

# FENOTIPO VS. GENOTIPO DE LA PROTEINA ASOCIADA AL PEPTIDO GLUCANO DE LEGIONELLA Y OTRAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS \*

Elizabeth Chirinos Ricaldi<sup>1</sup>

## INTRODUCCION

Las legionellas son causas de enfermedades pulmonares conocidas como legionelosis. El género *Legionella* comprende más de 30 especies, las cuales pueden ser subdivididas en serotipos (Winn, 1988). *Legionella pneumophila*, serotipo 1; son los agentes más prevalentes de la Legionelosis.

El hábitat natural de legionellas es el medio acuático. Tal es así que pueden ser rápidamente aisladas de sistemas de agua doméstica, a menudo en asociación con amebas de vida libre (Winn, 1988 y Rowbotham, 1986). Las legionellae son capaces de multiplicarse intracelularmente en macrófagos pulmonares conduciendo a severos perjuicios de los tejidos en el curso de la infección.

Prolongados pasajes o repiques de *Legionella* en medios de cultivo en laboratorios, conducen a una espontánea pérdida de virulencia, pero actualmente son poco conocidos los factores determinantes de la virulencia de legionella.

Las aproximaciones genéticas revelan que una membrana ligada a la proteína, denominado infectivo potenciador macrófago (macrophage infectivity potentiator) es importante para el inicio de la infección de las células sanas (Cianciotto y otros, 1989 y 1990), además, dos proteínas que exhiben actividades hemolíticas han sido clonadas recientemente en *E. coli* K-12 (Quinn, 1989 y Wintermeyer). La mayor proteína secretoria (Msp) es una metalo proteasa de 38 KD, parece no tener influencia en la virulencia (Blander y otros, 1990). Aun que no se ha esclarecido si esta otra proteína hemolítica, denominada legiolisina (39 KD), contribuye o no a la virulencia. También una proteína de choque térmico de 60 KD con

epitopos inmunodominantes y una proteína péptidoglucano asociada de 19 KD fueron clonadas y analizadas recientemente.

En un estudio preliminar, nosotros reportamos sobre el análisis molecular de la proteína específica de *L. pneumophila*.

Experimentos de subclonantes y análisis de secuencias revelaron homología de esta proteína a lipoproteínas de *Haemophilus influenzae* y *Escherichia coli* (Ludwig y otros, 1991). La proteína 19 KD se encontró asociada con la capa de mureína del recombinante *E. coli* y *L. pneumophila* (Ppl). Por consiguiente se denominó proteína asociada a péptidoglucano de legionella (PplA). En este estudio, nosotros analizamos la presencia genética y la expresión de secuencias homólogos de Ppl en legionellae y otras bacterias gram negativas.

## MATERIALES Y METODOS

### CEPAS BACTERIALES Y LOS PLASMIDOS

Las cepas bacteriales usadas en este estudio están listados en la tabla 1. El recombinante ppL específico plasmido pBLL 30 ha sido descrito recientemente. El plásmido se ha mantenido en DH5 de *E. coli* bajo presión antibiótica (ampicilina 100 µg/µl).

### MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y ENZIMAS

Especímenes de *Legionella* fueron cultivados en placas de BCYE-agar (oxid, wesel, Alemania) incubados a 37 °C en 5% de atmósfera de CO<sub>2</sub> por 2 a 3 días (Harrison y Taylor, 1978). Las cepas de *E. coli* y todas las otras bacterias gram negativas, fueron incubados a 37°C por 24 horas en agar Luria Bertani (LB) a excepción de *Bordetella pertussis*, que fue cultivado en Bordet-Gengou (BG, Difco, Detroit, Michigan, USA) conteniendo 5 % de sangre de ovino por 5 días a 37 °C. Los radioquímicos

\* Artículo traducido del original inglés "Phenotype versus genotype of the ..", publicado en Microbial Pathogenesis, 1991, por los autores Larisa Beder, Manfred Ott, Werner Ehret, Jörg Harcker y Elizabeth Chirinos, University of Würzburg, Alemania.

