatográficas y, a continuación, los eluatos son

analizados por espectrometría de masas. Los espectrómetros empleados necesariamente deben poseer analizadores en tándem. La primera sección del analizador (en este trabajo fue un cuadrupolo) se emplea para seleccionar condiciones electromagnéticas tales que solamente sean estables las trayectorias de el/los péptidos proteotípicos previamente seleccionados. En la sección siguiente del analizador (cámara de colisión), la presencia de un gas noble (Argón) junto con la aceleración con la aplicación de un potencial eléctrico, genera colisiones que aumentan la energía vibracional de los péptidos y su fragmentación (Figura 20). Los fragmentos se analizan en la tercera sección del tubo (en este caso, de nuevo un cuadrupolo), registrando así la intensidad de señal observada para cada masa/carga (espectro de masas). La fragmentación es habitualmente llamada transición. Dentro de las transiciones observadas se seleccionan alguna/as en función de criterios selectividad y sensibilidad. En general, aunque existen herramientas y criterios teóricos para seleccionar las transiciones, se suelen determinar empíricamente. En el caso de analizadores de triple cuadrupolo como el que se utilizó en esta tesis, se prefiere el empleo de iones de la serie “y” con valores de masa/carga mayores a los del precursor y alta señal (para minimizar el “ruido” ocasionado por interferencias). En base a la selección realizada de péptidos proteotípicos y transiciones (deseable tres o más por péptido), se procede luego a confeccionar curvas de calibración con muestras conteniendo cantidades conocidas de la proteína de interés. Para ello, la primera y tercera sección del analizador son usadas como selectores, estabilizando solamente la trayectoria en el tubo para los iones de relación masa/carga seleccionadas. Esta estrategia permite alcanzar niveles de sensibilidad y selectividad significativamente superiores a la mayor parte de los abordajes alternativos.

Recientemente, algunos autores proponen emplear una alternativa similar de MRM en la cual los precursores y transiciones son establecidos sobre muestras sin digerir de las proteínas en forma empírica (Wang, Combe, et al., 2016). La sencillez operativa de este abordaje resulta sumamente útil, en especial para proteínas de bajo PM.

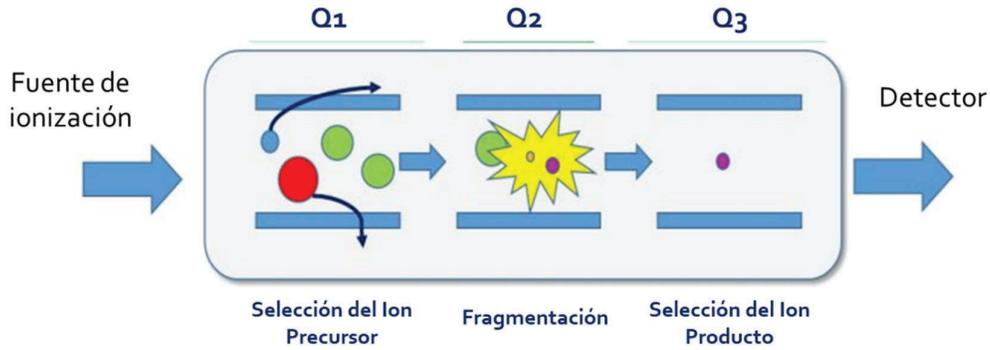


Figura 20. Diagrama de Espectrometría de Masas en triple cuadrupolo (fuente: elaboración propia).

Objetivos

Objetivos generales:

Desarrollar una herramienta analítica sensible y rápida para la cuantificación de proteínas.

Objetivos específicos:

- Obtener y analizar experimentalmente los iones mayoritarios (m/z) de las proteínas anteriormente expresadas y purificadas: Stx2B y EspA. Seleccionar esos iones como precursores y optimizar sus condiciones de fragmentación, de manera de obtener partículas características de cada proteína.
- Optimizar técnicas integradas de HPLC/MS para resolver, detectar e identificar factores de virulencia de cepas STEC, inicialmente en muestras purificadas con la perspectiva de aplicarlo sobre extractos proteicos complejos.
- Poner a punto una técnica de cuantificación basada en Espectrometría de Masas (MRM) de las proteínas de interés descritas anteriormente, sin el paso de digestión enzimática.

2 - Materiales y métodos

Proteínas recombinantes y reactivos

Se analizaron las proteínas recombinantes Stx2B y EspA purificadas en la primera parte de esta tesis. Las mismas se encontraban almacenadas a -80°C, cuantificadas mediante la técnica de Bradford y en solventes adecuados para su análisis por Espectrometría de Masas, ya sea acetonitrilo, metanol + ácido fórmico y/o ácido trifluoroacético, todos los reactivos de calidad HPLC-MS.

Preparación de muestras

Preparación de muestras asistida por filtros (FASP). Los extractos proteicos fueron clarificados mediante su centrifugación a 13.000 G, 4°C por 15 minutos (Universal Zentrifugen 320 R, Hettich, Alemania) y posteriormente filtradas mediante cápsulas filtrantes para jeringa con membranas de celulosa regenerada y 0.22 µm de poro (Minisart RC, Sartorius, Alemania). Las muestras clarificadas fueron luego tratadas siguiendo la técnica denominada FASP. Brevemente, de 2 a 5 ml de muestra conteniendo entre 500 µg y 1 mg de proteínas totales fueron depositados en un tubo de ultrafiltración centrífuga provistos de una membrana de 10 kDa de tamaño de corte molecular (MWCO, Vivaspin 15, Sartorius, Alemania) y centrifugados a temperatura ambiente a 10.000 G hasta alcanzar una concentración de 10 veces el volumen inicial. A continuación el material concentrado se diluyó diez veces con una mezcla agua:acetonitrilo:ácido fórmico en proporción 98 : 2 : 0,1 y se repitió el paso de concentración. mediante el uso de ultrafiltros de 10 kDa de tamaño de corte molecular (MWCO). Luego de esta etapa las muestras concentradas se transfirieron a un nuevo tubo y conservaron a -80°C hasta su uso.

Extracción en Fase Sólida (SPE). Muestras seleccionadas entre aquellas pretratadas mediante la técnica FASP fueron sometidas a una etapa adicional de remoción de

interferentes basándose en los principios de las metodologías denominadas SPE. En nuestro caso el tratamiento de las muestras se realizó basado en la modalidad de interacción en fase reversa utilizando para ello una columna de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) de escala micro conectada a un equipo de cromatografía líquida según se detalla a continuación. El cromatógrafo líquido utilizado es una versión modificada de un equipo original de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un espectrómetro de masas (LC-MS 8030, Shimadzu, Japón) que se ha modificado reemplazando las bombas de solvente originales (LC-20AD) por bombas de mayor presión límite de trabajo (LC-40D XR, Shimadzu, Japón) y adicionando un detector UV en línea (SPD-20A UFLC, Shimadzu, Japón). La columna de UPLC empleada para el tratamiento poseía 2,1 mm de diámetro y 100 mm de largo, conteniendo en su relleno una fase estacionaria compuesta por partículas de sílica de 1,7 μm de diámetro, 130 Å de tamaño de poro, con ligandos octadecilo (C18) cuyos grupos silanoles libres se encontraban bloqueados por híbridos de etileno conectados por puentes (BEH) (Acquity UPLC BEH C18, Waters, Irlanda). El pretratamiento se inició mediante una fase de equilibración de la columna con 10 volúmenes de buffer de alta polaridad (mezcla agua:acetonitrilo:ácido fórmico en proporción 98:2:0,1), seguida de la inyección de 30 μl de muestra, manteniendo constante el flujo en 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, y continuando luego con un paso de lavado con el mismo solvente durante 3 volúmenes de columna. A continuación, las proteínas adsorbidas a la columna fueron eluidas mediante un cambio brusco de solvente a uno de menor polaridad (agua:acetonitrilo:ácido fórmico en proporción 1,5:98:0,5), manteniendo el mismo flujo de trabajo, durante 10 volúmenes de columna. Los picos cromatográficos (registrados por su absorción de luz de a 280 nm de longitud de onda) fueron colectados y conservados a -80°C hasta su uso.

Precipitación con solventes orgánicos. Para este pretratamiento se empleó una precipitación selectiva de componentes proteicos mediante el uso de una mezcla cloformo:agua:metanol y posterior resuspensión de estos en ácido fórmico a bajas temperaturas. Brevemente, a 100 μl de muestra se les adicionaron sucesivamente 400 μl de metanol, 100 μl de cloroformo y 300 μl de agua, agitando brevemente luego de cada adición. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 minutos a 14.000 G, separando y descartando luego la fase superior. A continuación, se adicionaron

400 µl de metanol sobre la fase inferior, se repitió la centrifugación, descartándose el sobrenadante. Los tubos conteniendo los pellets proteicos se enfriaron durante 15 minutos en un baño de agua-hielo y luego se procedió a la resuspensión de estos mediante la adición de 25 µl de una solución pre enfriada a -20°C de ácido fórmico (FA) al 80% v/v en agua, incubando durante 1 hora a -20°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 5 µl de la resuspensión anterior, se depositaron en un nuevo tubo y se les adicionó una mezcla agua:acetonitrilo en proporción 98:2 hasta alcanzar un volumen final de 1000 µl, conservándose hasta su uso a -80°C.

