



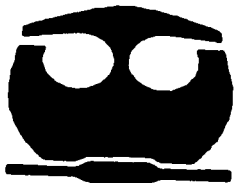
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

"ShdA es un autotransportador de *Salmonella typhimurium*"

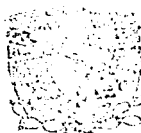
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:
ERICKA NELLY POMPA MERA



MEXICO, D. F.



2002

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

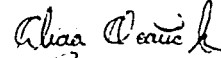

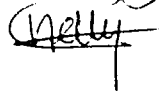
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Profa. Ma. Del Carmen Cortés Decuir
Vocal	Profa. Ma. Elsa Escudero García
Secretario	M. en C. Alicia Ocaña Mondragón
1er. Suplente	Prof. Saturnino de León Chapa
2o. Suplente	Profa. Elvira Berrón Ruíz

Sitio donde se desarrolló el tema:

Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología. Hospital de Infectología "Daniel Méndez Hernández". CMN "La Raza". Instituto Mexicano del Seguro Social.

Asesor de tesis:	M. en C. Alicia Ocaña Mondragón 
Supervisor técnico:	M. en C. Rosendo Luria Pérez 
Sustentante:	Ericka Nelly Pompa Mera 

A mi esposo y a mi hijo

(con amor)

A mis hermanos Oscar y Valerie. Gracias por su apoyo y observaciones, pero sobretodo por el respeto que me han brindado.

A mis padres.

A la Dra. Ma. Rosario Argueta (por la lección más importante de mi vida: "lo no ordinario")

A todos mis amigos.

A todos los estudiantes, profesores e investigadores honestos que se esfuerzan todos los días, por ser productivos sin transgredir sus principios éticos.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Alicia Ocaña Mondragón, por la dirección del presente trabajo.

Al Dr. César González Bonilla por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación.

Al M. en C. Rosendo Luria Pérez por su ejemplo, supervisión técnica y apoyo experimental presente en todo momento.

A mis compañeros Francisco Osorio y Patricia García, por la valiosa ayuda experimental.

Al Dr. Fernando Ruiz y a la M. en C. Patricia Ruíz por el entrenamiento experimental inicial.

A todo el personal de la Unidad Médica de Investigación en Inmunología e Infectología. Hospital de Infectología "Daniel Méndez Hernández" del CMN "La Raza". IMSS.

INDICE

	Página
Indice de figuras	8
Lista de abreviaturas	10
Resumen	11
1.0. ANTECEDENTES	
1.1. Introducción.....	12
1.1.1. Sistemas de secreción.....	13
1.1.2. Sistema de secreción tipo I.....	15
1.1.3. Sistema de secreción tipo II.....	18
1.1.4. Sistema de secreción tipo III.....	21
1.1.5. Sistema de secreción tipo IV.....	25
1.1.6. Sistema de secreción tipo V.....	27
1.2. Funciones de virulencia de proteínas autotransportadoras.....	32
1.3. Factores de virulencia e islas de patogenicidad.....	35
1.4. El autotransportador MisL de <i>S. typhimurium</i>	37
1.5. La proteína β -ShdA.....	38
2.0. JUSTIFICACIÓN	42
3.0. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo general.....	43
3.2. Objetivos específicos.....	43
4.0. METODOLOGIA	
4.1. Cepas bacterianas utilizadas.....	44
4.2. Condiciones de cultivo e inducción.....	48
4.3. Extracción de proteínas totales.....	49
4.4. Extracción de proteínas de periplasma.....	49
4.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE).....	50
4.6. Inmunoelectrotransferencia.....	51
4.7. Inmunofluorescencia indirecta.....	51
4.8. Citometría de flujo.....	52
5.0. RESULTADOS	
5.1. Evaluación de la expresión del péptido NANP y la CSP en extractos de proteínas totales.....	54
5.2. Comparación de la expresión del péptido NANP y la CSP en proteínas totales y de periplasma.....	55

5.3. Evaluación de la expresión del péptido NANP y la CSP en la superficie <i>Salmonella typhimurium</i>	
5.3.1. Inmunofluorescencia indirecta.....	60
5.3.2. Citometría de flujo.....	63
6.0. DISCUSIÓN.....	67
7.0. CONCLUSIONES.....	73
8.0. PERSPECTIVAS.....	74
9.0. APÉNDICE.....	75
10.0. REFERENCIAS.....	82

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas	Página
Tabla 1. Fenotipos bacterianos y enfermedades asociadas, donde está implicado el sistema de secreción tipo III.....	22
Tabla 2. Funciones de los dominios pasajeros de los ATs.....	34
Tabla 3. Características generales de las islas de patogenicidad de <i>Salmonella entérica</i> (SPI).....	36
Tabla 4. Características generales de los plásmidos.....	46

Figuras	Página
Figura 1. Modelo de secreción tipo I.....	16
Figura 2. Modelo de secreción tipo II y su comparación con la biogénesis del pili tipo 4.....	21
Figura 3. Modelo del sistema de secreción tipo III.....	23
Figura 4. Modelos de autotransportadores.....	30
Figura 5. Modelo de una isla de patogenicidad bacteriana.....	35
Figura 6a. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los ATs AIDA-1 y ShdA.....	40
Figura 6b. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los ATs ShdA y MisL.....	41
Figura 7. Estructuras de los plásmidos.....	47
Figura 8. Evaluación de la expresión del péptido NANP y de la CSP en extractos de proteínas totales.....	57
Figura 9. SDS-PAGE 7.5% comparativo, entre extractos proteicos totales y periplásmicos.....	58

Figura 10. Western-blot comparativo, entre extractos proteicos totales y periplásmicos.....	59
Figura 11. Evaluación de la expresión del epitopo NANP y de la CSP en la superficie de <i>Salmonella typhimurium</i>, mediante inmunofluorescencia indirecta.....	62
Figura 12. Evaluación de la expresión del epitopo NANP y de la CSP en la superficie de <i>Salmonella typhimurium</i>, mediante citometría de flujo	65
Figura 13. Citometrías de flujo de las cepas que expresan β-ShdA.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDA	Adhesina involucrada en la adherencia difusa
2 A10	Anticuerpo monoclonal con especificidad para NANP
APS	Persulfato de amonio
ATs	Autotransportadores
BHI	Infusión cerebro-corazón
BSA	Albúmina sérica bovina
CSP	Proteína circunsporozoítica de <i>Plasmodium falciparum</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DHB	Ácido dihidroxibenzoico
DO	Densidad óptica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GSP	Ruta secretoria general (del inglés General secretory pathway)
HRP	Peroxidasa de rábano
Hb	Hemoglobina
IM	Membrana interna
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
LTB	Subunidad B de la toxina termolábil de <i>Escherichia coli</i>
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µg	Microgramos
µL	Microlitros
MisL	Proteína de membrana de inserción y secreción con función autotransportadora presente en <i>Salmonella typhimurium</i>
NANP	Péptido: Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina
nm	Nanómetros
OM	Membrana externa
pb	pares de bases
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
Pm	Proteínas de periplasma
pnirB	Promotor de la nitrato reductasa
PT	Proteínas totales
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SSI	Solución salina isotónica
Sol.	Solución
SPI	Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella typhimurium</i>
T°C	Temperatura ambiente
UV	Luz ultravioleta

RESUMEN

Los autotransportadores (ATs) son una familia de proteínas pertenecientes al sistema de secreción tipo V descrito en algunas bacterias gramnegativas. Tienen una importante función en la translocación de moléculas (péptidos, proteínas, antígenos y factores de virulencia) a la superficie bacteriana. Su estructura comprende: una secuencia líder (extremo N-terminal), un dominio α (ó dominio pasajero, que es la proteína madura por translocar) y un dominio β (extremo C-terminal), que se ensambla, formando una estructura oligomérica con un poro central (semejante a un anillo), y que sirve de conducto para exportar el dominio pasajero.

Uno de los primeros ATs descritos fue la proteasa de IgA1 que sintetizan algunas especies del género *Neisseria*, actualmente la lista crece. *shdA* recientemente fue descrito como un gen específico de *Salmonella entérica* subespecie 1. Sin embargo, su función aún se desconoce, pero se sabe que codifica para una proteína (ShdA) que tiene homología con el extremo C-terminal de los ATs AIDA de *Escherichia coli* y MisL de *Salmonella typhimurium*, lo que sugiere una función semejante.

En el presente trabajo, se evaluó la capacidad del dominio β de ShdA para translocar y presentar en la superficie de *Salmonella typhimurium* el péptido heterólogo NANP y la proteína recombinante CSP. Se utilizaron cepas de *Salmonella typhimurium* cuyos plásmidos, bajo el promotor *pnirB*, contienen los genes necesarios para la expresión de la proteína de fusión conformada por el péptido señal LTB, 4 repetidos del péptido NANP y/ó la CSP recombinante y una forma truncada de la proteína ShdA (que comprende una porción del dominio α y el dominio β). La expresión proteica se analizó mediante SDS-PAGE, Western-blot. La presencia de NANP y CSP en la superficie bacteriana fue confirmada por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.

Los resultados obtenidos demuestran que ShdA es un autotransportador, por lo que esta proteína puede emplearse para expresar en la superficie de bacterias gramnegativas epitopos inmunogénicos y generar una respuesta inmune humoral, siendo esta una estrategia para el desarrollo de vacunas.

1. ANTECEDENTES

1.1. Introducción

En los últimos años, el genoma de algunas especies bacterianas se ha determinado y analizado (Hacker J et al., 2000) y el creciente entendimiento de los factores de virulencia de las bacterias, especialmente aquellos referentes a sus propiedades bioquímicas, regulación y modo de acción, permite el uso de nuevas e interesantes aplicaciones biotecnológicas. Algunos ejemplos de esto, es el desarrollo de vacunas basadas en las propiedades bioquímicas e inmunológicas de algunos factores de virulencia, producción de cadenas variables con distintas especificidades y librerías de péptidos para mapeo de epitopos ó pruebas de especificidad de anticuerpos. (Gentshev I et al., 1996, Rüsman H et al., 1998, Maurer J et al., 1997). Con respecto al desarrollo de vacunas, actualmente existe una intensa investigación empleando acarreadores bacterianos, es decir, bacterias que portan proteínas recombinantes (antígenos heterólogos) de otros microorganismos y que además, son capaces de inducir una respuesta inmune protectora en contra de dichos antígenos (Sirad JC et al., 1999). La localización del antígeno en el acarreador bacteriano, es quizás el factor más importante en la determinación de la calidad de la respuesta inmune inducida. Una gran proporción de antígenos que son secretados hacia el exterior de la bacteria, inducen respuestas de anticuerpos durante la infección bacteriana natural, lo que podría sugerir que los antígenos pasajeros secretados, son mucho más inmunogénicos que los antígenos pasajeros que permanecen en citoplasma (Verma NK, et al., 1995;

Hess J, et al.,1997; Wu S et al., 1997; et al., 1998; Gómez-Duarte OG et al., 2001). Esto ha impulsado la investigación para conocer más acerca de los mecanismos que rigen la traslocación de proteínas en bacterias.

1.1.1. Sistemas de secreción.

La secreción de proteínas se requiere para numerosos aspectos del ciclo de vida bacteriano que incluyen; la biogénesis de organelos, adquisición de nutrientes y expresión de factores de virulencia (Thanassi D., et al., 2000).

La interacción entre bacterias patógenas y su célula hospedera se caracteriza por la presencia de factores localizados en la superficie bacteriana o aquellos que son secretados hacia el espacio extracelular. Algunos de estos factores, especialmente los de naturaleza proteica exhiben una amplia variedad de funciones que incluyen: proteólisis, hemólisis, citotoxicidad y fosforilación de proteínas. Existe un número pequeño de rutas, por las cuales estas proteínas son transportadas del citoplasma al espacio extracelular (Hueck CJ., 1998). En este contexto, cabe aclarar que el término secreción, se refiere al transporte activo de proteínas desde el citoplasma, a través de las membranas interna (IM) y externa (OM), hacia la superficie bacteriana ó el exterior (sobrenadante bacteriano). Por otra parte, el término exportación es empleado para describir el transporte de proteínas de un compartimento a otro; por ejemplo del citoplasma hacia el espacio periplásmico (Pugsley A.,1993, Salmond G.,et al., 1993). Sin embargo, otros autores consideran que la secreción es un proceso en el cual, la proteína cruza la barrera

de la OM y que incluye la exportación de proteínas que permanecen ancladas en la superficie celular ó que son ensamblados en organelos de la superficie celular. (Thanassi et al., 2000).