1. Doctora en biología

fueron comprados de NEN Research Alemania, todos los otros compuestos químicos fueron regalados de Sigma (Deisenhofen, Alemania).

### **TECNICAS DE DNA**

Plásmido y DNA cromosomal fueron aislados como descritos tempranamente (19;20). Para el análisis de las enzimas de restricción, DNA fue tratado con enzimas apropiadas y los fragmentos resultantes fueron separados en gel con 1 % de agarosa, Hind III ligado a lambda de DNA fue el marcador de tamaño.

### **PCR amplificación**

Un fragmento 523 bp acodado solamente a PpLA fue amplificado por reacción en cadena polimerasa (PCR) usando el bio-med termociclo 60 (Braun, Göttingen, Alemania). Primero fueron seleccionados de acuerdo a la secuencia publicada por Ludwig y colaboradores (Ludwig y otros, 1991) 5'GCCGGATCGTTTTATAAATGGG 3' (posición de 116-139) y 5'CTTGTTGCCTCATAAATAA ACTCTC 3' (posición invertida 639-615) la síntesis de los oligonucleótidos ha sido realizada con el método de acoplamiento automatizado fosforamidita (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania). La solución de PCR contenía 100 mM KCl, 20 mM Tris (pH 8,3); 0,02% gelatina, 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 200 µM, de cada una de la dioxi nucleótido trifosfato, 0,5 µM cada uno de los primeros y 2.5 unidades (units) de taq DNA polimerasa (Boehringer, Alemania). El volumen total de la reacción PCR era 100 µl aproximadamente 0.5 ug del template DNA (plásmido pBLL 30) (íbid) fue inicialmente desnaturalizado a 95 °C por 3 minutos. Después de un total de 30 ciclos fueron corridos usando 3 temperaturas para el PCR los ciclos de desnaturalización a 94 °C por minuto, primero calentando y enfriando a 55 °C y extendiendo a 72 °C por 2 minutos.

### **MARCACION RADIOACTIVA.**

El fragmento específico de pplA generado por PCR (ver arriba) ha sido aislado de agarosa y marcado por el método de Feinberg y Vogelstein (Feiberg y Vogelstein, 1983) con el "random priming Kit" comprado de Boehringer, Mannheim, Alemania, usando P-dCTP<sup>32</sup>.

### **Southern Hibridación**

La transferencia del fragmento DNA a la membrana de Nylon Biodine ha sido hecha de acuerdo al método de Southern (Southern, 1975) modificado y descrito por el artículo (Bio Support, New York, USA). La hibridación a elevada estringencia se hizo en 50% de formamida a 42% en 5 x SSC. Los filtros han sido lavados 3 veces con 0,1 % x SSC/ 0,1 % SDS a 56 °C para condiciones de baja estringencia, el contenido de

formamida de la solución fue reducido a 25% y la hibridación fue llevada a cabo a 37 °C con 6 x SSC. Los filtros fueron lavados en 2 x SSC/0,1% SDS a 56 °C tres veces. Estas condiciones permitieron aproximadamente 10% a 25% de apareamiento forzado de acuerdo a Davis et al (1980).

### **PREPARACION DE ANTICUERPO ANTI-PPLA.**

El anticuerpo anti-PpLA policlonal mono específico ha sido preparado en conejos, usando la cepa *E. coli* K-12 expresándola a la proteína 19 KD para el análisis de Western Bolt, los anti-sueros fueron absorbidos con *E. coli* corriente sólo el vector (ver Ludwig et al, íbid).

### **SDS-PAGE y análisis de Western blot**

SDS-PAGE se hizo de acuerdo a Laemmli (1970) usando geles al 10% de poli acrilamida. El extracto integral de células usadas para el análisis de Western blot fue preparado después de que éstos se incubaron a 37 °C y fueron lavadas con agua destilada, la densidad óptica fue ajustada a 0,8 y 1 ml de la suspensión y centrifugada. Después de eliminar el sobrenadante, las bacterias fueron suspendidas en 100 µl de laemmli-buffer hervidas por diez minutos. Para SDS-PAGE fueron 10 µl aplicados. Western blot fueron realizados como describe Towbin et al (1979) usando peroxidasa conjugada "swine-anti-rabbit IgG anticuerpo" (DAKO, Hamburg, Alemania).