Escaneo de iones multicargados

El escaneo del contenido en iones multicargados por espectrometría de masas se realizó empleando un analizador de tipo Triple Cuadrupolo (LC-MS 8030, Shimadzu, Japón), conectado a un generador de nitrógeno (NM32LA, Peak, Irlanda), inyectando la muestra a la interfaz de ionización a través del módulo de cromatografía líquida del equipo a diferentes flujos, entre 50 µl/min y 200 µl/min. La temperatura en el block ESI utilizada fue de 400°C, la temperatura de la línea de desolvatación en 250°C, el flujo de gas de secado (Nitrógeno) en 20 l/min y la modalidad de trabajo en modo positivo. El escaneo de iones se realizó programando una rampa en el tercer cuadrupolo del equipo (Q3 scan) entre 500 y 200 unidades de masa aparente en un periodo de tiempo de 1 segundo por evento de estas rampas (escaneo de 1578 unidades de masa aparente por segundo).

Deconvolución

La deconvolución de iones multicargados a partir de los espectros de masas obtenidos en modo Q3 scan se realizó a utilizando el *software* Multi-charge E (Shimadzu, Japón), considerando para la generación de carga a la formación de aductos con protones, asignando a la masa del protón 1,00728 Da, utilizando una tolerancia de 0,2 Da, el

número de cargas para la búsqueda entre 1 y 40 y utilizando para el cálculo solamente aquellos iones que fueran estimados a través de un mínimo de 2 picos del espectro de masas.

Resolución por UPLC en Fase Reversa

El cromatógrafo líquido y columnas empleados fueron los mismos que para el pretratamiento por SPE. La columna fue equilibrada en al menos 10 volúmenes de columna (4 ml) de buffer A (mezcla agua:acetonitrilo:ácido fórmico en proporción 98:2:0,1). A continuación, se inyectaron 10 µl de muestra en paralelo con el inicio de un gradiente de 50 minutos de 0 a 100 % de buffer B (agua:acetonitrilo:ácido fórmico en proporción 1,5:98:0,5). El flujo se mantuvo constante durante toda la corrida (50 µl/min) mientras que se evaluaron diferentes temperaturas (40, 60 y 80°C). Al final del gradiente se pasaron 10 volúmenes de columna de buffer B, reequilibrando a continuación con un 100% de buffer A la columna para el inicio de una nueva corrida cromatográfica. Durante toda la corrida se registró la absorbancia de luz de 280 nm del eluato. A su vez, a partir de la inyección la línea de salida de la columna se conectó en serie con la cámara de ionización ESI del analizador de masas de triple cuadrupolo, la cual se operó en las condiciones de temperatura y desolvatación neumático asistida descritas en secciones previas. El analizador de masas se operó en modo positivo, realizando los siguientes análisis sobre los iones ingresantes al analizador en tiempos equivalentes de 100 mseg cada uno de ellos. En el primer bloque de tiempo se efectuó un análisis de iones multicargados efectuando una rampa en el tercer cuadrupolo de escaneo de iones entre 500 y 2000 unidades de masa aparente. En el segundo bloque de tiempo se procedió bajo la modalidad de monitoreo de reacciones (SRM), seleccionando como ion precursor en el primer cuadrupolo al ion de masa aparente 889 (+/- 1 m/z), el cual se dirigió a la cámara de colisión, la cual se encontraba presurizada con Argón a 110 kPa y utilizando una energía de colisión de -35 eV durante el paso de los iones a través de ella. Las condiciones de operación del tercer cuadrupolo se fijaron de manera tal de estabilizar preferencialmente la trayectoria del ion de masa aparente 1122 (+/- 0.3 m/z). El tercer

bloque de tiempo se operó también bajo modalidad SRM, utilizando el mismo ion precursor y condiciones de fragmentación en la cámara de colisiones, pero el tercer cuadrupolo se operó de manera tal de monitorear al ion producto de 1159 unidades de masa aparente. Finalmente, el cuarto bloque se operó de manera tal de determinar los iones residuales sin fragmentar de los seleccionados en el primer cuadrupolo, esto es, repitiendo las condiciones de selección precursores y fragmentación descritas para el segundo y tercer bloque, pero monitoreando en el tercer cuadrupolo al ión de 889 unidades de masa aparente. El registro de los espectros cromatográficos y de masas se realizó a través del software LabSolutions (Shimadzu, Japón). La cuantificación de los diferentes picos espectrales se efectuó en forma automática, con corrección automática de línea de base y suavizado automático de curvas mediante el filtro de Savitzky-Golay.

Estimación de límites de detección y cuantificación

Para la estimación de los parámetros de linealidad y potencial aplicación al desarrollo de una metodología analítica cuantitativa basada en espectrometría de masas de los resultados alcanzados se siguieron las recomendaciones y criterios del Consejo Internacional de Armonización (ICH) en su documento sobre validaciones de procedimientos analíticos. Brevemente, se realizó un análisis inicial de regiones de linealidad en la relación entre las áreas en los espectros de masas para los picos correspondientes a cada una de las transiciones analizadas (expresada en cuentas) en función de la concentración de proteína recombinante presente en las muestras, mediante su representación gráfica. A continuación, se calcularon los parámetros correspondientes a la recta que mejor ajuste la dependencia lineal entre las variables experimentales anteriores empleando un análisis de regresión siguiendo la metodología de cuadrados mínimos empleando asistidos por software (Excel, Microsoft, EEUU). A partir de los estimadores del punto de intersección de la recta al eje de las abscisas de dos ensayos independientes se estimó la desviación estándar de la ordenada al origen (SD) y se calculó el valor medio de la pendiente de las rectas calculadas en ambos

ensayos (S). Ambos valores fueron utilizados para el cálculo del Límite de Detección (LD) y el Límite de Cuantificación (LC), de acuerdo con las siguientes relaciones:

$$LC = 3.3 * D / S \text{ y } LD = 10 * D / S$$

Donde D es la dispersión de los datos y S es la pendiente de la recta calculada en la regresión lineal.

Representación gráfica

La representación gráfica de los datos experimentales fue realizada exportando los valores originales como archivos de valores separados por comas (.csv) o Excel (.xls ó .xlsx) y luego procesándolos mediante el software Excel (Microsoft, EEUU) o alternativamente utilizando los paquetes ggplot2 y cowplot del software R.

3- Resultados y discusión

3.1- Versión recombinante de la subunidad B de la Toxina Shiga 2 (rStx2B)

Se tomó una muestra una muestra purificada de rStx2B y se efectuó un cambio del medio en el que esta se encontraba mediante la técnica denominada filtración asistida por filtros (FASP), utilizando una mezcla compatible con espectrometría de masas ESI (agua:acetonitrilo:ácido fórmico en proporción 98 : 2 : 0,1) como medio de destino. A continuación, se realizó una caracterización inicial de la muestra por inyección directa en la fuente de ionización del espectrómetro de masas bajo una metodología de escaneo de iones multicargados en el rango 500 a 2000 unidades de masa aparente (m/z). Se observó la formación de dos picos en el espectro de masas de la corriente total de iones, siendo la distribución y abundancia de los iones de diferentes valores de m/z similar para ambos picos del espectro obtenido (Figura 21).

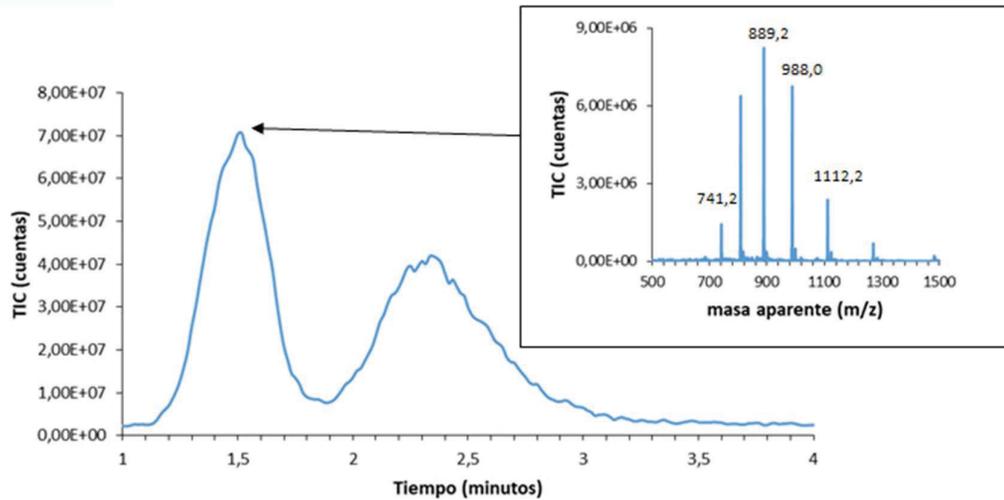


Figura 21. Cromatograma de muestra purificada de stx2B en las condiciones de separación optimizadas establecidas en este trabajo: 1 μ l vol. de inyección, 80 $^{\circ}$ C T oven, ACN:H₂O:AF fase móvil A (2:98:0,1), 30%B, y 200 μ l/min.

A partir de los valores observados en el espectro de distribución de m/z en el valor máximo del primero de los dos picos del espectro de iones totales (Panel recuadrado en la Figura 21) se realizó una deconvolución con el fin de estimar la masa aparente de la proteína rStx2B. Mediante éste pudo estimarse un valor de 8882,13 Da, el cual coincide con el esperado de acuerdo con la secuencia de la proteína expresada, luego de la escisión del péptido señal. A continuación, se dirigió el análisis al establecimiento de condiciones de fragmentación reproducibles para el ion mayoritario de masa aparente 889 m/z, con el fin de seleccionar transiciones útiles para el desarrollo de una técnica analítica cuantitativa basada en el monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Nuevamente, el análisis se realizó mediante inyección directa en la fuente de ionización ESI. Para el escaneo de productos de ionización se seleccionó una condición media de presión de gas en la cámara de colisión (110 kPa). En estos ensayos se compararon los números de iones e intensidad de precursor remanente luego de la fragmentación cuando se emplearon diferentes energías de colisión en la cámara de fragmentación. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 22.