A la fecha se han descrito cinco sistemas de secreción en bacterias gramnegativas (Henderson IR., et al., 1998, 2000a y 2000b). Tres de ellos (sistemas de secreción II, IV, V) se derivan de la ruta general de secreción (GSP), mediante la cual solo se exportan aquellas proteínas que posee una secuencia señal N-terminal, lo cual es un requisito indispensable para que el sistema **Sec** de la GSP pueda translocar las proteínas a través de la IM hacia el espacio periplásmico. Se dice entonces, que estos sistemas son **sec-dependientes**. El sistema **Sec** (ó complejo Sec translocasa) consta de chaperonas específicas, tales como la translocasa *Sec B*, la ATPasa *Sec A* y un complejo proteico integral de membrana conformado por al menos 6 subunidades: *Sec Y*, *Sec E*, *Sec D*, *Sec F*, *Sec G* y *YajC*. Cuando las proteínas son translocadas al periplasma, estas pueden sufrir plegamiento parcial ó total, debido a que en este compartimento, tiene lugar la formación de puentes disulfuro (Stathopoulos C., et al., 2000). De esta manera, las proteínas adquieren una nueva estructura en el periplasma que les permite atravesar la OM. Posteriormente la secreción a través de la OM, representa un problema diferente a la exportación de proteínas no plegadas. Se desconoce si están presentes moléculas de ATP ú otras fuentes de energía en la OM, pero es posible que los sistemas de exportación se autoadministren energía ó que dispongan de otros mecanismos para obtener energía a nivel de IM. (Thanassi D., et al., 2000).

Por otra parte, los otros dos sistemas de secreción (I y III), son **sec-independientes** y son capaces de exportar sustratos del citosol hacia el exterior de la bacteria de manera directa. Al menos tres rutas muestran mecanismos de secreción con probable biogénesis de organelos (Thanassi D., et al., 2000). A continuación, cada uno de ellos será revisado en detalle.

1.1.2. Sistema de secreción tipo I

El sistema de secreción tipo I ó ABC (de las siglas en inglés ATP-Binding-Cassette), es utilizado por bacterias gramnegativas para secretar toxinas, proteasas y lipasas (Binet R., et al., 1997). Los genes que codifican el aparato de secreción y la proteína por secretar, usualmente se encuentran agrupados. Los sistemas ABC son conservados en procariotes y eucariotes, contribuyen a exportar antibióticos y compuestos tóxicos. Su principal característica es que son Sec-independientes, ya que secretan proteínas del citoplasma através de la OM sin pasar por un intermediario periplásmico. Los sustratos que pasan por esta ruta, carecen de una secuencia señal clásica amino-terminal, por lo que no están sujetas a corte proteolítico, (Hueck C., et al., 1998) pero poseen una secuencia señal de secreción carboxilo-terminal de aproximadamente 60 aminoácidos (Thanabalu T., et al., 1998). Al ser un sistema Sec-independiente, necesita de proteínas accesorias codificadas por genes que están generalmente contiguos a los genes de la proteína estructural (Wagner W., et al., 1983, Schneider E., et al., 1998).

El aparato exportador tipo I consta de 3 proteínas: un exportador ABC en la IM (una ATPasa de IM que proporciona la energía), una proteína anclada en la IM que se extiende hasta el periplasma y que se llama proteína de fusión de

membrana (MFP). Finalmente, el último componente de este sistema es una proteína de membrana externa (OMP) (Fig 1).

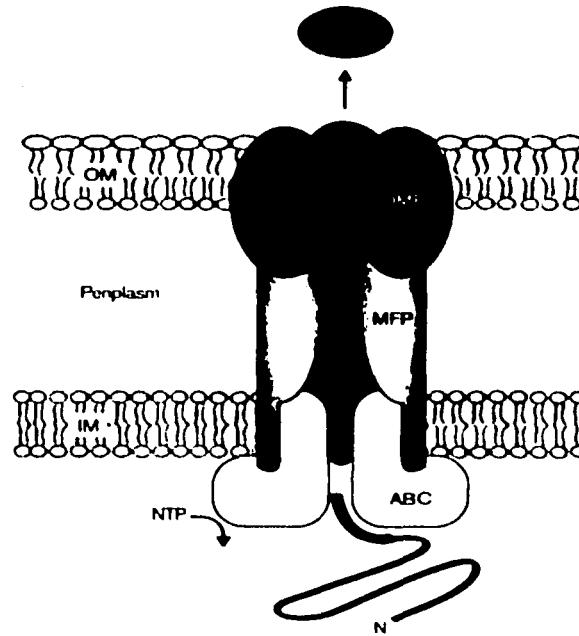


Fig 1. Modelo del tipo de secreción tipo I. El sustrato no posee una secuencia señal N-terminal reconocida por el sistema Sec, pero posee una secuencia señal C-terminal que no es cortada. Durante la secreción, la MFP periplásmica interactúa con el exportador ABC (de la IM) y con la proteína formadora de canal (OMP), permitiendo la secreción al medio extracelular sin pasar por un intermediario periplásmico. La MFP y la OMP se ensamblan como trimeros. (tomada de Thanassi DG, et al. *Curr Opin Cell Biol.* 2000. 12: 420-430)

La secreción de la α -hemolisina de *Escherichia coli* (HlyA), es el prototipo de este tipo de secreción. En este caso, la OMP llamada TolC, se encuentra arreglada como un complejo trimérico en la OM y se cree que consiste de una porina parecida al dominio β -barril de la membrana con una región hidrofílica C-terminal que se extiende en el periplasma (Koronakis V., et al., 1997).

La proteína TolC, presumiblemente funciona como canal secretor en la OM, ya que posee actividad formadora de poro. El componente periplásmico MFP también se ensambla como trimero e interactúa tanto con la OMP, como con el exportador ABC. Por otra parte, la MPF es necesaria para facilitar la secreción del sustrato sin que este pase por un intermediario periplásmico, mediante la formación de un puente ó un canal a través del periplasma, ó quizá por la fusión de la IM con la OM, permitiendo el contacto directo del exportador ABC y el canal OMP (Thanabalu T., et al., 1998; Letoffe S., et al., 1996). Actualmente se conocen 2 proteínas de transporte específico: HlyB y HlyD localizadas en IM. La señal de secreción en HlyA necesaria para el reconocimiento de la maquinaria, se localiza en el extremo C-terminal de HlyA y consta de al menos 46 a 60 aminoácidos (Jarchau T., et al., 1994; Koronakis V., et al., 1997).

La α -hemolisina (HlyA), es un factor de virulencia presente en *Escherichia coli*, muy frecuente en aislados de pacientes con pielonefritis. Se ha observado que la HlyA es secretada por una maquinaria de transporte proteico único (Noegel A., et al., 1979; Wagner W., et al., 1983). En un principio se creía que esta maquinaria, estaba únicamente adaptada para la secreción de la toxina HlyA y no era aplicable a otras proteínas. Otros ejemplos de proteínas secretadas por el sistema tipo I son: la

adenilato-ciclase de *Bordetella pertusis*, la leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* y las proteasas de *P. aeruginosa* y de *Erwinia chrysanthemy*. (Hacker J & Kaper J, 2000).

Empleando este sistema de secreción, se han desarrollado herramientas para secretar antígenos recombinantes hacia el medio externo. Algunos de los ejemplos de estas aplicaciones son: la utilización del operón que dirige la secreción de la hemolisina α de *Escherichia coli* logrando secretar antígenos recombinantes del género *Salmonella* con fines vacunales (Gentschev I., et al., 1996).

1.1.3. Sistema de secreción tipo II

El tipo de secreción tipo II, ejemplificado por la secreción de polianasa (Pul) de *Klebsiella oxytoca*, es un proceso de dos pasos. Primero las proteínas son translocadas a través de la IM vía *sistema sec* de la GSP; y una vez en periplasma, la secuencia señal amino-terminal es cortada proteolíticamente. El segundo paso lo constituye el transporte a través de la OM, el cual es mediado por un aparato de secreción separado llamado **secretón** (Stathopoulos C., et al., 2000). Este último sistema está compuesto de 12 a 16 proteínas. entre las cuales figuran 2 componentes de OM y que de manera general se conocen como **GspD** y **GspS**. La primera es una OMP integral y la segunda es una lipoproteína que se requiere para sostener la inserción de GspD en la OM. (Nouwen N., et al., 1998). GspD pertenece a la superfamilia de las secretinas, cuyos miembros también intervienen en la biogénesis del pili tipo 4, en la biogénesis de fago filamentoso (f-1) e inclusive en el tipo de secreción tipo III. (Genin S., et al., 1994).

Para el caso específico de la secreción de la polulanasa (Pul) de *Klebsiella oxytoca* (el mejor ejemplo estudiado del sistema de secreción tipo II), 7 de las 14 proteínas accesorias están localizadas en la IM, mientras que en la OM están **PulS** y **PulD**, este último, notablemente conservado en muchos sistemas de transporte de gramnegativos. (Pugley AP., 1993; Hueck C., 1998). Adicionalmente, PulD está considerada como una secretina, las imágenes obtenidas por microscopía electrónica, revelan que forma un complejo con la lipoproteína PulS. El complejo resultante se llama PulSD, que al igual que otras secretinas (de *Pseudomonas aeruginosa* y el fago f-1) forman canales en bicapas lipídicas experimentales. Existe una fuerte evidencia de un canal de entrada (Nouwen N., et al., 1999, Marciano DK., et al., 1999, Brok R., et al., 1999, Thanassi DG., et al., 2000). La mitad del extremo N-terminal de las secretinas pueden servir como un canal de entrada, mientras que el extremo C-terminal parece dirigir la oligomerización, además de poseer actividad formadora de poro. (Brok R., et al., 1999, Guilvout I., 1999; Thanassi DG., et al., 2000).

Otro de los aspectos relevantes del sistema de secreción tipo II, es que los genes que codifican sus componentes, se encuentran arreglados de tal forma que permanecen conservados en muchas bacterias (Nunn DN., 1999). Las exoproteínas que utilizan este sistema, son sintetizadas con un péptido líder típico, el cual es translocado primero al espacio periplásmico. Los intermediarios periplásmicos de las exoproteínas fácilmente se acumulan en bacterias mutantes en estos sistemas de exportación, por lo que sufren un plegamiento completo a nivel del mismo periplasma. (Strom MS., et al., 1991; Pugley AP., et al., 1991; Poquet I., et al., 1993; Sandkvist M., et al., 1997) y en algunos casos, oligomerización. Las

exoproteínas acumuladas pueden ser sujetas a remoción del periplasma por restauración de una maquinaria de exporte funcional, lo que indica que las exoproteínas pueden emplear la maquinaria desde el compartimento celular, una característica que hasta ahora solo se conoce en este tipo de secreción (Pugley AP, et al., 1991; Poquet I., et al., 1993; Sandkvist M., et al., 1997; Letellier L., et al., 1997).

El sistema de secreción tipo II conforma la primera ruta de secreción de enzimas proteolíticas extracelulares, llevada a cabo por bacterias gramnegativas. Por otra parte, algunas partes del sistema de secreción tipo II guardan homología con subunidades estructurales (pil A) y otros sistemas de transporte (fig 2); como el ensamble ó biogénesis de pili tipo 4 (N-metil-fenilalanina) de *Pseudomonas aeruginosa* y de otras bacterias. También existe homología con los sistemas de transferencia de DNA en *Haemophilus influenzae* y *Bacillus subtilis* (Hobbs M., et al., 1993). También este tipo de secreción es utilizada por gramnegativos para secretar factores de virulencia (Hueck C., 1998).

Otros ejemplos del tipo de secreción tipo II, incluyen la secreción de pectinasas, celulasas, exotoxina A, fosfolipasa C por *Pseudomonas aeruginosa*, amilasa y proteasas por *Aeromonas hydrophila* etc., secreción de poligalacturonasa por *Xantomonas campestris* xps.