## **RESULTADOS**

### **DISTRIBUCION DE LAS SECUENCIAS DE PPL EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS**

Para determinar la presencia de secuencias de ppl entre Legionellae y otras bacterias gram negativas se aisló DNA cromosomal de una variedad de especímenes. Después de la digestión con ClaI. La hibridación Southern se llevó a cabo usando el fragmento específico 523 bp de PpLA (Ludwig, íbid) (tabla 1) y bajo condiciones de alta estringencia sólo los aislados de *L. pneumophila* mostraron hibridación para esta prueba de DNA. Es interesante que el tamaño del resultado de ClaI fragmento no corresponde al del fragmento clonado. También estas diferencias pudieron ser detectadas entre los diferentes gérmenes de *L. pneumophila* de acuerdo al modelo de hibridación de ClaI. Usando otras variedades de enzimas de restricción la colonialidad entre la estructura del gen y el cromosoma del espécimen original *L. pneumophila*, Philadelphia 1 y los plásmidos específicos de ppl pudo ser confirmado (datos no mostrados).

Bajo condiciones de menor estringencia, se pudo observar distinta hibridación en todos las otras

cepas de legionella examinadas (tabla 1). El aislado genómico de DNA de *E.coli*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei*, *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas sobria* y *Bordetella pertusis* no exhibieron señales de hibridación con la secuencia PplA.

### EXPRESION DE SECUENCIA DE PPL EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

En aproximaciones más lejanas, para clarificar la expresión de proteínas ligadas al PplA, se emplearon anticuerpos mono-específicos policlonales anti-PplA en análisis de Western blot de extracto integral de las células derivadas de los especímenes mencionados arriba. En la tabla 1 se puede ver que los aislados de la *L. pneumophila* reaccionaron muy fuerte en Western blot exhibiendo proteínas del mismo tamaño como los clonados PplA proteínas de 19 KD. Entre los otros géneros de las cepas de legionella, en las proteínas reactantes de similar tamaño, se pudo detectar en *L. longbeachae* (serogrupos 1 y 2), *L. micdadei*, *L. dumoffii*, y *L. bozemanii* (serogrupos 1), *L. hackelliae* (serogrupos 1 y 2), *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. israelensis* y las otras cepas no Legionellas, no mostraron ninguna reacción.

### DISCUSION Y CONCLUSIONES

Todos los aislados de *L. pneumophila* examinados en este estudio incluyendo un derivado avirulento de la cepa Philadelphia 1 expresaron proteínas con un tamaño de 19KD reaccionando con el anticuerpo policlonal anti-PplA. Una variedad de cepas de Legionellas no-pneumophila reaccionaron, pero hubieron otras que no reaccionaron. Entre las diferentes cepas gram negativas examinadas no se pudo observar reacción al antisuero. Algunas de las cepas Legionellas analizadas aquí fueron previamente examinados por Hindahl e Iglewski (Hindahl y otro, 1987) con antisueros específicos para una proteína 19 KD *L. pneumophila*. Sus datos están en completa concordancia con los resultados presentados aquí, mientras que (Engleberg y otros, 1986) encontraron proteínas ligadas reactantes con una preparación de anticuerpos anti 19 KD en *L. gormanii* y *L. jordanis*, los cuales fueron negativos en nuestros estudios. Esta discrepancia pudo ser debido al diferente modo de preparación del anticuerpo así como estos autores dieron un titer elevado, con esto sería posible la detección de proteínas, las cuales presentaron partes iguales sólo en algunos epitopos comunes.