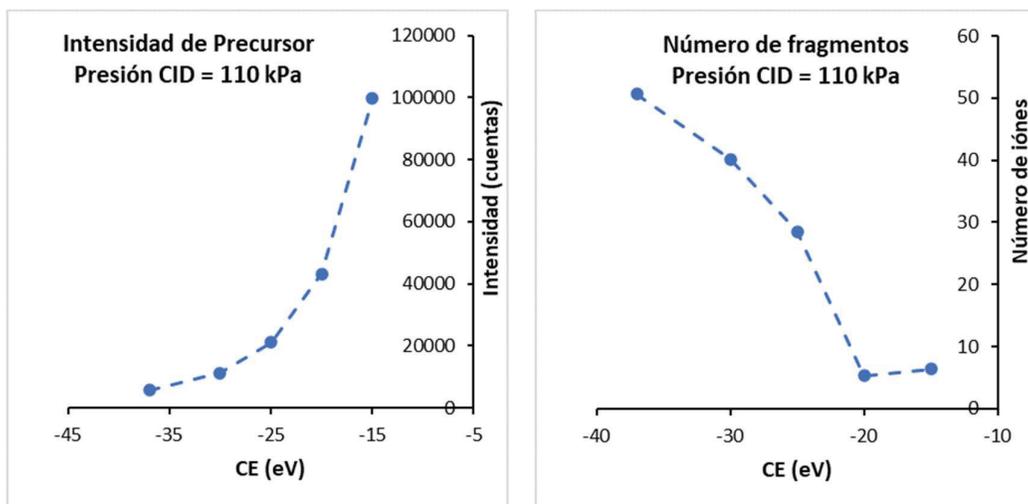


Figura 22. Comparación de número de fragmentos e intensidad de ion precursor remanente luego de la fragmentación al variar le energía de colisión (CE) en el cuadrupolo de fragmentación.

Como puede observarse en la Figura 23, por debajo de los -20 eV se detecta un incremento pronunciado en la ruptura del ion precursor con un aumento paralelo en el número de fragmentos obtenidos a partir de este. Con el fin de evaluar si pudiera obtenerse un número mayor de fragmentos sin un descenso significativo en la intensidad del precursor utilizando condiciones un poco más intensas de fragmentación se elevó levemente la presión (130 kPa) en la celda de colisiones y se incrementó la energía de colisión hasta -40 eV (Figura 23).

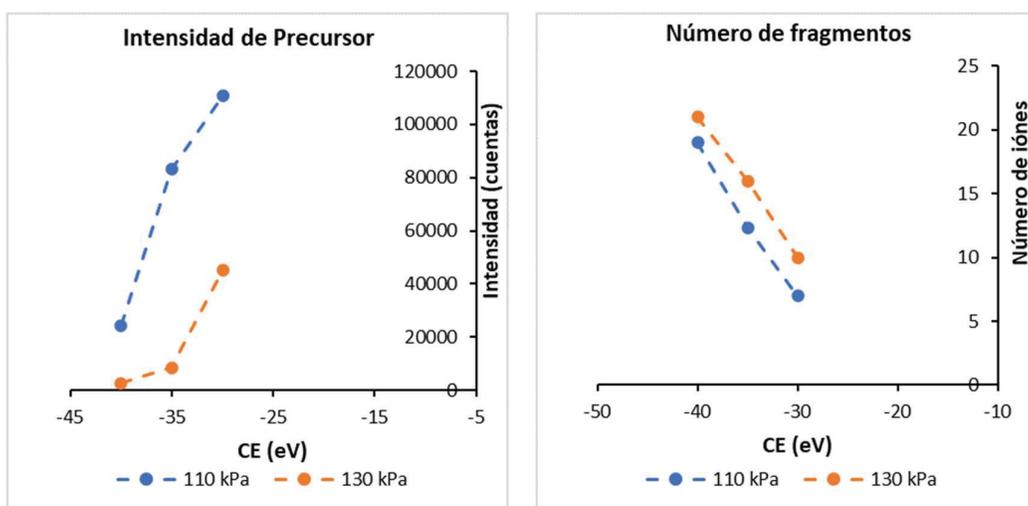


Figura 23. Comparación de número de fragmentos e intensidad de ion precursor remanente luego de la fragmentación al variar le energía de colisión (CE) y la presión de Argón (CID) en el cuadrupolo de fragmentación.

Como puede observarse en la Figura 23, aun cuando se observa un descenso marcado en la intensidad del precursor remanente a 130 kPa respecto a 110 kPa para todas las condiciones de energía de colisión ensayadas, no se observa un incremento paralelo a este en el número de productos iónicos de masa aparente pertenecientes al rango de trabajo seleccionado para el analizador de masas. Por el contrario, al utilizar 110 kPa en la cámara de colisión se observó un fuerte incremento en el número de iones producidos cuando la energía en esta cámara se eleva de -20 a -40 eV. Por lo tanto, se decidió seleccionar la condición 110 kPa de Presión de gas Argón (CID) y -40 para la CE para la búsqueda de transiciones estables mediante el procedimiento denominado escaneo de productos iónicos (PIS). Los resultados observados en tres ensayos independientes se muestran en la Figura 24.

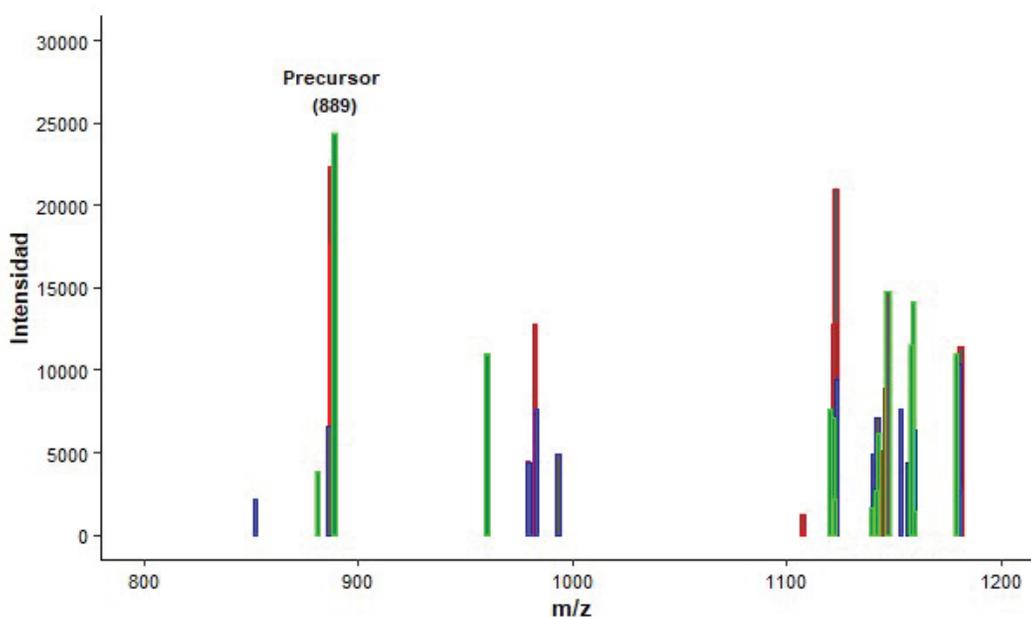


Figura 24. Ensayos de escaneo de ion precursor 889 m/z (PIS). Cada color representa un ensayo diferente.

Analizando los resultados representados en la Figura 24, puede observarse que la región de m/z de 1100 a 1200 presenta picos con intensidad intermedia a alta, tomando como referencia la intensidad del ion precursor. Los picos de esta región poseen mayor complejidad estructural que los de menor masa aparente, y con ello un mayor potencial de corresponder a transiciones específicas del ion precursor. Dentro de los de mayor

intensidad de esta región se seleccionaron los correspondientes a m/z 1122 y 1159, por encontrarse en al menos dos de los tres ensayos realizados.

Habiendo seleccionado las transiciones 889 \rightarrow 1122 y 889 \rightarrow 1159 para su uso en el monitoreo de rStx2B mediante la metodología de MRM, se procedió al desarrollo de una metodología para la resolución cromatográfica de esta proteína en muestras complejas mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) bajo la modalidad de fase reversa. Considerando el efecto dominante de la temperatura tanto sobre la difusión de macromoléculas como sobre las interacciones hidrofóbicas se comparó la resolución de rStx2B realizando las corridas a tres temperaturas diferentes, manteniendo constante el resto de las variables (Figura 25).