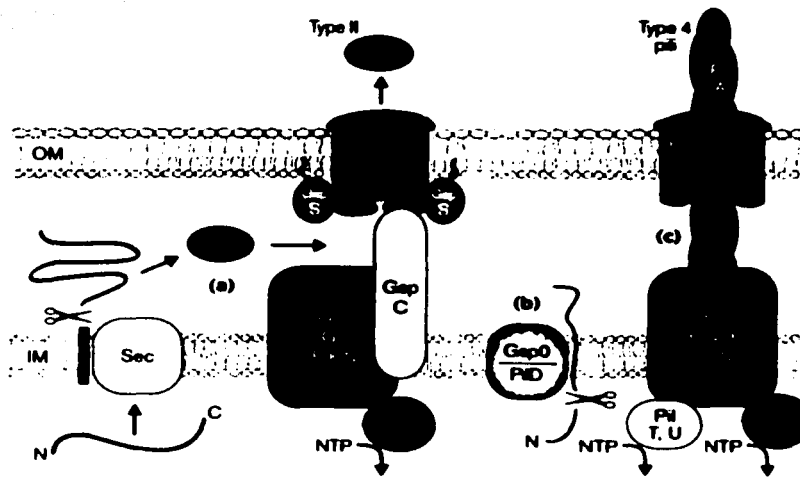


Fig 2. Modelo del tipo de secreción tipo II y su comparación con la biogénesis del pili tipo 4. Los componentes del sistema de secreción tipo II (secretón) se indican dentro de Gsp. (a) indica cómo los sustratos que pasan por el sistema de secreción II, atraviesan la IM vía Sec, una vez que se corta la secuencia señal y subsecuentemente, la proteína pasa al periplasma. Las secretinas GspD y GspS forman un complejo para formar el canal de la secreción. GspC transmite la energía necesaria desde la IM y generada en el citoplasma, hasta la OM. Por otra parte, Gsp G-J muestra alta homología con la subunidad del pili llamada PilA. Tomada de *Curr Opin Cell Biol.* 2000. 12: 420-430.

1.1.4. Sistema de secreción tipo III

El sistema de secreción tipo III es capaz de inyectar factores de virulencia hacia el citosol de muchas células eucariotas. También puede transportar DNA, solo que no puede hacerlo como polímero. Existe una asociación entre el fenotipo y la enfermedad producida por patógenos que poseen este sistema de secreción (tabla 1). Este sistema, ha sido identificado en muchas bacterias patógenas para plantas y animales.

Sistema tipo III	Fenotipo asociado	Enfermedad asociada
<i>S.typhimurium</i> -SPI-1	Invasión de células no fagocíticas, inducción de apoptosis en macrófagos	Envenenamiento por alimentos Fiebre tifoidea
<i>S.typhimurium</i> -SPI-2	Sobrevivencia dentro del macrófago Infección sistémica	Envenenamiento por alimentos Fiebre tifoidea
<i>Shigella spp.</i>	Invasión de células no fagocíticas Inducción de apoptosis en macrófagos	Disenteria
<i>Yersinia spp.</i>	Efecto antifagocítico, Inducción de apoptosis en macrófagos inhibición de la producción de citocinas	Gastroenteritis plaga
<i>P. aeruginosa</i>	Antifagocitosis y citotoxicidad	Infecciones de tipo Oportunista
EPEC	Ataque y destrucción de células epiteliales intestinales	diarrea en infantes

Tabla 1. Fenotipos bacterianos y enfermedades asociadas donde está implicado el sistema de secreción tipo III. Fuente: *Cell Mol Life Sci* (2000): 1033-1049.

Se piensa que la translocación de algunos factores de virulencia está regulada por el contacto de la bacteria con la superficie de la célula huésped (al menos en algunos casos) y que este sistema de secreción es el más conservado y adaptado que existe para secretar factores de virulencia (Hueck C., 1998). Su principal característica es el ser **Sec-independiente**, ya que la secreción del factor de virulencia, puede llevarse a cabo sin la producción de un intermediario periplásmico. Requiere de 20 componentes de secreción ensamblados en una gran estructura, que se extiende tanto a membranas bacterianas y posiblemente a la membrana celular de la célula huésped (Fig 3). Requiere de la chaperona citoplásmica Syc.

La mayoría de los componentes del sistema de secreción III se encuentran en la IM. Estos últimos, parecen estar sumamente relacionados con los

componentes de los 5 cuerpos basales flagelares (Hueck C., 1998, Sukhan A., 2000). Uno de ellos es el cuerpo basal flagelar, el cual contiene la maquinaria que dirige la secreción y el ensamble del flagelo vía hidrólisis de ATP. La maquinaria exporta monómeros de flagelina a través de un canal central dentro del mismo cuerpo flagelar basal, para formar el flagelo, que finalmente se extiende a través de las IM y OM. Este flagelo inyectará a la célula blanco, el factor de virulencia (Young GM., et al.,1999; Hueck C.,1998).

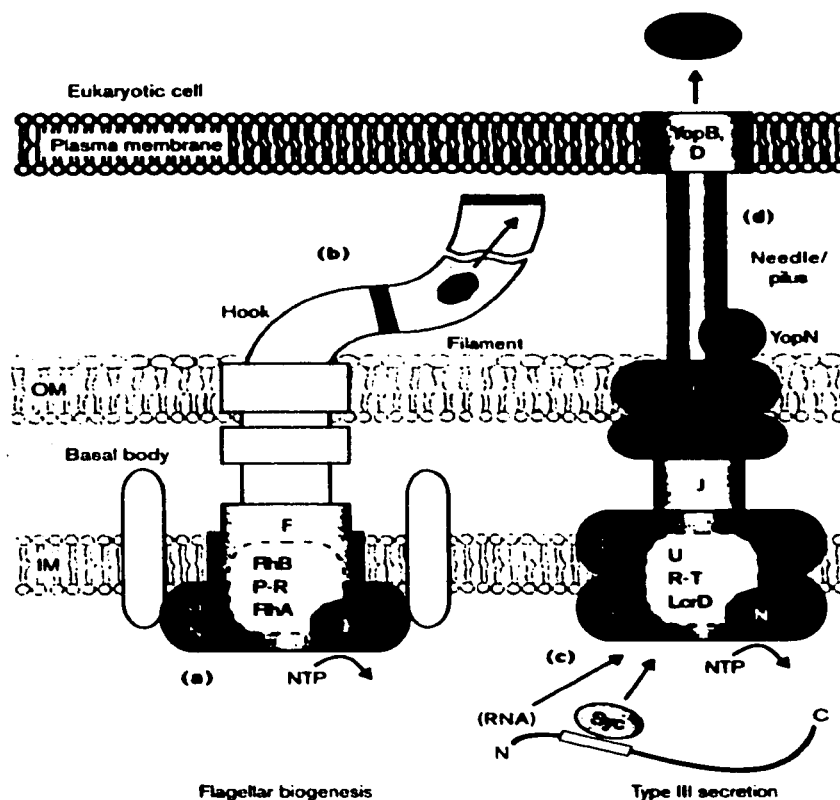


Fig 3. Modelo del sistema de secreción tipo III. Tomada de *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12: 420-430.

El prototipo clásico de este tipo de secreción lo constituyen las proteínas externas de *Yersinia* (**Yops**, por sus siglas en inglés) . La translocación de las Yops en el citosol de la célula huésped, interrumpe algunas rutas de señalización, permitiendo a la bacteria evadir mecanismos de defensa del huésped. Lo anterior es posible, ya que el sistema de secreción tipo III de *Yersinia spp* tiene efectos antifagocíticos. Adicionalmente, se encuentran algunas proteínas con actividad de tirosín fosfatasa, una de ellas es la proteína **YopH** (Guan K., et al., 1990; Andersson K., et al.,1996; Fällmann M., et al., 1995; Rosqvist R., et al., 1988). Después del contacto de la bacteria con el macrófago, YopH es inyectada en el citosol de la célula huésped, donde cataliza rápida y específicamente la desfosforilación de algunas proteínas del macrófago que son necesarias para llevar a cabo una fagocitosis normal (Andersson K., et al., 1996).

En el caso de *Salmonella ssp.*, un género bacteriano que infecta una amplia variedad de vertebrados, causándoles un amplia variedad de enfermedades gastroenteritis, fiebre entérica, septicemia, entre otras (Galán JE., 1996; House D., et al., 2001), poseen el sistema de secreción tipo III, el cual es codificado por 2 grupos de genes distintos llamados SPI-1 y SPI-2 (de las siglas en inglés *Salmonella* pathogenicity island) ó islas de patogenicidad de *Salmonella* (Hueck C.,1998). Este sistema de secreción, es utilizado por *Salmonella typhimurium*, para invadir células intestinales epiteliales no fagocíticas. El solo contacto de *S. typhimurium* con la célula huésped, activa su sistema de secreción tipo III, y subsecuentemente se liberan las proteínas efectoras (factores de virulencia) hacia el citosol de la célula huésped, en donde la estimulación de rutas de señalización intracelular producen una variedad

de repuestas como una reorganización en la actina del citoesqueleto y activación de factores de transcripción (Galán JE., 1996).

Otro de los aspectos importantes en torno a este sistema de secreción, es que el conocimiento generado acerca del sistema de secreción tipo III, ha proporcionado herramientas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y vacunales. Se han construido cepas de *Salmonella typhimurium* atenuadas para liberar antígenos heterólogos, vía sistema de secreción tipo III, capaces de inducir respuesta inmune mucosal y sistémica después de la administración oral (Kantele A., et al., 1997; Levine M., et al., 1996). El empleo de bacterias atenuadas, ofrece ventajas como el ataque a células no-fagocíticas, tales como las células epiteliales de intestino (Galán JE., 1996; Rüsman H., et al., 1998).

1.1.5. Sistema de secreción tipo IV

El sistema de secreción tipo IV, lo constituyen las proteínas capaces de transportar proteínas y DNA a través de la envoltura bacteriana hacia la célula huésped. Es el único sistema de secreción que puede transportar el DNA en forma de polímero (Christie PJ., et al., 1998). Ocurre en un solo paso y requiere de por lo menos de 11 diferentes proteínas (Sukhan A., 2000). Fue recientemente identificado en rutas de secreción proteica homóloga a los sistemas de conjugación, en la exportación de la toxina pertúsica (PT) de *Bordetella pertussis* (Weiss AA., et al., 1993; Covacci A., et al., 1997; Vogel JP., 1998; Segal G., et al., 1998), así como en el sistema *Vir B* (ó pili *VirB*) de *Agrobacterium tumefaciens*

(Christie P.J., 1997), en donde se facilita la translocación de T-DNA oncogénico en células vegetales.

La mayoría de los sistemas de secreción tipo IV transfieren DNA teniendo como intermediario de la conjugación, ssDNA asociado a proteínas, y no DNA desnudo (Christie P.J., 1998).

El transporte de DNA mediante el sistema VirB y otros sistemas conjugales se lleva a cabo en un solo paso desde el citoplasma hacia la cara externa de la célula. Se especula que el pili VirB regula el contacto célula-célula y proporciona un canal para la translocación del T-DNA en la célula huésped (Thanassi D., et al., 2000). Sin embargo, en el caso de la secreción de la PT hay 2 pasos, primero las subunidades de la toxina, deben atravesar la IM vía sistema Sec y posteriormente ser translocadas a la cara externa de la célula (Burns D.L., 1999). Además este sistema implica la acción coordinada de 9 proteínas asociadas a las IM y OM.

Por otra parte, es importante señalar que existen similitudes entre los sistemas de secreción tipo III y IV, las cuales son:

- 1) Ambos sistemas requieren del contacto con la célula huésped.
- 2) Necesitan acoplamiento de proteínas chaperonas.
- 3) Elaboran pilis extracelulares ó filamentos que contribuyen a la translocación del sustrato.

Otros ejemplos de proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo IV son proteínas monoméricas como la primasa RecA, proteínas VirE2 y VirF de *Agrobacterium tumefaciens* y la proteína CagA de *Helicobacter pylori* (Christie P.J., 1998).