Se intentó una aproximación posterior por estudio de hibridación con una prueba específica de PplA usando condiciones de baja y alta estrictencia. Sólo los aislados de pneumophila reaccionaron con la prueba pplA DNA en condiciones de alta estrictencia. Mientras

TABLA No. 1: Distribución y expresión de secuencias de *ppl* entre Legionella y otras especies

Nº	Muestra <sup>a</sup>	Hibridación con <i>ppl</i>		Reacción con Anti-PplA anticuerpos <sup>b</sup>
		Referencia (estrictencia)	Alta Baja	
1.	<i>L. pneumophila</i> (S1) Philadelphia 1	ATCC 33152		+ + +
2.	<i>L. pneumophila</i> (S1) XXV, avirulent Philadelphia 1 (29)			+ + +
3.	<i>L. pneumophila</i> U1S1 environmental isolate (29)			+ + +
4.	<i>L. pneumophila</i> U22S6 environmental isolate (29)			+ + +
5.	<i>L. pneumophila</i> U22S3 environmental isolate (29)			+ + +
6.	<i>L. pneumophila</i> MSP19S1 environmental isolate (29)			+ + +
7.	<i>L. pneumophila</i> 685S1 patient isolate (8)			+ + +
8.	<i>L. pneumophila</i> 667S4 patient isolate	this study		+ + +
9.	<i>L. pneumophila</i> 640S5 patient isolate	this study		+ + +
10.	<i>L. pneumophila</i> 664S6 patient isolate	this study		+ + +
11.	<i>L. longbeachae</i> S1	ATCC 33462		- + +
12.	<i>L. longbeachae</i> S2	ATCC 33484		- + +
13.	<i>L. dumoffii</i>	ATCC 33279		- + +
14.	<i>L. bozemanii</i> S1	ATCC 33217		- + +
15.	<i>L. micdadei</i>	ATCC 33218		- + +
16.	<i>L. gormanii</i>	ATCC 33297		- + -
17.	<i>L. jordanis</i>	ATCC 33623		- + -
18.	<i>L. feeleii</i> S1	ATCC 35072		- + -
19.	<i>L. feeleii</i> S2	ATCC 35849		- + -
20.	<i>L. hackelliae</i> S1	ATCC 33250		- + -
21.	<i>L. hackelliae</i> S2	ATCC 35999		- + -
22.	<i>L. israelensis</i>	ATCC 43119		- + -
23.	<i>L. oakridgensis</i>	ATCC 33761		- + -
24.	<i>Serratia marcescens</i> W225	Braun unpublished		- - -
25.	<i>Serratia liquefaciens</i> DSM 30064	Braun unpublished		- - -
26.	<i>Aeromonas sobria</i> AB3	(30)		- - -
27.	<i>Salmonella typhimurium</i> 05-1/4, 12:i:1,2	Hofe unpublished		- - -
28.	<i>Bordetella pertussis</i> 6564/85	Heesemann unpublished		- - -
29.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SS 712	Behringer unpublished		- - -
30.	<i>Shigella sonnei</i> 5542/89	Heesemann unpublished		- - -
31.	<i>Shigella flexneri</i> 1265/89	Heesemann unpublished		- - -
32.	<i>E. coli</i> 536	(20)		- - -

<sup>a</sup> S determinación de serogrupo

<sup>b</sup> determinación en Western blots usando extracto de células integrales

que todas las otras cepas de Legionella no pertenecientes a la especie de *L. pneumophila* mostraron señales de hibridación, solamente en condiciones de baja estrictencia, no respecto a la expresión de proteína ligada PplA. Todas las otras bacterias gram negativas no exhibieron señales de hibridación bajo las últimas condiciones. Como la proteína PplA exhibe sólo 60% de similitud y 37% de identidad a la proteína Pal de *E. Coli*, a nivel de aminoácidos la hibridación positiva en condiciones usadas aquí no pudo ser detectada. Análisis de DNA con PplA específico de prueba de DNA pudo ser usada para discriminar *L. pneumophila* de Legionellae, mientras que tal diferenciación no pudo ser alcanzada por análisis inmunológico, usando el antisuero anti-PplA. Tales hallazgos pueden ser útiles para la evaluación de pruebas de diagnóstico de DNA. Este interés del modelo de hibridación Clal de las cepas exhibió heterogeneidad en algún grado y el fragmento 1,8 Kb CLAI clonado no estuvo presente en este tamaño de la cepa original de *L. pneumophila* Philadelphia 1. Las diferencias de las modificaciones en DNA de los genomas y/o la localización de PplA a diferentes posiciones en los cromosomas de varios aislados pueden explicar estos hallazgos. Es importante anotar que las proteínas ligadas al PplA de