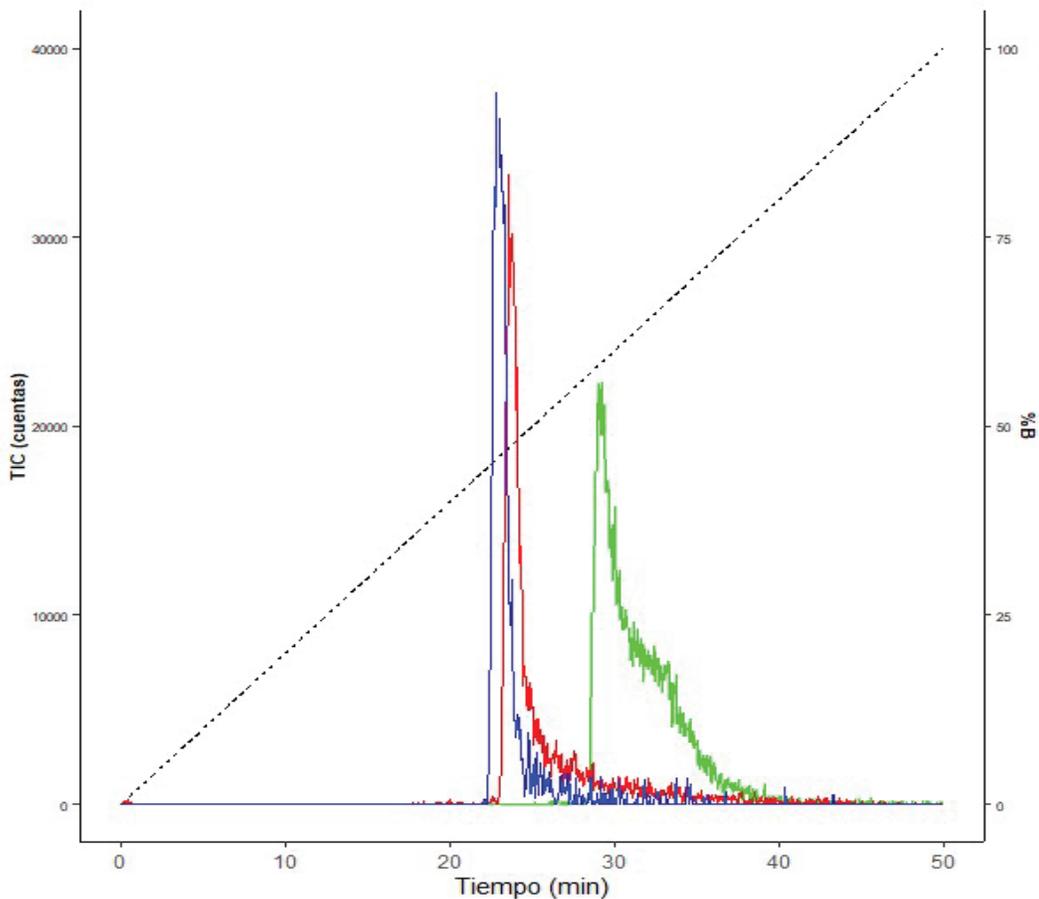


Figura 25. Comparación de la resolución de rStx2B mediante cromatografía líquida de alta resolución a tres temperaturas diferentes: verde 40°C, rojo 60°C y azul 80°C.

Puede concluirse que se observa un incremento en la resolución con el incremento de la temperatura, especialmente marcado en la comparación de 60°C y 80°C respecto a

40°C. Dado que los fabricantes de la columna empleada sugieren evitar el uso de temperaturas superiores a 70°C para prolongar su vida útil, se seleccionó 60°C para continuar con el desarrollo.

A continuación, se realizó una serie de separaciones cromatográficas de muestras de rStx2B de diferente concentración en las condiciones de corrida y de monitoreo de reacciones múltiples optimizadas anteriormente. En la figura 26 se muestran resultados representativos de lo observado experimentalmente.

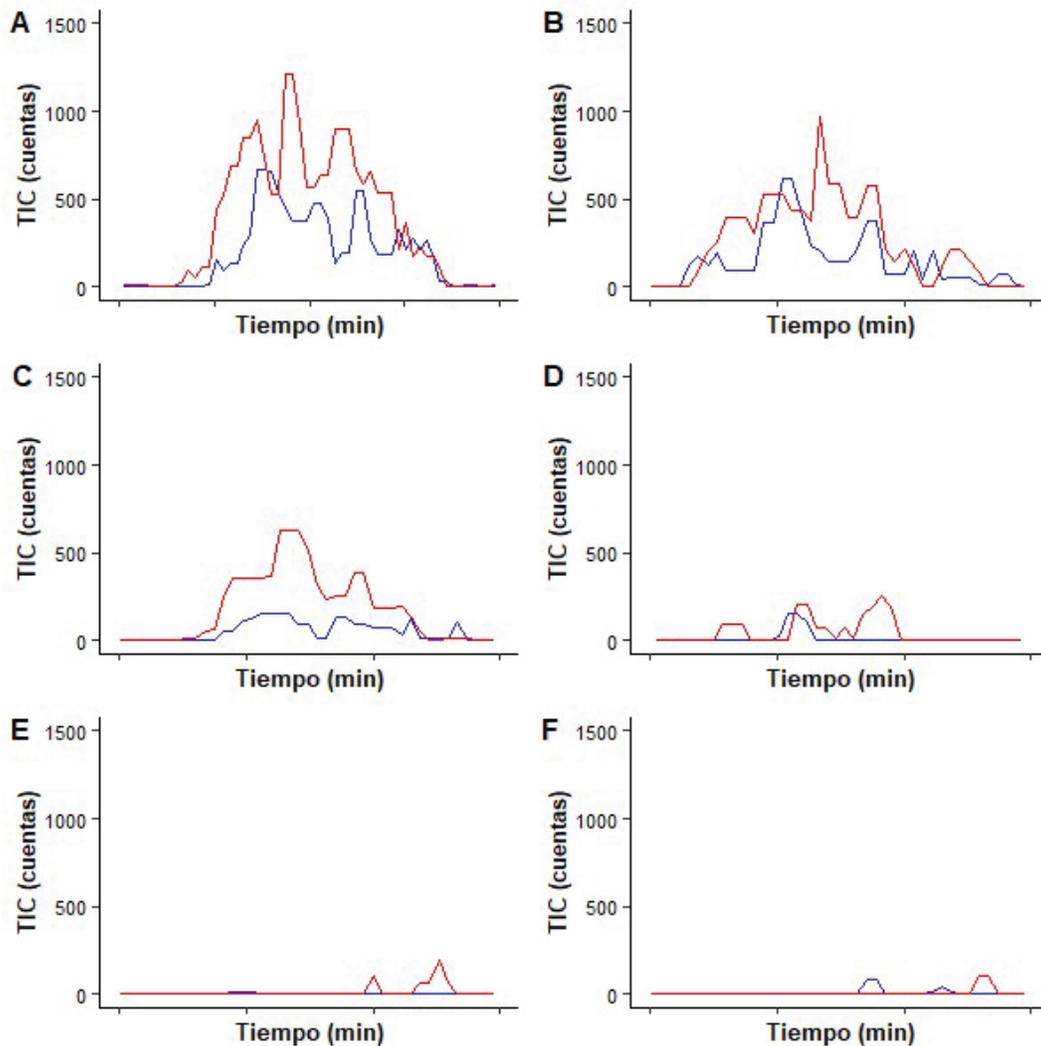


Figura 26. Intensidad de señal registrada para las transiciones seleccionadas, realizando diluciones seriadas de muestra, donde 889→1122 se muestra en rojo y 889→1159 se muestra en azul.

A simple vista, de la Figura 26 se desprende que la intensidad de la señal registrada para ambas transiciones varía en proporción directa con la cantidad de rStx2B inyectada en cada una de las corridas. Este ensayo fue realizado en dos repeticiones independientes, cuyos resultados fueron utilizados para estimar la potencial correlación lineal entre la señal registrada y la cantidad de muestra inyectada (Figura 27).

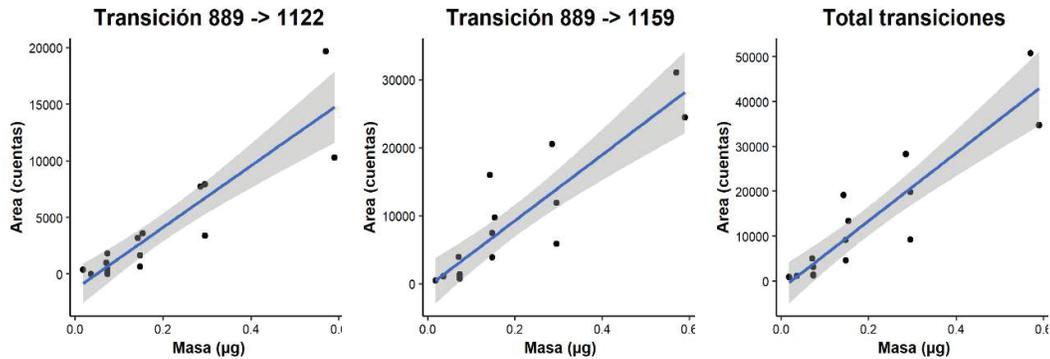


Figura 27. Representación gráfica de la intensidad de señal en función de la masa de proteína inyectada.

En la Figura 27 puede observarse que la transición 889 -> 1159 muestra en promedio un número de cuentas totales mayor que la transición 889 -> 1122 (panel izquierdo de la Figura 27), aunque la dispersión de los puntos a ambos lados de la recta estimada mediante regresión lineal es mayor para la primera de estas transiciones respecto a la segunda.