1.1.6. Sistema de secreción tipo V: AUTOTRANSPORTADORES.

Es el sistema de secreción más reciente que se conoce y el que comprende una familia creciente de proteínas conocidas con el nombre de autotransportadores (ATs), (Henderson IR., et al., 2000b). En comparación con los otros complejos sistemas de secreción, los ATs representan un mecanismo de secreción simple, ya que aparentemente no necesitan de moléculas accesorias para translocar proteínas hacia la OM ó al medio exterior ya que ellos mismos dirigen el paso de la molécula por secretar (de aquí la designación del término autotransportador). Han sido identificados a lo largo del árbol evolutivo de las bacterias gramnegativas, transferidos de manera horizontal, lo que se ilustra claramente con el primer ATs descrito, la proteasa de IgA1 (IgA1P) de *Neisseria gonorrhoeae*, y que también está presente en *Haemophilis influenza* (Henderson IR., et al., 1998, 2000a, 2000b, 2001).

El modelo clásico de los ATs (fig. 4a) describe que las proteínas secretadas mediante este tipo de secreción (V), poseen 3 dominios: una secuencia señal N-terminal, un dominio pasajero α (que es la proteína madura por translocar ó por secretar) y un dominio β (ó C-terminal). Este último dominio, posee 14 estructuras de hojas β -plegadas anfipáticas y que a su vez, conforman una estructura de β -barril con un poro central por el cual pasa el dominio pasajero α , para ser translocado hacia la superficie celular. El carácter anfipático de las hojas β -plegadas permite al β -barril anclarse en la OM. (Henderson IR., et al., 1998; 2000). Por otra parte, el carácter hidrofílico del poro permite la translocación de un dominio pasajero (Klauser T., et al., 1990).

Existe una restricción biofísica en este sistema de secreción, ya que el paso del dominio pasajero a través del poro, está limitado por las propiedades estructurales de la proteína (Henderson IR., et al., 1998). Aquellas estructuras terciarias formadas artificialmente como proteínas de fusión y que forman puentes de disulfuro, conduce a un plegamiento de la proteína, produciendo un bloqueo en el proceso de translocación, tal es el caso de la proteína DsbA. Sin embargo esto no ocurre en todos los casos, la secreción de polulanasa de *Klebsiella oxytoca*, el intermediario periplásmico con puentes de disulfuro, es un prerrequisito para una translocación efectiva hacia la OM (Klauser T., et al., 1993). Más aún, algunos dominios pasajeros homólogos y heterólogos pueden ser translocados, aún después de ser plegados por chaperonas citoplásmicas (Veiga E., et al., 1999; Brandon LD., et al., 2001).

Recientemente, una investigación sobre la oligomerización y capacidad para formar poros del dominio C de la proteasa de IgA1 (C-IgA1P) de *Neisseria gonorrhoeae*, se descubrió que esta porción del ATs, se ensambla como una estructura oligomérica con un poro central hidrofílico y semejante a un anillo (formado entre los monómeros de estructuras β -barril) por el cual se secreta el dominio α (Veiga E., et al., 2002). Estos hallazgos difieren del modelo clásico de los ATs básicamente, en que el modelo clásico describe una estructura única y monomérica, mientras que para el caso del C-IgA1P, se describe a una estructura oligomérica, cuyo conducto de translocación es aquel poro formado por todas los monómeros y no el poro central de cada β -barril monomérico descrito en el modelo clásico.

Resumiendo, la estructura de los ATs comprende:

- a) Secuencia señal, líder ó extremo N-terminal (indispensable para atravesar la IM), y que presumiblemente es removida después de que la proteína es translocada desde la IM hasta el espacio periplásmico, mediante la vía *sec.* (Henderson IR., et al., 1998).
- b) Dominio α ó dominio pasajero (la proteína madura por secretar).
- c) Dominio β ó extremo C-terminal, el cual tiene la función transportadora y que además, se ensambla como un complejo oligomérico con un poro central hidrofílico (semejante a un anillo) a nivel de OM. Este poro sirve de conducto, para secretar el dominio pasajero. (Veiga E., et al., 2002).

Para el caso de C-IgA1P, un mínimo de 6 monómeros se ensamblan para formar el complejo oligomérico (fig. 6b). El poro hidrofílico central, mide aproximadamente 2 nm de diámetro.

Cuando el dominio pasajero atraviesa la IM, la proproteína autotransportadora existe como intermediario periplásmico. No se sabe por qué el intermediario periplásmico no es susceptible a la degradación enzimática a nivel de periplasma. Una hipótesis es que, el intermediario periplásmico forma un complejo con chaperonas periplásmicas ó que el mismo intermediario periplásmico tiene características de autochaperona, (Pugsley AP., 1993). Una vez que el dominio pasajero es translocado a la superficie bacteriana, el destino del dominio pasajero diverge: puede permanecer ligado a la OM, ó puede ser cortado por otras proteasas, ó ser liberado al medio exterior por un mecanismo autocatalítico (Henderson IR., et al., 1998).

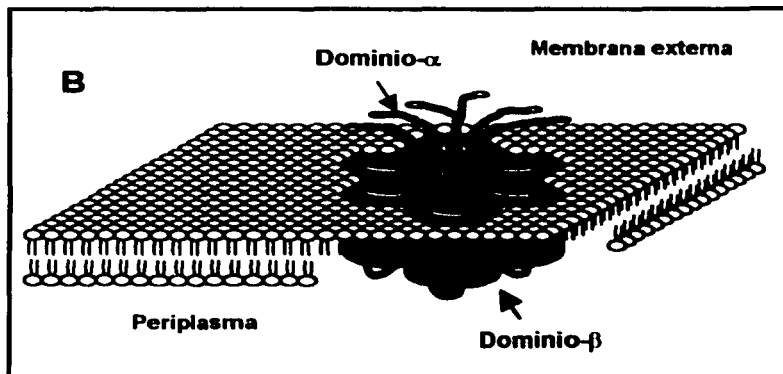
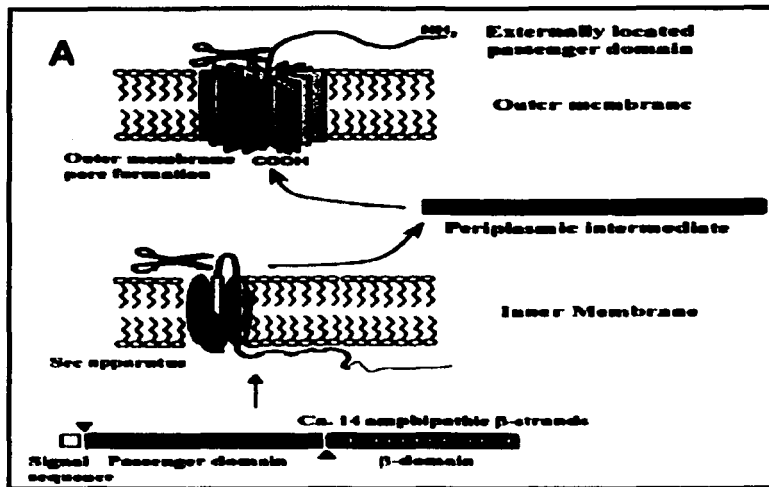


Fig. 4. Modelos de autotransportadores. A) Modelo clásico. Una vez en IM, la secuencia señal es cortada y el dominio β se inserta en la OM en una estructura de β -barril que biofísicamente favorecida, forma un poro en la OM. El poro sirve de conducto para translocar el dominio pasajero. B) Modelo de secreción tipo V (Autotransportador) en el C-IgAP de *Neisseria gonorrhoeae*. Las proteínas ATs se ensamblan en la OM como un complejo oligomérico semejante a un anillo. Un mínimo de 6 monómeros se ensamblan en este complejo. El dominio pasajero N-terminal está dibujado como un óvalo; mientras que el dominio C-terminal (transportador), está representado como un cilindro anclado en la bicapa lipídica de la OM. El dominio N-terminal, es translocado del periplasma al medio externo, mediante un poro central hidrofílico. (Tomados de *Trends in Microbiology*. 1998. 6 (9): 370-378 y *EMBO J.* 2002. 21 (9): 2122-2131), respectivamente).

En el caso del ATs **AIDA-I** de *Escherichia coli*, el dominio pasajero es cortado por una proteasa de OM, pero puede permanecer en contacto con la superficie bacteriana, mediante una interacción no-covalente con el dominio β (Benz I., et al., 1992). En el caso del ATs proteasa de IgA1 (IgA1P), el dominio pasajero de es liberado al medio externo, después de ser cortado proteolíticamente, (Pohlner J., et al., 1987). Cabe subrayar que el corte del dominio β está mucho más asociado con la función fisiológica de la proteína (Henderson-Nataro, 1998).

Por otra parte, la capacidad que tienen los ATs, para translocar una amplia variedad de proteínas ó péptidos heterólogos (dominio pasajero) hacia la superficie celular, ha sido extensivamente aprovechada, ya que no se requiere de la participación de proteínas accesorias, además de que una las grandes ventajas de emplear los ATs, es que los dominios pasajeros mantienen su antigenicidad y sus funciones biológicas. (Ruiz-Pérez F., et al., 2002). Ejemplo de ello es el uso de IgA1-P y AIDA-1 para translocar la subunidad B de la toxina del cólera en las superficies de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Klauser T., et al.,1993; Maurer J., et al., 1997; Lattemann CT., et al., 2000).

Los trabajos realizados en nuestro grupo de trabajo, constituyen otro ejemplo: el uso de la secuencia señal LTB fusionado al ATs MisL de *Salmonella typhimurium* para translocar el péptido heterólogo NANP (Ruiz-Pérez F., et al., 2002).

Otras aplicaciones de los autotransportadores incluyen:

- a) Desarrollo de vacunas orales usando cepas bacterianas recombinantes (vivas y atenuadas).

- b) Construcciones de absorbentes bacterianos completos.
- c) Exporte de dominios proteicos para estudios de interacciones receptor-ligando.
- d) Exposición de péptidos para la creación de librerías.
- e) Exportación de proteínas biológicamente activas con fines terapéuticos y biotecnológicos (Lattemann CT., et al., 2000).

1.2. Funciones de virulencia de los ATs.

Se han identificado cerca de 40 proteínas con funciones autotransportadoras (Henderson IR & Nataro J, 2000). La gran mayoría son codificadas por genes sencillos, localizados en islas de patogenicidad (véase más adelante) y sus funciones como factores de virulencia están implicadas principalmente en procesos de proteólisis y adhesión. Algunas de las funciones de los dominios pasajeros que han sido caracterizadas, se enlistan en la tabla 2.

Uno de los aspectos filogenéticos relevantes de los ATs es que, el hecho de que este tipo de secreción sea adquirido por un evento de recombinación sencilla horizontal, representa para la bacteria una gran oportunidad de incrementar su patogenicidad, ya que un factor de virulencia localizado en periplasma, al ser exportado por un ATs, se favorece la interacción directa con el huésped. Por otra parte, los géneros *Neisseria* y *Haemophilus* localizados en diferentes ramas del árbol evolutivo (Henderson IR., et al., 2001), poseen el ATs IgA1-P, el cual es un ATs capaz de cortar la región H de la IgA1 de secreción (IgA1s) y LAMP1 (una de las principales glicoproteínas integrales de membrana) propiedad que contribuye a la reproducción intracelular de la bacteria (Hauck CR., et al., 1997; Lin L., et al., 1997) además de exhibir propiedades inmunoestimuladoras contribuyendo

sustancialmente a la patogénesis de las infecciones por *Neisseria*, por inducción de la liberación de TNF- α y otras citocinas proinflamatorias (Jose J., et al., 2000; Lorenzen DR., et al., 1999).

Otro ejemplo es el ATs de 120 kDa **IcsA** (ó **VirG**) de *Shigella flexneri*, que causa diarrea por invasión directa del epitelio del colon, disparando una respuesta inflamatoria localizada. Una vez en el interior de la célula huésped, *Shigella flexneri* lisa la vacuola fagocítica liberando su contenido hacia el citoplasma. Aquí la bacteria se establece en el citoesqueleto de la célula huésped para moverse de una célula a la siguiente. IcsA permite esta motilidad intracelular por medio de una continua polimerización de la actina, mientras que la bacteria se propaga hacia la célula adyacente (Sansonetti PJ., 1991; Goldberg MB., et al., 1993a, 1993b; 1995; Sansonetti PJ., et al., 1998)

Tabla 2. Funciones de los dominios pasajeros de los ATs. (Tomada de *Infect & Immun.* 2001. 69(3):1231-1243).