similar tamaño, pueden también ser detectadas en especímenes de Legionella, mostrando sólo limitada homología de DNA. Estos fueron reflejados por su hibridación resultante en condiciones de más baja estringencia. Resultados similares han sido obtenidos para la proteína semejante al Mip (Mip-like) (Cianciotto y otros, *ibid*), los cuales también pudieron encontrarse en toda la Legionellas aisladas y de especies no respectivas, aunque existe una secuencia de homología global, limitada al gen clonado Mip de *L.pnemophila*.

En contraste a PplA (Mip-like), la proteína parecida al Mip es producida por diferentes especies de cepas de Legionella, éstas difieren más drásticamente en tamaño. Además, las proteínas que están relacionadas inmunológicamente y con un similar tamaño, pudieron ser detectadas en todas las especies de Legionella y en otras bacterias, usando anticuerpos policlonales y monoclonales. Observando la proteína del choque al

calor 60KD (heat shock) (HtpB) clonado de *L. pneumophila* (datos de Chirinos, todavía no publicados) (Hoffman y otros, 1989; Steinmetz y otros, 1991). Usando una *L. pneumophila* htp específica de muestra de DNA, en condiciones de baja estringencia en experimentos de hibridación, aparecen señales aisladas, sólo en el caso de *L. pneumophila*, pero no en una variedad de otras especies de Legionella.

La presencia de epitopos inmunodominantes conservados en estas proteínas pudieron explicar tales hallazgos contrariamente, estudios con la proteína hemolítica clonada de *L. pneumophila*, la Legiollisina y la proteína de mayor secreción (Quinn y otros, 1989), revelaron que la expresión de proteínas relacionadas inmunológicamente es detectada exclusivamente en miembros de las especies *L. pneumophila*. Estos datos son de uso en las pruebas de ensayos inmunológicos usadas en la detección e identificación de Legionellae.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Winn WC. **Legionnaires disease: Historical perspective.** Clin. Microbiol Rev 1988; 1: 60-81.
- Rowbotham TJ. **Current views on the relationships between amoebae, Legionellae and man.** Isr J Med Sci 1986; 22 678-89.
- Cianciotto N, Eisentein BI, Engleberg NC, Shuman H., **Genetics and molecular pathogenesis of legionella pneumophila, and intracellular parasite of macrophages.** Mol Biol Med 1989; 6: 409-24.
- Catrenich CE, Johnson W., **Virulence conversion of Legionella pneumophila: a one way phenomenon.** Infect Immun 1988; 56:3121-5.
- Cianciotto NP, Eisentein B, Mody CH Toews, Engleber NC. **a Legionella pneumophila gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection.** Infect Immun 1989; 57: 1255-62.
- Cianciotto NP, Bangsberg JM, Eisentein BI, Engleberg NC > **Identification of mip- like genes in the genus Legionella.** Infect Immun 1990; 58: 2912-8.
- Quinn FC, Tompkins Ls. **Analysis of a cloned sequence of legionella pneumophila encoding a 38 Kd metalloprotease possessing haemolytic and cytotoxic activities.** Mol Microbiol 1989; 3: 797-805.
- Wintermeyer E, Rdest U, Ludwig B, debes A, Hacker J. **Cloning And Characterization of DNA sequence, termed legiolysin (LLY), responsible for hemolytic activity, color production and fluorescence of Legionella pneumophila.** Mol microbiol 1991; 5: 1135 - 43.
- Blander SJ, Szeto L, Shuman HA, Horwitz MA. **An immunoprotective molecule, the major secretory protein of Legionella pneumophila, is not a virulence factor in a guinea pig model of legionnaires disease.** J. Clin Invest 1990; 86: 817-24.
- Hoffman PS, Butler CA, Quinn FC. **Cloning and temperature- dependent expression in Escherichia coli of a legionella pneumophila gene coding for a genus common 60 kilodalton antigen.** Infect Immun 1989; 57: 1731-9.
- Engleberg Nc, Pearlman E. Eisentein BI. **Legionella pneumophila surface antigens cloned and expressed in Escherichia coli are translocated to the host cell surface and interact with specific anti-Legionella antibodies.** J Bacteriol 1984; 160: 199-203.
- Hindahl MS, Iglewski BH. **Cloning and expression of a common legionella outer membrane antigen in Escherichia coli.** Microbial Pathogenesis 1987; 2: 91-9.
- Ludwig B, Schmid A, Marre R, Hacker J. **Cloning, genetic analysis and nucleotide sequence**