A partir de los estimadores lineales de las rectas de regresión obtenidas en dos ensayos independientes se procedió al cálculo de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) de la técnica desarrollada. Los resultados se representan en la siguiente tabla:

	889 > 1122	889 > 1159	Total
LD (µg)	0,11	0,30	0,15
LC (µg)	0,34	0,92	0,45

De esta manera se puede concluir que, al menos con el análisis preliminar que se llevó adelante, la transición 889-->1122 es la que presenta la mayor sensibilidad para la detección de rStx2B, bajo las condiciones utilizadas durante el análisis. Estos ensayos

preliminares serán complementados en el futuro utilizando una mayor repetición de muestras (se analizaron solamente dos muestras independientes por punto) y diferentes volúmenes de siembra (se utilizó un único volumen de 1 µl de siembra).

3.2- Versión recombinante de la Proteína Secretada A de *Escherichia coli* (rEspA)

Este factor de virulencia de cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) es obtenido, a diferencia de rStx2B, a partir de cuerpos de inclusión durante su expresión recombinante. La metodología de preparación de muestras que fue utilizada para el caso de rStx2B, denominada Preparación de Muestras Asistida por Filtros (FASP) no produjo resultados aceptables en el caso de rEspA. Las muestras acondicionadas siguiendo esta metodología no generaron señal en el analizador QQQ durante el escaneo de iones (Q3 scan) luego de ser inyectadas directamente en la cámara de inyección, siguiendo el protocolo aplicado previamente a rStx2B. Este tipo de situaciones es debido en la mayor parte de los casos a la presencia de supresores de señal en la muestra. Los supresores de señal son agentes químicos (detergentes, sales, sustancias orgánicas, etc) que por medio de mecanismos variados (incremento de la tensión superficial, apantallamiento de cargas, entre otros) provocan una caída significativa en la señal registrada por el analizador QQQ. Considerando la posibilidad que, dada la diferencia en la metodología de preparación de proteínas recombinantes (rStx2B a partir de sobrenadantes de lisis bacteriana y rEspA a partir de la re suspensión de cuerpos de inclusión), diferencias en sustancias acompañantes en las muestras (las cuales actuarían como supresoras de señal) pudieran ser responsables de los problemas observados en el analizador QQQ. Se colectaron de esta manera dos picos de elución, los cuales fueron inyectados directamente en la cámara de ionización, obteniéndose el siguiente espectro siguiendo la metodología denominada Q3 scan (Figura 28):

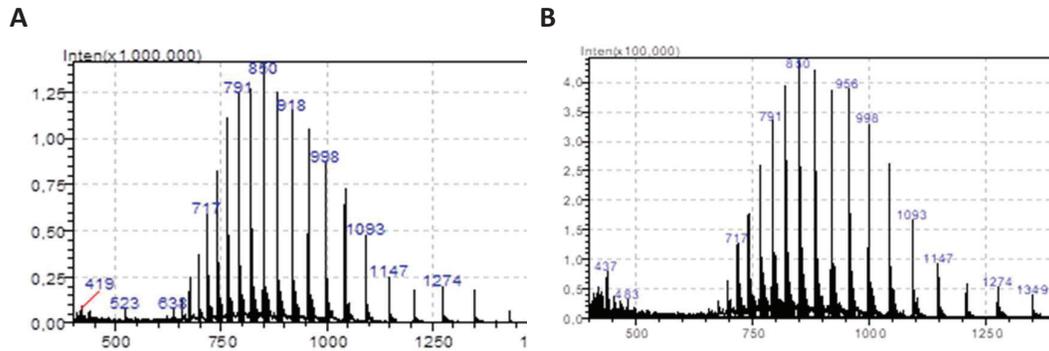


Figura 28. Representación gráfica de la intensidad de cuentas (TIC) en función de las masas aparentes (m/z) registradas durante la inyección directa de los volúmenes de elución recolectados durante el pretratamiento de la muestra por SPE, donde el pico 1 se muestra en el panel A y el pico 2 en el panel B.

Como puede observarse en la Figura anterior, ambos picos cromatográficos se encuentran compuestos por la misma proteína; la única diferencia entre ambos es la intensidad de las señales de m/z registradas para los picos espectrométricos de los diferentes iones multicargados que las componen, siendo estas aproximadamente tres veces más elevadas para el pico cromatográfico 1 (panel A) que para el 2 (panel B). La deconvolución de los picos espectrométricos anteriores de especies multicargadas permitió estimar una masa de 22.924,6 Da para rEspA, cercana a lo esperado de acuerdo con su secuencia (20.532 Da).

Seguir la metodología anterior para el pretratamiento de las muestras hubiese resultado complejo: un paso inicial basado en FASP (preparación de las muestras asistida por filtro) seguido de un paso de SPE (extracción mediante fase sólida) y necesitando luego de un nuevo paso de FASP para acondicionar la muestra a un solvente de alta polaridad para la inyección posterior de la muestra y su análisis cuantitativo, siguiendo la metodología de UHPLC-MS que se busca desarrollar. No obstante, se ha podido confirmar que la ineficiencia de la metodología FASP para el pretratamiento de las muestras se debía a la presencia de supresores de señal posteriormente removidos por la aplicación de un paso de SPE. Luego, se decidió cambiar radicalmente la estrategia de pretratamiento de las muestras basada en la precipitación diferencial con solventes orgánicos.

La concentración de proteínas (0,4 mg/ml) fue determinada por la técnica de Bradford y se procedió a realizar una serie de inyecciones directas en la cámara de ionización de

forma tal de obtener condiciones adecuadas de fragmentación para la selección de transiciones útiles para el desarrollo de una metodología analítica de cuantificación basada en MRM. Para ello, en primer lugar, se realizó un análisis de escaneo de masas siguiendo la técnica de Q3 scan, obteniéndose un perfil acorde con lo esperado para EspA, con una distribución de iones en el perfil de especies multicargadas similar al obtenido mediante la metodología FASP – SPE antes utilizada. En este caso nuevamente el ion de m/z 850.05 resultó uno de los mayoritarios, registrándose una intensidad cercana a un millón de cuentas luego de una inyección de 20 μl de muestra. Luego, se lo seleccionó como ion precursor y se realizaron una serie de estudios de fragmentación utilizando diferentes condiciones de CID y registrando los fragmentos iónicos resultantes por medio un estudio PIS, mediante inyecciones sucesivas de 2 μl de muestra en forma directa en la cámara de ionización. Los resultados obtenidos luego de al menos 3 repeticiones de estos ensayos se representan en la Figura 29.

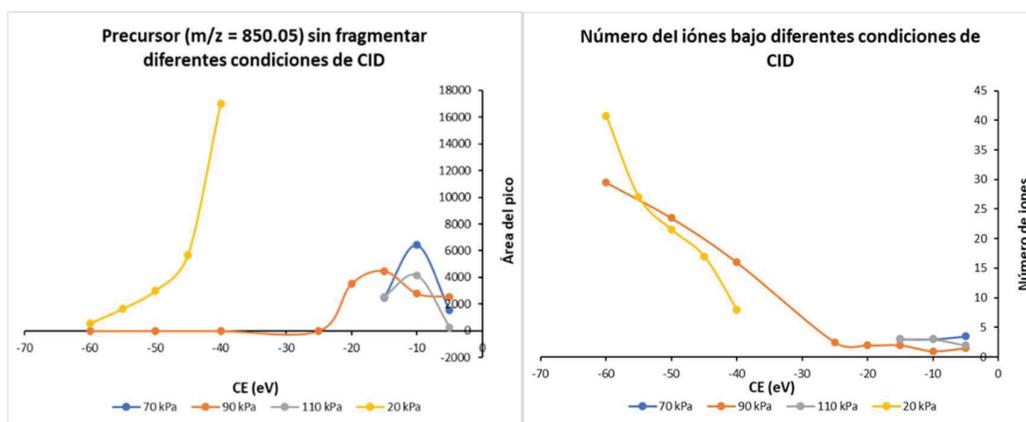


Figura 29. Representación gráfica de los ensayos mediante inyección directa de la muestra de rEspA a diferentes condiciones de presión de Argón (CID) y aumentando la energía de colisión (CE).

Se puede concluir que el ion precursor expuesto a condiciones intermedias de presión de gas Argón en la celda de colisión (de 70 a 110 kPa) pasa de no generar fragmentos registrables en el rango de resolución del equipo (1 a 2000 unidades de m/z) a fragmentarse a CE inferiores a -20 eV. Por lo tanto, se decidió emplear una presión de gas baja durante la CID (20 kPa) e ir disminuyendo progresivamente la CE en el rango -40 a -60 eV para brindar condiciones más suaves de fragmentación. En esta oportunidad, como se observa en la Figura anterior, se alcanzó un número de fragmentos iónicos

comparable con lo anteriormente observado para presiones medias (90 kPa), pero conservando cantidades detectables del ion precursor sin fragmentar. Analizando las frecuencias e intensidades de las transiciones registradas empleando 20 kPa de presión se observó que dos de estas, 850.05 \rightarrow 1095.5 y 850.05 \rightarrow 1182.0, podrían ser consideradas como adecuadas para el desarrollo de una metodología MRM cuando se utilizaron CE en el rango -55 a -60 eV. Luego, se realizó una optimización automática de CE en el rango ya mencionado empleando para esto el módulo correspondiente del software controlador del equipo (LabSolutions® de la firma Shimadzu) obteniéndose los siguientes parámetros optimizados para CID a 20 kPa de presión de Argón en la cámara de colisiones:

Precursor	Producto	Dwell	Q1prebias	CE	Q3 prebias
850,05	1182,0	100	-28 eV	-64 eV	-44 eV
850,05	1095,5	100	-36 eV	-56 eV	-44 eV

Con estas condiciones optimizadas, se procedió a realizar una curva de calibración empleando cantidades conocidas de rEspA purificada y pre-tratada según la metodología antes descrita, mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) y analizadas por MS mediante la metodología de MRM optimizada en la etapa anterior. Además del registro de las dos transiciones anteriores, se sumó un monitoreo del ion precursor en las muestras siguiendo la metodología de Monitoreo de Ion Simple (SIM), en la cual no se aplica energía de colisión (CE) durante el tránsito de este ion por la celda de colisión. Esto se decidió luego de observar que las transiciones seleccionadas presentaban muy baja señal. En la Figura 30 se muestran el cromatograma representativo para el SIM de 850 y su correlación de intensidad en función de la cantidad de muestra inyectada. Como es de esperar, el registro de la especie multicargada mayoritaria de m/z 850.05 se incrementa en forma proporcional conforme aumenta la cantidad de muestra inyectada.