Organismo	Proteína	Función
<i>Bordetella spp</i>	Pertactina BrkA TcfA Vag8	Adhesina Resistencia a suero Adhesina ¿Adhesina?
<i>Dichelobacter nodosus</i>	BprV BprB AprV2 BprX	¿Elastasa? ¿Elastasa? ¿Elastasa? ¿Elastasa?
<i>Escherichia coli</i>	EspP Pet Sat Tsh Pic AIDA-1 TibA Ag43	Toxina proteolítica Toxina proteolítica Toxina proteolítica Hemaglutinina/Unión a Hb Mucinas Adhesina Adhesina Adhesina/formación de Biopelículas.
<i>Haemophilus influenza</i>	Proteasa de IgA1 Hap Hia Hsf	Corte de IgA1 Adhesina/Proteasa Adhesina Adhesina
<i>Helicobacter mustelae</i>	Hsr	¿Capa S?
<i>Helicobacter pylori</i>	VacA	Toxina
<i>Moraxella catarrhalis</i>	UspA1 UspA2 UspA2h	Adhesina Resistencia a suero Adhesina
<i>Neisseria spp.</i>	Proteasa de IgA1	Corte de IgA1
<i>Pasteurella haemolytica</i>	Ssa1	Proteasa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EstA	Esterasa
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PspA	Proteasa
<i>Rickettsiales</i>	rOmpA rOmpB	Adhesina Capa S/ Adhesina
<i>Salmonella entérica (serotipo typhimurium)</i>	ApeE	Esterasa
<i>Serratia marcescens</i>	PrnS PrnT Ssp-H1 Ssp-H2	Proteasa Proteasa Proteasa Proteasa
<i>Shigella flexneri</i>	SepA Pic SigA icsA	Proteasa/ Invasión Inflamación. Mucinas Toxina proteolítica Mediador de motilidad intracelular
<i>Xenorhabdus luminescens</i>	PlaA	Lipasa

1.3. Factores de virulencia e Islas de patogenicidad.

Los factores de virulencia de bacterias patógenas para el hombre, animales y plantas (adhesinas, toxinas, invasinas, sistemas de secreción proteica), son codificados por regiones particulares del genoma procarionte, llamadas **islas de patogenicidad (PAIs)** (fig 5). La mayoría se encuentran a nivel de cromosoma bacteriano, pero también se han identificado PAIs en plásmidos bacterianos y fagos. Contienen particularmente genes que codifican integrasas, factores de virulencia y transposasas, entre otros. No están presentes en los genomas de las bacterias no patógenas, aún en especies muy relacionadas. También muchas de estas islas de patogenicidad, codifican funciones accesorias para la resistencia a antibióticos, propiedades implicadas en simbiosis. Su estructura, les permite transferirse genéticamente de manera horizontal (ó lateral), lo que genera nuevas variantes genéticas, variantes patógenas, además de contribuir en el proceso evolutivo de especies y en la adaptación de las bacterias patógenas. (Hacker J., et al., 2000).

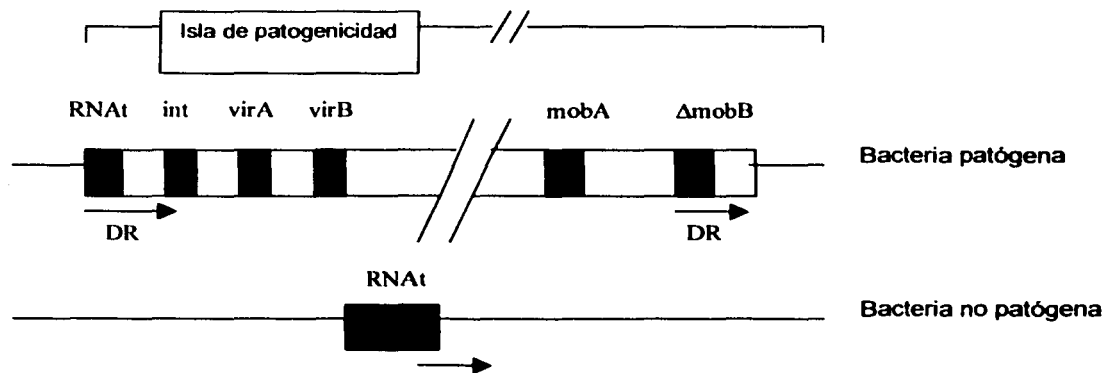


Fig. 5. Modelo de una isla de patogenicidad bacteriana. Los cuadros oscuros representan a los genes. Las flechas indican la presencia de repeticiones directas (DR) en los extremos de la isla de patogenicidad. Las abreviaciones son: gen de la integrasa (int), gen-asociado a virulencia (vir), gen de movilidad (mob), gen de pseudomovilidad (Δ mob). Cabe mencionar que el gen mob también codifica para integrasas, transposasas y otras proteínas implicadas en la movilidad del genoma procarionte. Tomado de *Annu Rev Microbiol.* 2000. 54:641-649.

En el caso de la bacteria gramnegativa *Salmonella entérica*, responsable de una variedad de enfermedades, incluyendo gastritis y fiebre tifoidea, dependiendo del serotipo, algunas de estas enfermedades son causadas por los determinantes de patogenicidad. Estos determinantes ó factores de virulencia están agrupados dentro de las islas de patogenicidad que, para el caso de *Salmonella spp.*, reciben el nombre de **SPI**, (por sus siglas en inglés). Se han identificado 5 SPI (Blanc-Potard AB., et al., 1999). Las características de cada una se agrupan en la tabla 3.

SPI	Localización	Tamaño	Funciones que codifica
SPI-1	63 min	40 kb	Adhesión e invasión a células epiteliales Inducción de apoptosis en macrófagos Inducción del reclutamiento de macrófagos. Inducción de la secreción de fluido intestinal. Sistema de secreción tipo III
SPI-2	31 min, río abajo del tRNA de valina.	40 kb	Sobrevivencia dentro del macrófago Infección sistémica. Sistema de secreción tipo III
SPI-3	82 min ,después del gen <i>sefC</i>	17 kb	Sobrevivencia dentro del macrófago (gen responsable: <i>mgfC</i>), virulencia en ratón. Codifica para el ATs <i>Mis L</i> Codifica un total de 10 genes, 2 de ellos tienen homología con otros factores de virulencia.
SPI-4	92 min	27 kb	Sobrevivencia dentro de macrófago
SPI-5	20 min, río abajo del tRNA de serina.	?	Enteropatogénesis

Tabla 3. Características generales de las islas de patogenicidad de *Salmonella entérica* (SPI). Datos obtenidos de *Journal of Bacteriology*, 1999. Vol 181(3): 998-1004, *Infection and Immunity* Vol. 66(10): 4579-4587 y *Cell Mol Life Sci* 2000 Vol. 57: 1033-1049.

1.4. El autotransportador MisL de *Salmonella typhimurium*.

Recientes investigaciones han identificado la proteína de membrana de inserción y secreción (**Mis L**), que hasta ahora, es el único autotransportador que se conoce en *Salmonella typhimurium*. El gen que codifica esta proteína se encuentra dentro de la SPI-3, un aspecto muy importante que podría colocarlo dentro de los factores de virulencia, (Blanc-Potard AB., et al., 1999; Henderson IR., et al., 2001).

Por otra parte, MisL exhibe una importante similitud con otros ATs como, AIDA-1 y IgA1-P (Jose J., et al., 1995; Maurer J., et al., 1997), siendo el extremo C-terminal (C-MisL) el dominio β translocador y la región donde se presenta el alto grado de homología.

En base a estos datos, Ruíz-Pérez F y cols., demostraron que el dominio β de MisL, puede translocar y exponer el epítipo heterólogo inmunodominante de células B conocido como proteína circunsporozoítica (**CSP**) de *Plasmodium falciparum* y la repetición central de ésta (el péptido **NANP**), hacia la superficie de *Salmonella entérica* serotipo *Typhimurium* (serotipo *Typhimurium* SL3261) y serotipo *Typhi* (Serotipo *Typhi* CVD908). Los antígenos heterólogos (CSP y NANP) indujeron una respuesta inmune específica y de tipo humoral en ratones BALB/c. Los anticuerpos producidos por estos ratones después de la infección, fueron capaces de reconocer la CSP nativa de esporozoítos de *Plasmodium falciparum* (Ruiz-Pérez F., et al., 2002).

1.5. La proteína ShdA.

El gen *shdA*, recientemente identificado, específicamente en *Salmonella entérica* subespecie 1. Se encuentra localizado en una isla de patogenicidad a 55 min (localización diferente de SPI-1, SPI-2 y SPI-3). No se encuentra en *Salmonella entérica* subespecies II-VII ni en *S. bongori*. El producto del gen es una proteína llamada **ShdA**, cuya secuencia aminoacídica muestra homología con proteínas de membrana externa de la familia de los ATs, tales como AIDA-1 de *Escherichia coli*, *IcsA* (*VirG*) de *Shigella flexneri*.

Presenta una homología de un 34% con el extremo C-terminal de AIDA-1 (440 aminoácidos); un 36% de identidad con el extremo C-terminal de MisL y un 30% de homología con *IcsA* de *Shigella flexneri* (353 aminoácidos). El extremo N-terminal de ShdA (aminoácidos 61-1558) no mostró homología a los otros dominios de los ATs anteriormente citados, por lo que esta homología está limitada al extremo C-terminal de ShdA (aminoácidos 1560-2036) (Kingsley RA., et al., 2000). El grado de homología entre los dominios C-terminal de ShdA con respecto a los ATs AIDA-1 y MisL, se esquematizan en las figuras 6a y 6b, respectivamente.

Poco se conoce acerca de la función de ShdA. Se sabe que ShdA contribuye en la eficiencia y prolongación del periodo de eliminación de bacterias en heces fecales. La inactivación mutacional de ShdA no altera el índice de mortalidad inducida por la infección en ratones. La delección ó las mutaciones por inserción en el gen *shdA*, ocasionan una reducción en el número de bacterias recuperadas de las heces fecales del ratón y también una reducción en el periodo de eliminación de las bacterias. También se ha encontrado que ShdA es una proteína necesaria para

la colonización en las paredes del ciego y su contenido, y también necesaria para la persistencia de *S. typhimurium* en el intestino del ratón. Por otra parte, el hecho de que los dominios N-terminales de IcsA y AIDA-1 (IcsA-N, AIDA-1-N respectivamente) se unen a macromoléculas en las células intestinales del huésped, por ejemplo, IcsA-N se une a vinculina, mientras que AIDA-1-N se une a las células epiteliales mediante un receptor no identificado (Benz I, et al., 1989; Bernardini ML., et al., 1989), llevó a investigar si el dominio N-terminal de ShdA podía reconocer su propio receptor a nivel de intestino. Kingsley y colaboradores, determinaron el receptor de ShdA en el intestino de ratón y encontraron que se trata de una proteína semejante a la fibronectina (una glicoproteína de 220 kDa). Adicionalmente, observaron que ShdA es una proteína localizada en la superficie bacteriana, lograron inducir su expresión en condiciones *in vivo*, pero no en condiciones *in vitro*. Concluyen que ShdA es una proteína de OM que se une a una molécula semejante a fibronectina a nivel de intestino (Kingsley RA., et al, 2002).