- of a determinat coding for a 19 kDa peptidoglycan-associated protein (Ppl) of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1991; 59 : in press.
- Engleberg NC, Pearlman E, Dixon, Eisentein BI. **Antibodies isolated by components of legionella pneumophila and other legionella species.** *J Immunol* 1986; 136: 1415-7.
- Marra A, Shuman HA. **Isolation of a Legionella Pneumophila restriction mutant with increased ability to act as recipient in heterospecific mating.** *J Bacteriol* 1988; 171:2238-40.
- Steinmetz I, Rheinheimer C, Hubner I, Bitter- Suermann D. **Genus-specific epitope on the 60-kilodalton legionella heat shock protein recognized by a monoclonal antibody.** *J Clin Microbiol* 1991; 29 346-54.
- Quinn FD, Keen Mg, Tompkis LS. **Genetic. Immunological and cytotoxic comparisons of legionella proteolytic activities.** *Infect Immun* 1989, 57 : 719-25.
- Harrison TG, Taylor AG (eds) **A laboratory manual for legionella.** a Wiley - Interscience publication 19878; Great Britain.
- Birnboim HC, Doly J. **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Res* 1979; 7 : 1513-22.
- Kanapp S, Hacker J, Then I, Muller D, Goebel W. **Múltiple copies of hemolisin genes and associated sequences in the chromosome of uropathogenic Escherichia coli strains.** *J.Bacteriol* 1984; 159: 1027-33.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular cloning.** A laboratory manual 2nd edition. cold Spring Harbor laboratory 1989; NY, USA.
- Becaugue SL, Caruthres MH. **Deoxynucleoside phosphoramidites: a new class of key intermediate for deoxypolynucleotide synthesis.** *Tetrahedron lett* 1981; 22: 1859 - 62.
- Thuring RWJ, Sanders JR, Borst P. **A Freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels.** *Anal Biochem* 1975; 66: 213-20.
- Feinberg AP, Vogelstein B. **A Technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity.** *Anal Biochem* 1983; 132: 6-13.
- Southern EM. **Detection of specific sequences among DNA fragments parated by gel electrophoresis.** *J. Mol Biol* 1975; 98: 503-17.
- Davis RW, Botstein D, Roth JR. **A Manual for genetic engineering: advanced bacterial genetics,** pp 22-1 Cold spring Harbor 1980; NY USA.
- Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the haed of bacteriophage t4.** *nature* 1970; 227 : 680-5.
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelluse sheets. Procedure and some applications.** *Pro Natl Acad Sci USA* 1079; 76: 4350-4
- Bender L. ott M, Marre R, Hacker J. **Genome analysis of legionella spp. By orthogonal fiel alternation gel electrophoresis FEMS** *Microbiol lett* 990;72: 253-8
- Chakraborty T, Kathariou S, Hacker J, Huhle B, Wagner W, Kuhn M, **Molecular analysis of bacterial cytolysin.** *Rev Infect Dis* 1987; 9 : 456-66 (Suppl),