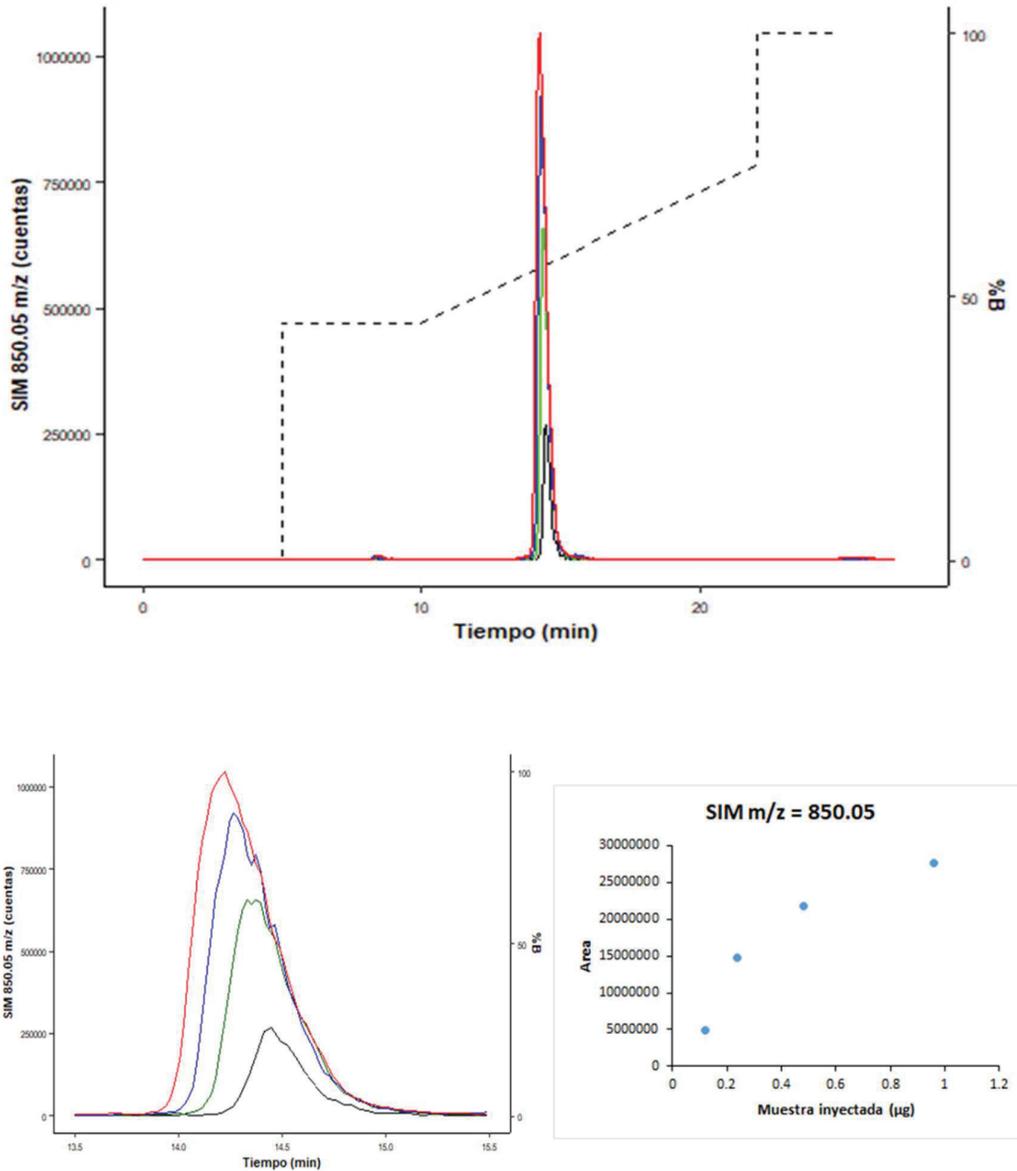


Figura 30. Registro de intensidad de señal del ion 850 m/z en función de tiempo, donde cada color representa una concentración diferente de proteína rEspA (esquema de arriba, amplificado en el esquema de abajo a la izquierda) y gráfica del área de cada una de las curvas en función de los µg de muestra inyectada (gráfica de abajo a la derecha).

Con el fin de analizar en forma preliminar si lo anterior podía ser aplicado a muestras más complejas, se añadió una cantidad conocida de rEspA a una muestra de sobrenadante de cultivo de *E. coli* BL21 pre tratada siguiendo la misma metodología que para rEspA y se analizó por UHPLC-MS una serie de diluciones seriadas de la mezcla, siguiendo SIM para el ion precursor (Figura 31).

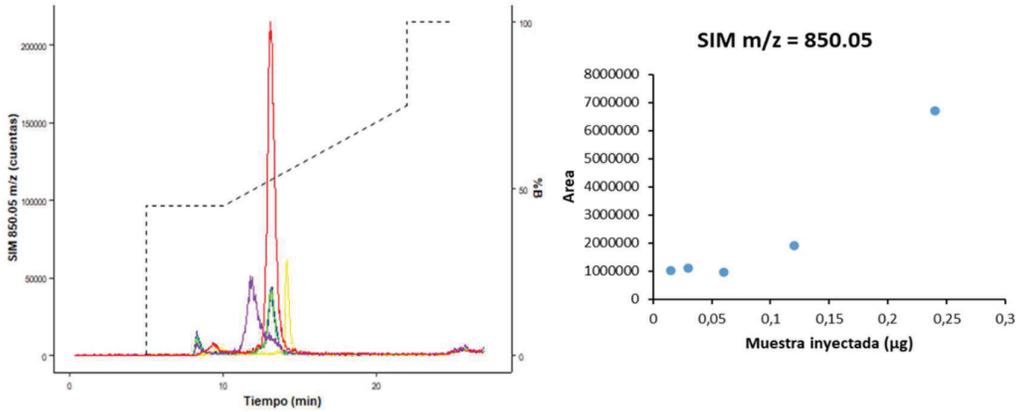


Figura 31. Registro de intensidad de señal del ion 850 m/z en función de tiempo, donde cada color representa una concentración diferente de proteína rEspA, en contexto de sobrenadante de cultivo de *E. coli* (esquema de la izquierda) y gráfica del área de cada una de las curvas en función de los µg de muestra inyectada (gráfica de la derecha).

En este caso se observó que por debajo de aproximadamente 0,1 µg de rEspA se perdería la sensibilidad para la detección específica de rEspA por medio de SIM del ion precursor 850 m/z. Además, los tiempos de retención registrados para el SIM no fueron coincidentes, indicando que no se trataría del ion mayoritario adecuado para la reproducibilidad del ensayo y, por ende, para la versatilidad de la técnica. Estos ensayos preliminares deberán ser por lo tanto complementados en el futuro mediante el estudio de los posibles factores responsables de la baja reproducibilidad observada para poder de esta manera continuar con el desarrollo de la herramienta analítica deseada.

4- Conclusiones

Prácticamente en todas las aplicaciones que requieren análisis de proteínas, las mismas están en matrices complejas que requieren ensayos de precisión razonable para su separación y posterior estudio. En esta segunda parte de la tesis, se evaluaron las dificultades y desafíos asociados a la generación de transiciones reproducibles para MRM sobre dos proteínas intactas de pesos moleculares bajo (Stx2B) y medio (EspA). Aunque la abundancia de fragmentos de baja masa se observaba como un ruido y muchos de los patrones de fragmentación para cada proteína fueron irreproducibles, algunos únicos, estables y reproducibles iones producto generados bajo condiciones moderadas de CID con baja CE, fueron encontrados para las mencionadas proteínas. Se entiende que la extensión de esta aproximación a proteínas de mayor masa es factible, asumiendo que la incidencia de iones proteicos con carga múltiple es visible en el rango de masa limitado que posee el triple cuadrupolo.

Para cuantificar proteínas enteras, es necesario identificar y optimizar al menos dos iones de fragmentos de proteínas estables y reproducibles. Uno de los iones del producto se utilizará como transición principal para el análisis cuantitativo y el otro como señal confirmatoria de soporte. Este método resulta rápido y sensible y evita el tedioso paso previo de una digestión enzimática. Además, al cuantificar las proteínas intactas, es más sencillo el estudio de las eficiencias de ionización y el potencial de efectos e interferencias de las matrices biológicas, lo cual se puede aplicar en análisis de producción de estándares proteicos, en fermentaciones, en purificaciones, etc.