AIDA-1 840 LNPTKESA——GNTLTVS—NYTGTP-GSVISLGGVLEGDN—SLTDRLVVKGNTSGQSDIVYV
ShdA 1549 TMTSGSSSSTPGNTLY-VDG-NYTGMGGS-LYLNT-VL—GDDDSATDKLVIT-GDASGTTD—LYI

AIDA-1 897 NEVSGGGOTRDGINIIS—VEGN—SDA—EFSLKNRVVAGAYVYTLQKGNESGTDNKGWYLTSH
ShdA 1607 NGIGDGAQTTMGIEVVD-VGGVSTSDAFE—LKNEVNAGL-YTYRL-YWNESD—ND—WYLASK

AIDA-1 956 LPTSDTR—————Q
ShdA 1664 -AQSDDDSGGDDTPSDGGDDGGNVTPPDDGGDGGNVTPPDDGGDGGDVTTPDHGGDPAPQ

AIDA-1 965 YRPENGSYAT-NMAL-ANSLFLMD-LNERKQFRAMSDNTQPESASVWMKIT—GGISSGKLNDDGQ
ShdA 1725 YRA-DIGAYMGNQWMARNLQ-MQTLTYDR——EGSQYRNA-DGSVWARFKAGKAESEAVS—GN

AIDA-1 1026 NKTNTNQFIN-QLGGDIYKFHAE-QLGDFTLGI-MGGYANAK——GKTINYT—SNKAARNTLD
ShdA 1782 IDMSNYSQFQLGGDILAWNGNQ-QSVTVGVMASYI-NADTDSTGNRGADGSGFTSSGNVD

AIDA-1 1087 GYSVGVYGTWYONGENATGLFAET-WMQYNWFNASVK—GDGLEEEKYNLNLGTASAGG——GYNL
ShdA 1842 GYNLGVYATWFADAQTHS-GAYVDSWYQYGFY-NNSVESGDA—GSESYDSTAN——AVSLETGY—

AIDA-1 1149 NVHTWTSPEGITGEFVLQPHLQAWWVGVTDPDTHQEDNGTVVQG—AGKNNIQTKAG—IRASWK
ShdA 1902 ——RYDIALSNGNTVSLTPQAQVWVQNYNSADSVKDNYGTRIDGQDGD SWT-TRLGLR——

AIDA-1 1210 UVKST-LDKVTGRRFRPYIEANWI-HNTHFVGVKMSDVSQV—LGSRNQGEIKTIGIEG-VITON
ShdA 1956 -VDGKLYKGSRTVIQ-PFAEANWLHTSDDVSVSF-DDATVKQDLP-ANRAELKVGLQADIDK-

AIDA-1 1275 N—SVNGGVAYOAGGHGSNAISGALGIKYSF—
ShdA 2016 QWSVRAQVAGQTGSNDFGDLNGLNLRYNW

Fig. 6a. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los ATs AIDA de *Escherichia coli* y ShdA de *Salmonella typhimurium*. El análisis con el programa ALIGN versión 1.0. Se encontró homología (*) en 142 aminoácidos (con respecto a la secuencia de AIDA-1), equivalente a un 31.7% a nivel del dominio C-terminal.

ShdA	1549	TMTSGSSSSTPGNTLYVDGNYTGNGGSLYLNTVLGDDDSATDKL-VITGDASGTTDLIYNG
MisL	446	SHEDGEPWQTLTINED-YVGNNGGKLVFNTVLNDDDDSETDRLQVLGNTSGNTFVAVNN
ShdA	1609	IGD-GAQTNGIEVVDVGGVSTSDAFELKNEVNAGLYTYRLYWNESDNDWYLASKAQSD
MisL	506	IGGAGAQTIE-GIEIVN-VAGNSNG-TFEKASRIVAGAYDYNVV-QKGGN-WYLTSYIEP-DE
ShdA	1668	D-DSGGDDTPSDGGDDGGNVTPPD-----DGGDGGNVTPPDDGGDGGDVTTPDH
MisL	563	PIIPDPVDPVIPDPVVPVDPVDPVDPV-DPVIIPDPVIPDPVDPDP-VDEPEVDPVIP-DPTIPDI
ShdA	1716	GGDVAP-----QYRADI-GAYMGNQWMARNLQMOTLYDREG-SQYRNA-----DGSWWAR
MisL	623	GQSDTPPITEHQFRPEVGSYLA-NNYA-ANTLF-MTRLHDRL-GETQYTDMLTGEKKVTSLSWMR
ShdA	1764	FKAGKAESEAVSGNIDMDSNYSQFQLGGDIL-AWG-NGQQSVTVGMASYI-NADTDSTGNR
MisL	683	NVGAHTRFNDGSGQLKTRINSYVLQLGGDLAQWSTDGLDRWHIGAMAGYANSQNRTLSSV
ShdA	1823	GADGSQFTSSGNVDGYNLGVYATWF-ADAQTHSGAYVDSWYQYGFY-NNSVESGDAGSESYD
MisL	743	-----SDYHSRGQVTGYSVGLYGTWYANNIDR-SGAYVDTWMLYNWFDNKVMGQDQAAEKYK
ShdA	1883	STANAVSLETGYRYDIAL-SNGNTVSLTPQAQVWQNYADS SVKDN Y-GTRIDGQDGSWTT
MisL	799	SKGITA-SVEAGYSFRLGESAHQSYWLQPKAQVWVMGVQADDNREANGTLVKDDT-AGNLLT
ShdA	1943	RLGLRV-DGKLYKGSRTVI---QPFAEANWLHTSDDVSVSFDDATVKQDLPA-NRAELKVG
MisL	859	RMGVKAYINGHNAIDNDKSREFQPFVEANWIHNTQP-ASVKMDDVSSDMRGTKNIGELKVG
ShdA	1999	LQADIDKQWSVRAQVAGQTGSNDFGDLN-GSLNLR-YNW
MisL	919	IEGQVTPRLNWWGNVAQQVGDYGSDTQGMGMKYSF

Fig. 6b. Alineamiento de las secuencias aminoácidas de los ATs MisL y ShdA de *Salmonella typhimurium*. El análisis se llevó a cabo con el programa ALIGN versión 1.0. Se encontró homología (*) en 517 aminoácidos (con respecto a la secuencia de ShdA), lo que representa una homología del 32.3% en el dominio C-terminal.

2.0. Justificación

La identificación del gen *shdA* dentro de una SPI, así como las funciones descritas anteriormente, sugieren que se podría tratar de un factor de virulencia que utiliza *Salmonella typhimurium* para colonizar y permanecer dentro de las célula huésped. Aunque se ha sugerido que se trata de un autotransportador, debido a que presenta homología con los ATs AIDA-1 y MisL; esta función aún no ha sido explorada. Por esta razón, el presente trabajo está destinado a demostrar que *ShdA* puede translocar péptidos heterólogos hacia la superficie bacteriana y que por lo tanto, es un autotransportador.

3.0. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Evaluar la capacidad del dominio β de la proteína ShdA para translocar el péptido heterólogo NANP y/o la proteína CSP, hacia la superficie de *Salmonella typhimurium*.

Objetivos específicos.

1. Extraer proteínas totales y de periplasma de las cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* SL3261, que contienen los plásmidos que codifican bajo el promotor *pnirB*, la proteína de fusión que contiene la señal de tráfico periplásmico LTB, el dominio β de ShdA, el péptido heterólogo NANP y/o la CSP.
2. Evaluar la expresión del péptido heterólogo NANP y/o la proteína CSP de *Plasmodium falciparum*, mediante SDS-PAGE y ensayo tipo "Western-blot".
3. Comparar la expresión del péptido heterólogo NANP y/o la CSP en extractos de proteínas totales y extractos de periplasma.
4. Evaluar la expresión del péptido heterólogo NANP y/o la CSP en la superficie de *Salmonella typhimurium* SL3261, mediante inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.

4.0. METODOLOGÍA

4.1. Cepas bacterianas.

Se utilizaron cepas recombinantes atenuadas de *Salmonella entérica* serotipo *Typhimurium* SL3261, mutante $\Delta\text{aroA}::\text{Tn } 10$ (Hoiseth SK., et al., 1981). Todas las cepas empleadas en el presente trabajo, fueron amablemente proporcionadas por la Dra. Araceli Santiago Machuca y el Dr. Fernando Ruiz Pérez.

La tabla 4 muestra un resumen de las características particulares de los plásmidos, sin embargo es necesaria una descripción detallada que a continuación se presenta:

1. Plásmido **pnirBLTB_{sp}**. Contiene al promotor de la enzima nitrato reductasa (**nirB**) inducible en condiciones de anaerobiosis *in vitro* y la secuencia señal de translocación de péptidos hacia el periplasma de la subunidad *B* de la toxina termolábil de *Escherichia coli* (**LTB**) clonada río abajo del promotor **pnirB**. Ha sido utilizada con gran éxito en nuestro grupo de investigación (Ruiz-Pérez F., et al., 2002). En el presente trabajo es empleado como control negativo. Posee un tamaño de 2425 pb. (Fig. 7a)
2. Plásmido **pnirBLTB β -ShdA**. Además de tener el promotor **pnirB** inducible en anaerobiosis *in vitro*, contiene la secuencia señal de tráfico **LTB** clonada río abajo del promotor, seguido por un fragmento del dominio α de ShdA y el dominio β de ShdA, siendo este último, el extremo C-terminal común a los ATs AIDA-1, MisL e lcsA. Su tamaño aproximado es de 3591 pb. (Fig. 7b)
3. Plásmido **pnirBLTB β -ShdA NANP**. Contiene la secuencia que codifica para la proteína de fusión conformada por **LTB**, 4 repetidos del péptido NANP

(Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina), (también abreviado como **NANP₄**) y una forma truncada de la proteína ShdA, cuya expresión es controlada por el promotor *pnirB*. Tiene un tamaño aproximado de 3880 pb. Cabe mencionar que el péptido NANP, es el péptido central de la proteína circunsporozoítica (CSP) de *Plasmodium falciparum*, como se explicará más adelante.(Fig 7c).

4. Plásmido **pnirBLTB β-ShdA NANP-CSP**. Este plásmido de 4550 pb, se deriva del anterior, pero adicionalmente, río arriba de β-ShdA, tiene clonada la secuencia que codifica para la **CSP**. Esta última, es una proteína, ácida de 40-60 kDa, perteneciente al parásito *Plasmodium falciparum* y que es específica de especie y fase. Existe solo una copia del gen por parásito y la estructura general de la proteína es muy conservada, ya que contiene una región central constituida por repeticiones del péptido NANP. (Dame JB., et al., 1984; Enea V., et al., 1984). Esta unidad de repetición es el blanco central de la respuesta inmune humoral y son numerosos los trabajos que se han desarrollado para la generación de vacunas, cuya finalidad es de proteger contra el parásito. (Weiss WR, et al., 1989; Kumar S, et al., 1988; Zavala F, et al., 1986; Herrington DA, et al., 1987). Ver figura 7d.

5. Plásmido **pnirBLTB-MisL-NANP**. Contiene el mismo promotor y misma secuencia señal que los anteriores. Su variante es que contiene los genes que codifican para una forma truncada de la proteína autotransportadora **MisL** de *Salmonella* y 4 repetidos del péptido heterólogo NANP. La localización principal de esta proteína quimérica dentro del acarreador bacteriano ocurre en OM.

(Ruiz-Pérez F, 2002). En el presente trabajo funge como control positivo. (Fig. 7e).

Plásmido	Tamaño (pb)	Promotor	Componente principal	Producto esperado (kDa)
pnirBLTB sp	2425	pnir B	Secuencia señal de tráfico LTB.	No detectable
pnirBLTB β ShdA	3591	pnir B	Secuencias de LTB, un fragmento del dominio α y el dominio β de ShdA.	No detectable
pnirBLTBANP β ShdA	3880	pnir B	Secuencias de LTB, un fragmento del dominio α y el dominio β de ShdA seguido por la secuencia de 4 repetidos NANP.	58.2
pnirBLTBANPCSP- β ShdA	4550	pnir B	Secuencia señal LTB, un fragmento del dominio α y el dominio β de ShdA, seguido de 4 repetidos NANP y la secuencia de la forma truncada de la CSP.	85.2
pnirBLTB NANP MisL	4015	pnir B	Secuencias de la señal LTB, del dominio β de MisL y la secuencia de 4 repetidos NANP.	70

Tabla 4. Características generales de los plásmidos. Los tamaños de los plásmidos son aproximados.

Esquemas de los plásmidos:

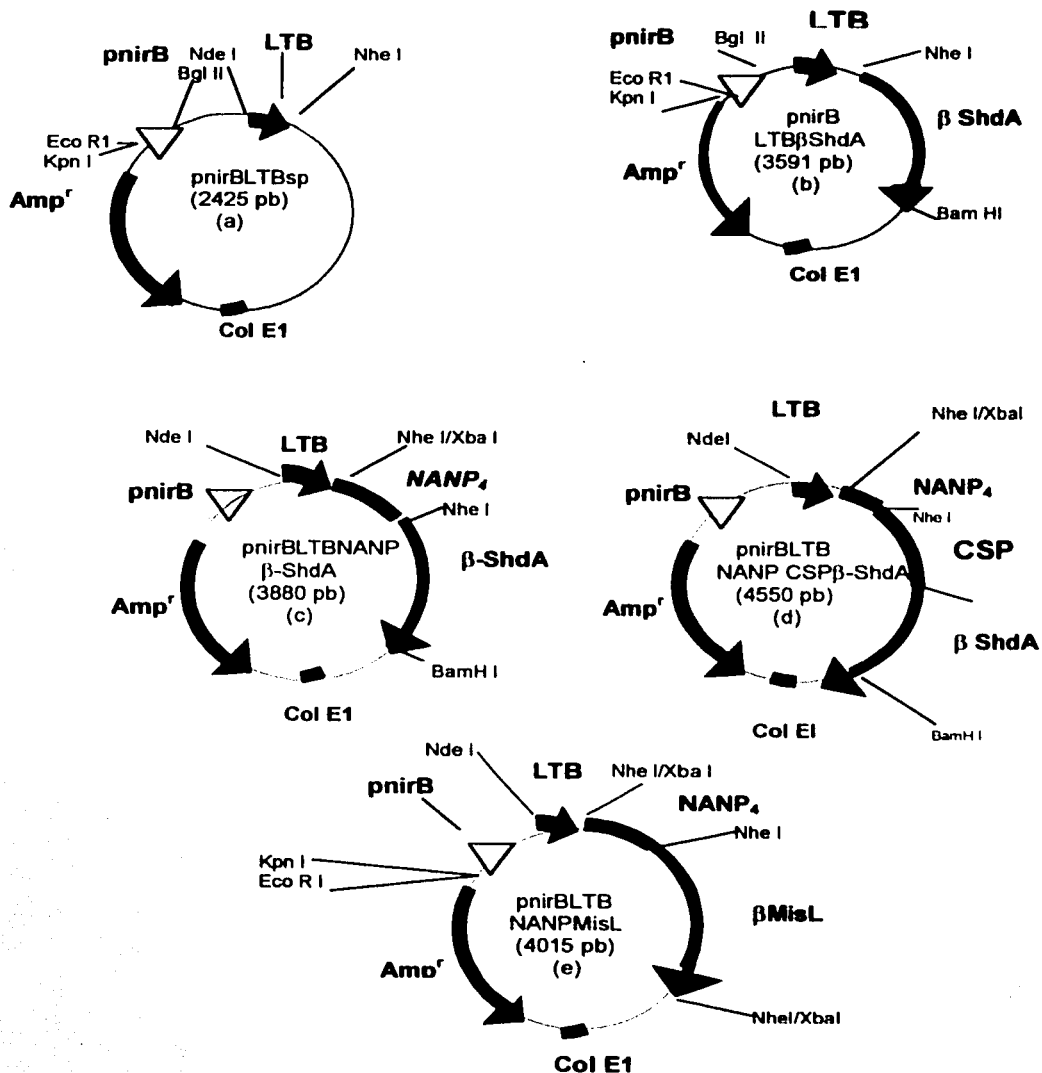


Fig. 7. Esquema de las estructuras de los plásmidos presentes en las cepas de trabajo.

4.2. Condiciones de cultivo e inducción

Las cepas (originalmente congeladas a -80°C) fueron descongeladas y cultivadas 3 veces de manera seriada en medio sólido Infusión cerebro-corazón (BHI agar) suplementados con $2\mu\text{L}$ de 2,3-ácido dihidroxibenzoico (DHB) (Sigma, St. Louis, Mo) y $3\mu\text{L}$ de ampicilina por cada mL de medio de cultivo. La incubación se llevó a cabo a 37°C por 24 h en una incubadora Precision-Economy Incubator (Modelo 5EG). Para poder inducirlas, a partir del tercer cultivo en medio sólido, se tomó una asada en condiciones de esterilidad, y se inocularon las cepas en 45 mL de medio líquido tioglicolato (un medio reductor que favorece la inducción de la expresión proteica de todas las cepas, ya que estas se encuentran bajo el control del promotor *pnirB*, el cual es inducible en anaerobiosis). Los 45 mL de medio tioglicolato, fueron suplementados con $135\mu\text{L}$ de ampicilina y $90\mu\text{L}$ de DHB al 0.01%. Se incubó a 37°C con agitación constante de 250 rpm en un aparato Orbit Lab-line Environ-Shaker^R; hasta lograr un crecimiento bacteriano cuya densidad óptica $\text{DO}_{540\text{ nm}}$ de 1.0 (lo cual se logra aproximadamente en unas 6 horas).

A fin de tener un control negativo de la inducción (cultivo generado en condiciones aeróbicas, no inductoras), paralelamente, los inóculos de c/u de las cepas, provenientes del tercer cultivo de fase sólida, fueron sembrados en 30 mL de caldo BHI suplementados con $90\mu\text{L}$ de ampicilina y $60\mu\text{L}$ de DHB al 0.01%. Se incubaron las cepas a 37°C y 250 rpm de agitación.

4.3. Extracción de proteínas totales (PT).

Se tomó una alícuota de 2 mL de cada uno de los cultivos inducidos y no inducidos y se centrifugó en una microfuga (modelo ALC 4214) a 6000 rpm a T°C ambiente. Se descartó el sobrenadante y el botón bacteriano se lavó 3 veces con 1 mL de SSI. La pastilla bacteriana final, se resuspendió con 50 μ L de agua destilada y se adicionó 50 μ L de buffer muestra para proteínas (ver apéndice). Las muestras se desnaturalizaron por ebullición durante 10 minutos, se dejaron enfriar, se pasaron por jeringa insulínica ó jeringa Hamilton (a fin de homogenizar).

4.4. Extracción de proteínas de periplasma.

Los cultivos se centrifugaron a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall T21. Se descartó el sobrenadante y el botón bacteriano se lavó 3 veces con 20 mL de SSI. Se resuspendió el botón bacteriano en 10 mL de sol. Tris-HCl pH 8.0 con 20% de sacarosa. Se incubó por 5-10 minutos a T°C ambiente y se centrifugó a 7000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el botón se resuspendió en 300 μ L de MgSO₄ 5mM. Se incubaron los tubos a 4°C (ó en hielo) con agitación por 10 minutos. Los tubos se centrifugaron a 8000 rpm a 4°C por 10 min. Finalmente el sobrenadante (extracto periplásmico) se recolectó con una micropipeta de 1mL con el cuidado de no tocar el botón. El extracto periplásmico (\approx 300 μ L) se concentró en una vacufuga eppendorf^R hasta los 50 μ L. Después se adicionó 50 μ L de buffer muestra para proteínas, se sometió a ebullición por 10 min, se dejaron enfriar las muestras y se pasaron por jeringa (a fin de homogeinizar). Dado que se degradan rápidamente las proteínas de periplasma, se procedió a

separarlas inmediatamente en un gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE).

4.5. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE).

Las muestras de proteínas cuya concentración aproximada es de 30 μ g/mL, se separaron en un gel de poliacrilamida al 12.5% y al 7.5%, en condiciones reductoras según el método de Laemmli (Laemmli UK., 1970). La separación fue llevada a cabo en una cámara de electroforesis vertical BioRad (modelo Mini-Protean 3 Cell). El gel de poliacrilamida consta de 2 partes: el gel de resolución (resolving gel) en la parte inferior; y el gel de empaque (gel stacking) en la parte superior. Las composiciones de ambos se encuentran en el apéndice. Se utilizó buffer de corrimiento Tris-Glicina y las condiciones del corrimiento fueron a 35 mA por una hora. De los 2 geles resultantes, uno se fijó (por 3 horas), se tiñó con colorante azul de Coomassie por 30 min y se decoloró hasta obtener una visualización nítida ó clara de las bandas de las proteínas. Finalmente el gel de poliacrilamida se secó en medio de una membrana (Gel drying Promega) que se encuentra en un soporte de acrílico.

Por otro lado, el segundo gel de poliacrilamida, fue de utilidad para realizar el ensayo tipo Western-blot.

4.6. Ensayo tipo Western-Blot (Inmunoelectrotransferencia).

Las proteínas separadas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa ó de nylon cargada positivamente (Boehringer-Mannheim^R), usando una cámara vertical de transferencia (BioRad Mini Trans-Blot Cell 2005). La tranferencia fue llevada a cabo a 150 V por una hora. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con PBS-leche al 5% por 2 horas. Se lavó con 10 mL de PBS 1X. Se incubó durante toda la noche con 10mL del anticuerpo monoclonal 2 A10 (amablemente donado por la Dra. Elizabeth Nardin, Departament of Medical and Molecular Parasitology. University School of Medicine, New York. USA.) en una dilución 1:1000. Se realizó un lavado con 10 mL de PBS-Tween al 0.1% y dos lavados con PBS 1X. Se adicionó el segundo anticuerpo (anticuerpo conjugado), una IgG de cabra contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (IgG goat-antimouse HRP) diluido 1:1000. Se incubó durante 2 horas. Nuevamente se realizó un lavado con 10 mL de PBS-Tween al 0.1% y dos lavados con PBS 1X. Todas las incubaciones y los lavados se realizaron en un horno de hibridación Amersham Pharmacia Biotech, a T°C ambiente y a 25 rpm. Finalmente se reveló con peróxido de hidrógeno y 4-cloro-1-naftol, (ver apéndice). La reacción se detuvo con agua destilada ó PBS.

4.7. Inmunofluorescencia indirecta

Se cultivaron las cepas bajo condiciones reductoras (anaerobiosis) hasta lograr un D.O_{540 nm} de 1.0. Se tomó una alícuota equivalente a 1×10^8 bacterias, se depositó en tubo eppendorf de 1.5 mL. Se lavó tres veces con PBS 1X estéril,

centrifugando a 6000 rpm en cada caso. El botón bacteriano se resuspendió en 60 μ L de Ac Mo 2 A10 dilución 1:100. Se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación constante. Se lavó dos veces las bacterias con 1.5 mL de PBS 1X estéril, centrifugando a 6000 rpm en cada caso. El botón bacteriano, se resuspendió con 60 μ L del segundo anticuerpo, una IgG de cabra antiratón-FITC (conjugada con isotiocianato de fluoresceína) en una dilución 1:100. Se incubó a 37°C con agitación y en la oscuridad. Se centrifugó a 6000 rpm y el botón bacteriano se lavó dos veces con PBS 1X para retirar el exceso del segundo anticuerpo sin reaccionar. Al final el botón bacteriano se resuspendió en 500 μ L de PBS, se realizaron frotis en portaobjetos y se analizaron en microscopio de fluorescencia Olympus BX40.

4.8. Citometría de flujo

Se cultivaron las cepas bajo condiciones reductoras (anaerobiosis) hasta lograr un D.O_{540 nm} de 1.0 . Se tomó una alícuota equivalente a 1×10^8 bacterias, se depositó en tubo eppendorf de 1.5 mL. Se lavó tres veces con PBS 1X estéril, centrifugando a 6000 rpm en cada caso. El botón bacteriano se resuspendió en 60 μ L de Ac Mo 2 A10 dilución 1:250. Se incubó durante 45 min a 37°C con agitación constante de 250 rpm (aparato Shaker-Enviroment). Transcurrido lo anterior, se lavaron dos veces las bacterias con 1.5 mL de PBS 1X estéril, centrifugando a 6000 rpm en cada caso. El botón bacteriano, se resuspendió con 60 μ L del segundo anticuerpo, una IgG de cabra antiratón-FITC en una dilución 1:100. Se incubó a 37°C con agitación y en la oscuridad por 30 minutos. Se centrifugó a 6000 rpm y el botón bacteriano se lavó dos veces con PBS para retirar el exceso del segundo

anticuerpo. Al final el botón bacteriano se resuspendió en 500 μ L de PBS 1X. Finalmente se analizaron las muestras en un equipo de Citometría de flujo Becton-Dickinson, utilizando el Software CELLQuest^R.