En este estudio se analizaron preliminarmente los efectos de una matriz biológica en la cuantificación, es decir, se utilizaron cantidades conocidas de proteína para construir curvas de calibración. Es necesario continuar con los estudios de la prevalencia de efectos de matriz e identificarlos según la naturaleza de estas, en contextos de proteína de interés sin cuantificar previamente.

Conclusiones generales

En este trabajo de tesis se han evaluado dos grupos de técnicas para el análisis de la expresión de proteínas recombinantes: inicialmente metodologías basadas en el reconocimiento inespecífico antígeno-anticuerpo y posteriormente en técnicas basadas en la Espectrometría de Masas. En paralelo, se han optimizado las condiciones de expresión y purificación de las proteínas recombinantes EspA, Intimina y Stx2B, de interés tanto con fines diagnósticos como para la investigación y desarrollo de candidatos vacunales para combatir la diseminación del principal patógeno responsable del SUH en humanos de sus reservorios animales.

En el marco de este trabajo de tesis se ha observado que la implementación de una herramienta analítica basada en cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de Masas representó un avance significativo en la cuantificación de proteínas de peso molecular bajo a mediano, manteniendo la estructura intacta de estas moléculas durante el análisis. La optimización de las condiciones de separación por LC y las técnicas basadas en MS, como el monitoreo de reacciones múltiples (MRM), permitieron establecer métodos precisos y reproducibles para la detección y cuantificación de las proteínas de interés.

Este trabajo no solo aporta una metodología de detección y cuantificación aplicable a muestras más complejas, sino que también se destaca por su potencial como herramienta de control en laboratorios de referencia a nivel nacional, como el Instituto Nacional de Producción de Biológicos de la ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

En resumen, esta tesis representa un avance importante para el laboratorio en el cual fue realizada, permitiendo la incorporación a éste de herramientas analíticas para el análisis cuali-cuantitativo de la composición en proteínas seleccionadas dentro de diferentes extractos proteicos provenientes, mediante una metodología sencilla, rápida y específica. Las técnicas y protocolos desarrollados se encuentran disponibles para proyectos asociados con las proteínas analizadas en este trabajo de tesis y para otros desarrollos en curso.

- A D O'Brien, R. K. H. (1987). Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev*.
- Allen, K. J., Rogan, D., Brett Finlay, B., Potter, A. A., & Asper, D. J. (2011). Vaccination with type III secreted proteins leads to decreased shedding in calves after experimental infection with *Escherichia coli* O157. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(2).
- Allen, S. E., Boerlin, P., Janecko, N., Lumsden, J. S., Barker, I. K., Pear, D. L., Reid-Smith, R. J., & Jardine, C. (2011). Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in Southern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.01111-10>
- Antman, J., G. L., P. L. y R. M. (n.d.). *Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en Argentina, 2010-2013*.
- Biscola, F. T., Abe, C. M., & Guth, B. E. C. (2011). Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7). <https://doi.org/10.1128/AEM.01920-10>
- Bruins, A. P., Henion, J. D., & Covey, T. R. (1987). Ion Spray Interface for Combined Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 59(22). <https://doi.org/10.1021/ac00149a003>
- Brusa, V., Aliverti, V., Aliverti, F., Ortega, E. E., de la Torre, J. H., Linares, L. H., Sanz, M. E., Etcheverría, A. I., Padola, N. L., Galli, L., García, P. P., Copes, J., & Leotta, G. A. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(JAN). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00171>
- Castillo, A., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2005). A genomic population genetics analysis of the pathogenic enterocyte effacement island in *Escherichia coli*: The search for the unit of selection. www.bioweb.pasteur.fr/seganal/interfaces/codonw.html,
- Cecil, J. D., Sirisaengtaksin, N., O'Brien-Simpson, N. M., & Krachler, A. M. (2019). Outer Membrane Vesicle-Host Cell Interactions. *Microbiology Spectrum*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.psib-0001-2018>
- Chinen, I., Otero, J. L., Miliwebsky, E. S., Roldán, M. L., Baschkier, A., Chillemi, G. M., Nóboli, C., Frizzo, L., & Rivas, M. (2003). Isolation and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from calves in Argentina. *Research in Veterinary Science*, 74(3). [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00192-3](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00192-3)
- Cottrell, J. S. (1994). Protein identification by peptide mass fingerprinting. In *Peptide Research* (Vol. 7, Issue 3). <https://doi.org/10.1533/9781908818058.185>

- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 26, Issue 4, pp. 822–880). <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Cull, C. A., Paddock, Z. D., Nagaraja, T. G., Bello, N. M., Babcock, A. H., & Renter, D. G. (2012). Efficacy of a vaccine and a direct-fed microbial against fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a randomized pen-level field trial of commercial feedlot cattle. *Vaccine*, 30(43). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.080>
- Dean-Nystrom, E. A., Gansheroff, L. J., Mills, M., Moon, H. W., & O'Brien, A. D. (2002). Vaccination of pregnant dams with intiminO157 protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infection and Immunity*, 70(5). <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2414-2418.2002>
- Donnenberg, M. S., Tzipori, S., McKee, M. L., O'Brien, A. D., Alroy, J., & Kaper, J. B. (1993). The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *Journal of Clinical Investigation*, 92(3). <https://doi.org/10.1172/JCI116718>
- Dziva, F., Vlisidou, I., Crepin, V. F., Wallis, T. S., Frankel, G., & Stevens, M. P. (2007). Vaccination of calves with EspA, a key colonisation factor of *Escherichia coli* O157:H7, induces antigen-specific humoral responses but does not confer protection against intestinal colonisation. *Veterinary Microbiology*, 123(1–3). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.016>
- Eppinger, M., Almería, S., Allué-Guardia, A., Bagi, L. K., Kalalah, A. A., Gurtler, J. B., & Fratamico, P. M. (2022). Genome Sequence Analysis and Characterization of Shiga Toxin 2 Production by *Escherichia coli* O157:H7 Strains Associated With a Laboratory Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.888568>
- Farfan, M. J., & Torres, A. G. (2012). Molecular mechanisms that mediate colonization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. In *Infection and Immunity* (Vol. 80, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/IAI.05907-11>
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. In *Science* (Vol. 246, Issue 4926). <https://doi.org/10.1126/science.2675315>
- Fernandez-Brando, R. J., Bentancor, L. V., Mejias, M. P., Panek, A. C., Cabrera, G. G., Exeni, R. A., & Palermo, M. S. (2011). Actualización en el tratamiento del síndrome uremico hemolítico endémico: patogénesis y tratamiento de la complicación sistémica más grave de las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina shiga. In *Medicina* (Vol. 71, Issue 4).
- Fingermann, M., Avila, L., De Marco, M. B., Vázquez, L., Di Biase, D. N., Müller, A. V., Lescano, M., Dokmetjian, J. C., Fernández Castillo, S., & Pérez Quiñoy, J. L. (2018). OMV-based vaccine

- formulations against Shiga toxin producing Escherichia coli strains are both protective in mice and immunogenic in calves. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 14(9). <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1490381>
- Frankel, G., Candy, D. C. A., Everest, P., & Dougan, G. (1994). Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli, Citrobacter freundii, and Hafnia alvei. *Infection and Immunity*, 62(5). <https://doi.org/10.1128/iai.62.5.1835-1842.1994>
- Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W. L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., & Karch, H. (2002). Escherichia coli harboring shiga toxin 2 gene variants: Frequency and association with clinical symptoms. *Journal of Infectious Diseases*, 185(1). <https://doi.org/10.1086/338115>
- Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. *Methods in Enzymology*, 204(C). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-A](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-A)
- Higgins, L. M., Frankel, G., Connerton, I., Gonçalves, N. S., Dougan, G., & MacDonald, T. T. (1999). Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. *Science*, 285(5427). <https://doi.org/10.1126/science.285.5427.588>
- Hiriart, Y., Pardo, R., Bukata, L., Lauché, C., Muñoz, L., Colonna, M., Goldbaum, F., Sanguinetti, S., & Zylberman, V. (2018). Development of a product anti-shiga toxin for prevention of the hemolytic uremic syndrome. *Medicina*, 78(2).
- Hiriart, Y., Scibona, P., Ferraris, A., Belloso, W. H., Beruto, V., Garcia Bournissen, F., Zylberman, V., Muñoz, L., Goldbaum, F., Spatz, L., Colonna, M., Sanguinetti, S., & Simonovich, V. A. (2024). A phase I study to evaluate the safety, tolerance and pharmacokinetics of anti-Shiga toxin hyperimmune equine F (ab')₂ fragments in healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bcp.15999>
- Hughes, D. T., & Sperandio, V. (2008). Inter-kingdom signalling: Communication between bacteria and their hosts. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1836>
- Ibarra, C., Goldstein, J., Silberstein, C., Zotta, E., Belardo, M., & Repetto, H. A. (2008). Hemolytic uremic syndrome caused by enterohaemorrhagic Escherichia coli. In *Archivos Argentinos de Pediatría* (Vol. 106, Issue 5). <https://doi.org/10.1590/S0325-00752008000500011>
- Jenkins, C., Chart, H., Smith, H. R., Hartland, E. L., Batchelor, M., Delahay, R. M., Dougan, G., & Frankel, G. (2000). Antibody response of patients infected with verocytotoxin-producing

- Escherichia coli to protein antigens encoded on the LEE locus. *Journal of Medical Microbiology*, 49(1). <https://doi.org/10.1099/0022-2615-49-1-97>
- Joseph, A., Cointe, A., Kurkdjian, P. M., Rafat, C., & Hertig, A. (2020). Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. In *Toxins* (Vol. 12, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/TOXINS12020067>
- Khare, S., Alali, W., Zhang, S., Hunter, D., Pugh, R., Fang, F. C., Libby, S. J., & Adams, L. G. (2010). Vaccination with attenuated Salmonella enterica Dublin expressing E coli O157:H7 outer membrane protein Intimin induces transient reduction of fecal shedding of E coli O157:H7 in cattle. *BMC Veterinary Research*, 6. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-35>
- Kinter, M., & Sherman, N. E. (2000). Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. In *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*. <https://doi.org/10.1002/0471721980>
- Kudva, I. T., Griffin, R. W., Krastins, B., Sarracino, D. A., Calderwood, S. B., & John, M. (2012). Proteins other than the locus of enterocyte effacement-encoded proteins contribute to Escherichia coli O157:H7 adherence to bovine rectoanal junction stratified squamous epithelial cells. *BMC Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-103>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259). <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lange, V., Picotti, P., Domon, B., & Aebersold, R. (2008). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: A tutorial. In *Molecular Systems Biology* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1038/msb.2008.61>
- Liebler, D. C., & Zimmerman, L. J. (2013). Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry. *Biochemistry*, 52(22). <https://doi.org/10.1021/bi400110b>
- Luo, Y., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Creaght, A. L., Knoechel, D. G., Haynes, C. A., Finlay, B. B., & Strynadka, N. C. J. (2000). Crystal structure of enteropathogenic Escherichia coli intimin-receptor complex. *Nature*, 405(6790). <https://doi.org/10.1038/35016618>
- Masana, M. O., Leotta, G. A., Del Castillo, L. L., D'Astek, B. A., Palladino, P. M., Galli, L., Vilacoba, E., Carbonari, C., Rodríguez, H. R., & Rivas, M. (2010). Prevalence, characterization, and genotypic analysis of escherichia coli O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of argentina. *Journal of Food Protection*, 73(4). <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.4.649>
- Mckee, M. L., & O'Brien, A. D. (1996). Truncated enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) O157:H7 intimin (EaeA) fusion proteins promote adherence of EHEC strains to HEp-2 cells. *Infection and Immunity*, 64(6). <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.2225-2233.1996>

- McNeilly, T. N., Mitchell, M. C., Corbishley, A., Nath, M., Simmonds, H., McAteer, S. P., Mahajan, A., Low, J. C., Smith, D. G. E., Huntley, J. F., & Gally, D. L. (2015). Optimizing the protection of Cattle against *Escherichia coli* O157:H7 colonization through immunization with different combinations of H7 flagellin, Tir, intimin-531 or EspA. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128391>
- McNeilly, T. N., Mitchell, M. C., Rosser, T., McAteer, S., Low, J. C., Smith, D. G. E., Huntley, J. F., Mahajan, A., & Gally, D. L. (2010). Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge. *Vaccine*, 28(5). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.076>
- Menezes, M. A., Aires, K. A., Ozaki, C. Y., Ruiz, R. M., Pereira, M. C. A., Abreu, P. A. E., Elias, W. P., Ramos, O. H. P., & Piazza, R. M. F. (2011). Cloning approach and functional analysis of anti-intimin single-chain variable fragment (scFv). *BMC Research Notes*, 4. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-30>
- Michael. Karas and Franz. Hillenkamp. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *American Chemical Society*, 2299–2301.
- Miliwebsky E, D. N. Z. G. B. A. C. C. M. E. D. B. C. B. R. M. (2019). *Manual de procedimientos: Escherichia coli productor de toxina Shiga en el marco de la detección de E. coli diarreigénico*. ANLIS/INEI/MPY ARG;2019.
- Monteiro, S. H., Francisco, J. G., Andrade, G. C. R. M., Botelho, R. G., Figueiredo, L. A., & Tornisielo, V. L. (2016). Study of spatial and temporal distribution of antimicrobial in water and sediments from caging fish farms by on-line SPE-LC-MS/MS. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(9). <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1181917>
- Mühlen, S., & Dersch, P. (2020). Treatment Strategies for Infections With Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00169>
- Parma, A. E., Sanz, M. E., Blanco, J. E., Blanco, J., Viñas, M. R., Blanco, M., Padola, N. L., & Etcheverría, A. I. (2000). Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina: Importance in public health. *European Journal of Epidemiology*, 16(8). <https://doi.org/10.1023/A:1026746016896>
- Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 11, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/cmr.11.3.450>

- Pérez, J. L., Fernández, Y., Aranguren, Y., Alvarez, M., Acevedo, R., Pérez, O., Finlay, I., Producción, C. D. I., Ave, D. V., & Cod, L. L. A. P. (2007). Cuantificación de lipopolisacárido en un proteoliposoma obtenido a partir de la superficie externa de *Vibrio cholerae* O1. *VacciMonitor*, 16(1).
- Pérez, O., Bracho, G., Lastre, M., Mora, N., Del Campo, J., Gil, D., Zayas, C., Acevedo, R., González, D., López, J. A., Taboada, C., & Solis, R. L. (2004). Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern. *Immunology and Cell Biology*, 82(6). <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2004.01293.x>
- Potter, A. A., Klashinsky, S., Li, Y., Frey, E., Townsend, H., Rogan, D., Erickson, G., Hinkley, S., Klopfenstein, T., Moxley, R. A., Smith, D. R., & Finlay, B. B. (2004). Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine*, 22(3–4). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.08.007>
- Praekelt, U., Reissbrodt, R., Kresse, A., Pavankumar, A., Sankaran, K., James, R., Jesudason, M., Anandan, S., Prakasam, A., Balaji, V., Dutta, S., Dutta, S., Ramamurthy, T., Fischer, R., Sander, P., Schaumann, R., Navarro, A., & Williams, P. (2014). Monoclonal antibodies against all known variants of EspA: Development of a simple diagnostic test for enteropathogenic *Escherichia coli* based on a key virulence factor. *Journal of Medical Microbiology*, 63. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.076323-0>
- Repetto, H. A. (2005). Long-term course and mechanisms of progression of renal disease in hemolytic uremic syndrome. *Kidney International, Supplement*, 68(97). <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.09717.x>
- Rowe, P. C., Orrbine, E., Wells, G. A., & McLaine, P. N. (1991). Epidemiology of hemolytic-uremic syndrome in Canadian children from 1986 to 1988. The Canadian Pediatric Kidney Disease Reference Centre. *The Journal of Pediatrics*, 119(2).
- Smith, D. R. (2014). Vaccination of Cattle against *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology Spectrum*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ehec-0006-2013>
- Smith, R. D., Udseth, H. R., Barinaga, C. J., & Edmonds, C. G. (1991). Instrumentation for high-performance capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 559(1–2). [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(91\)80070-W](https://doi.org/10.1016/0021-9673(91)80070-W)
- Snedeker, K. G., Campbell, M., & Sargeant, J. M. (2012). A Systematic Review of Vaccinations to Reduce the Shedding of *Escherichia coli* O157 in the Faeces of Domestic Ruminants. In *Zoonoses and Public Health* (Vol. 59, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01426.x>

- Stevens, M. P., & Frankel, G. M. (2014). The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 2(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ehec-0007-2013>
- Svendsen, A. T., Nielsen, H. L., Bytzer, P., Coia, J. E., Engberg, J., Holt, H. M., Lemming, L., Lomborg, S., Marmolin, E. S., Olesen, B. S., Andersen, L. P., Ethelberg, S., & Engsbro, A. L. (2023). The incidence of laboratory-confirmed cases of enteric pathogens in Denmark 2018: a national observational study. *Infectious Diseases*, 55(5). <https://doi.org/10.1080/23744235.2023.2183253>
- Swerdlow, D. L., & Griffin, P. M. (1997). Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. In *Lancet* (Vol. 349, Issue 9054). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)60196-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)60196-1)
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., & Matsuo, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8). <https://doi.org/10.1002/rcm.1290020802>
- Vilte, D. A., Larzábal, M., Mayr, U. B., Garbaccio, S., Gammella, M., Rabinovitz, B. C., Delgado, F., Meikle, V., Cantet, R. J. C., Lubitz, P., Lubitz, W., Cataldi, A., & Mercado, E. C. (2012). A systemic vaccine based on *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts (BGs) reduces the excretion of *E. coli* O157:H7 in calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146(2). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.03.002>
- Walle, K. Vande, Vanrompay, D., & Cox, E. (2013). Bovine innate and adaptive immune responses against *Escherichia coli* O157: H7 and vaccination strategies to reduce faecal shedding in ruminants. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.028>
- Wang, E. H., Combe, P. C., & Schug, K. A. (2016). Multiple Reaction Monitoring for Direct Quantitation of Intact Proteins Using a Triple Quadrupole Mass Spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27(5). <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1368-2>
- Wang, E. H., Nagarajan, Y., Carroll, F., & Schug, K. A. (2016). Reversed-phase separation parameters for intact proteins using liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 39(19). <https://doi.org/10.1002/jssc.201600764>
- Zhang, W. L., Köhler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S., & Schmidt, H. (2002). Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing

Escherichia coli strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12).

<https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4486-4492.2002>

Zheng, W., Peña, A., Ilangovan, A., Naemi-Baghshomali Clark, J., Frankel, G., Egelman, E. H., & D Costa, T. R. (n.d.). *Cryoelectron-microscopy structure of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system EspA filament*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022826118/-/DCSupplemental>