5.0. RESULTADOS

Antes de explicar los resultados, es conveniente recordar que en el presente trabajo se emplearon 2 controles negativos: *pnirBLTBsp* y *pnirBLTB β -ShdA* y un control positivo: *pnirBLTB β NANP β -MisL*. El plásmido *pnirBLTBsp* codifica únicamente para la secuencia señal LTB de la toxina B termolábil de EPEC, encargada de dirigir el transporte de las proteínas hacia el espacio periplásmico, pero carece de péptido NANP ó proteína CSP heterólogos. El segundo control negativo empleado, *pnirBLTB β -ShdA*, es una construcción que codifica para la secuencia señal LTB y el dominio beta del ATs ShdA. Contiene los elementos para translocar a periplasma y superficie bacteriana, pero no tiene péptido heterólogo ó proteína recombinante. Finalmente, *pnirBLTB β NANP β -MisL* es un plásmido que codifica para la expresión y translocación a la superficie bacteriana del epitopo ó péptido heterólogo NANP mediada por el autotransportador MisL. Todos los plásmidos codifican para proteínas de fusión (excepto *pnirBLTBsp*).

5.1. Evaluación de la expresión del péptido NANP y la CSP en proteínas totales

Se cultivaron las cepas bacterianas en condiciones anaeróbicas para inducir la expresión de los antígenos heterólogos NANP y CSP, ambos bajo el promotor *pnirB*. Los resultados generados en extractos de proteínas totales, revelan la presencia de una banda de aproximadamente 60 kDa correspondiente al epitopo NANP fusionado al dominio β de ShdA (carril 4, fig 8A), mientras que en el caso de la CSP, (carriles 7 y 8, fig 8A) aparentemente encontramos una banda ligeramente

inferior con respecto a la expresada en *pnirB* LTB NANP MisL (carriles 5 y 6, fig. 8A) cuyo peso molecular es cercano a los 70 kDa. La expresión del epitopo NANP se confirmó mediante ensayo tipo Western-blot (fig 8B), donde se pueden apreciar dos bandas en el caso de los extractos proteicos totales obtenidos de las cepas portadoras de *pnir* LTB NANP β ShdA (carriles 3 y 4, fig. 8B), probablemente una de ellas corresponde a una forma madura del péptido NANP, mientras que la otra podría tratarse de una forma inmadura.

En el caso de la cepa portadora de *pnir*LTB NANP CSP β -ShdA (carriles 7 y 8, fig 8B) encontramos solo una banda de aproximadamente 65 kDa.

5.2. Comparación de la expresión del péptido NANP y la CSP en proteínas totales y de periplasma

Para evaluar la localización subcelular de NANP y CSP, se obtuvieron extractos proteicos totales (PT) y de periplasma (Pm). De los resultados obtenidos en geles de poliacrilamida al 7.5%, se observa lo siguiente: la cepa *pnir*BLTB NANP β -ShdA (carril 7, fig 9A) no expresa cantidad detectable a nivel de periplasma, en comparación con lo que se expresa en proteínas totales (carril 6, fig 9A). Esto podría indicar que la localización del péptido NANP en periplasma es transitoria, es decir permanece por poco tiempo en este compartimento, siendo translocado hacia la OM ó superficie bacteriana. Resultados similares se obtuvieron en el caso de la cepa portadora de *pnir*BLTBANPCSP β -ShdA (carriles 6 y 7, fig 9B). Se realizó un ensayo tipo Western-blot, con muestras de PT y Pm con el fin de incrementar la sensibilidad y así detectar pequeñas cantidades de NANP y CSP.

En el caso de la cepa pnrBLTBNANP β -ShdA se identificó solo una banda en las muestras de Pm, mientras que las muestras provenientes de PT, se presentan dos bandas (carril 6, fig 10) solo una de ellas es idéntica a la encontrada en Pm (carril 7, fig. 10), es decir la de menor peso molecular y la que es probablemente la forma madura. La banda de mayor peso molecular en PT, podría ser la forma inmadura .

En los resultados con la cepa pnrBLTBNANPCSP β -ShdA, se identificaron 2 bandas y un barrido entre ellas, en muestras de PT en el ensayo tipo "Western-blot", solo una de las bandas es idéntica a la banda presente en muestras de Pm. El barrido entre las 2 bandas de las muestras de PT, probablemente se debe a que la CSP se está degradando (carriles 8 y 9, fig. 10).

Evaluación de la expresión del péptido NANP y la CSP en proteínas totales

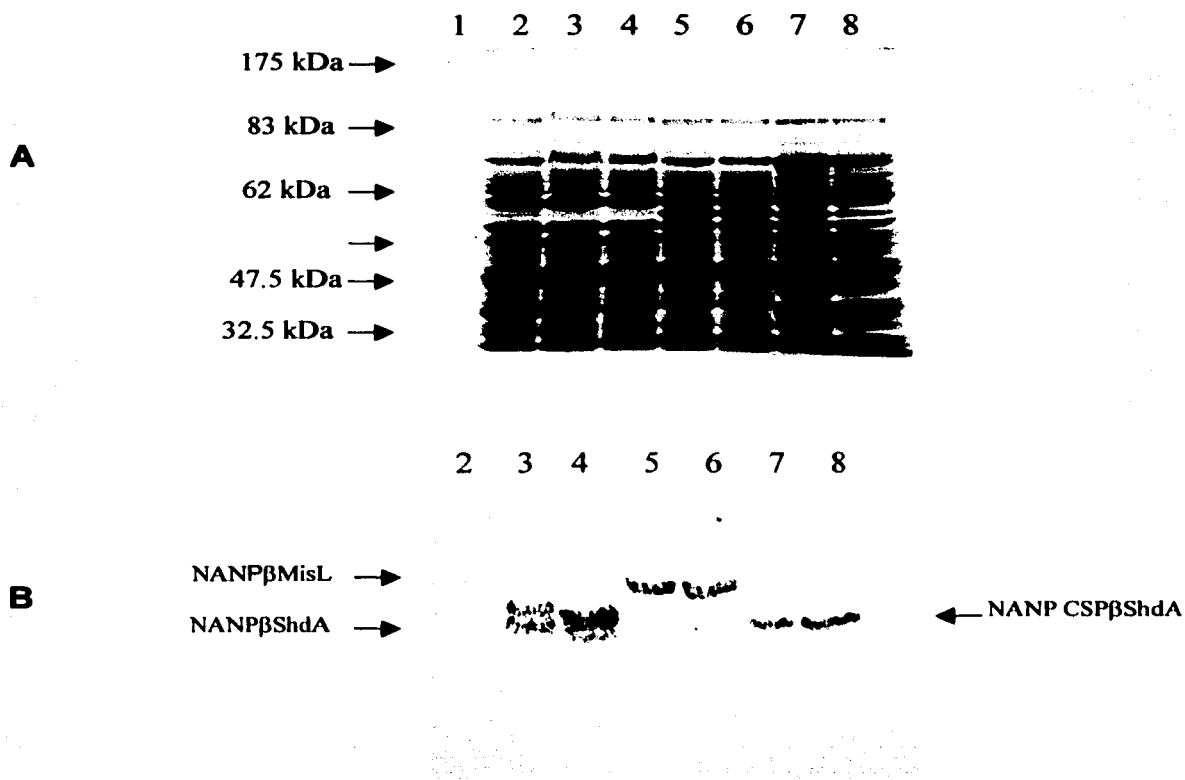


Fig 8. Evaluación de la expresión del péptido NANP y de la CSP en extractos de proteínas totales en cepas inducidas (IND) y no inducidas. (A) SDS-PAGE 7.5%, en el que se visualiza una banda de 65 kDa correspondientes a la proteína de fusión NANP β - ShdA (flecha roja). (B) Ensayo tipo "Western-blot", que revela la presencia de una banda doble en los carriles 3 y 4 correspondientes a las cepas portadoras de pnrBLTBANP β -ShdA, mientras que hay solo una banda en las cepas portadoras de pnrBLTB NANPCSP β -ShdA (carriles 7 y 8). Carril 1) Marcador de PM; carril 2) pnrBLTB sp (IND); carril 3) pnrBLTB β -ShdANANP, carril 4) pnrBLTB β -ShdANANP (IND), carril 5) pnrBLTB β -MisLNANP, carril 6) pnrBLTB β -MisLNANP (IND), carril 7) pnrBLTB β -ShdA NANP CSP, carril 8) pnrBLTB β -ShdA NANP CSP (IND).

Comparación de la expresión de NANP y CSP en extractos proteicos totales (PT) y extractos proteicos periplásmicos (Pm).

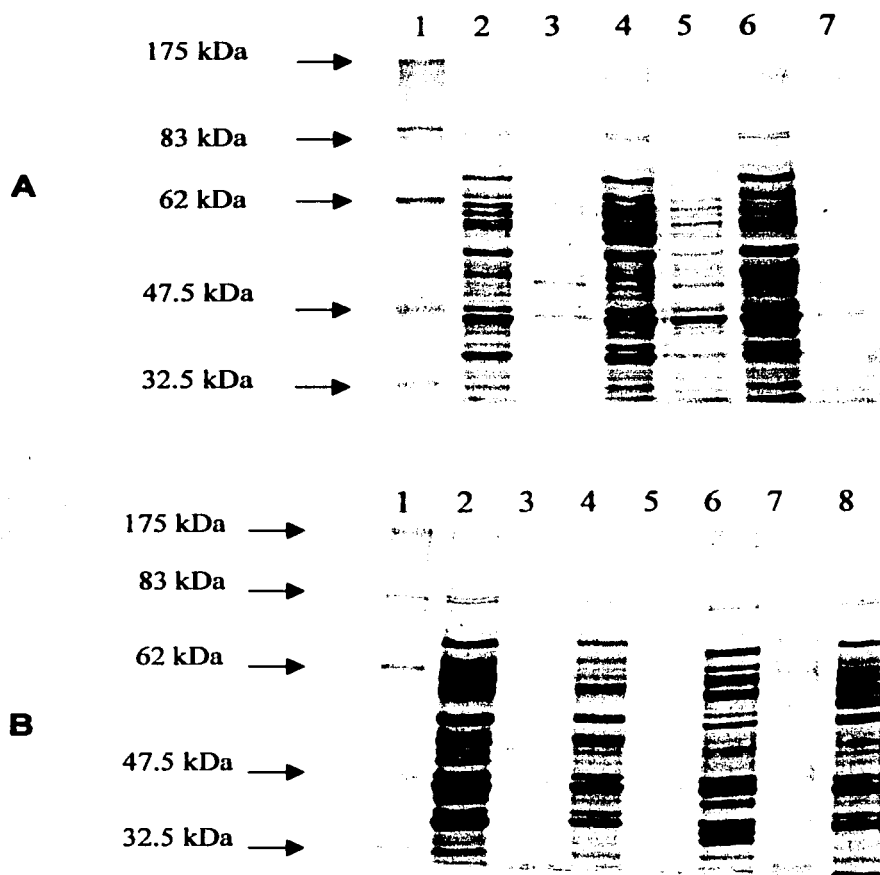


Fig. 9. SDS-PAGE 7.5% comparativo entre extractos proteicos totales y periplásmicos después de ser inducidos en condiciones de anaerobiosis *in vitro*. Obsérvese que el nivel de expresión proteica en los extractos periplásmicos es muy bajo, e inclusive, indetectable. Panel A: Carril 1) Marcador de PM; carril 2) pnrBLTB sp (PT); carril 3) pnrBLTB sp (Pm); carril 4) pnrBLTB NANP β -MisL (PT); carril 5) pnrBLTB NANP β -MisL (Pm); carril 6) pnrBLTB NANP β -ShdA (PT); carril 7) pnrBLTB NANP β -ShdA (Pm). Panel B: Carril 1) Marcador de pesos moleculares; carril 2) pnrBLTB β -ShdA (PT); carril 3) pnrBLTB β -ShdA (Pm); carril 4) pnrBLTB NANP β -ShdA (PT); carril 5) pnrBLTB NANP β -ShdA (Pm); carril 6) pnrBLTB NANP CSP β -ShdA (PT); carril 7) pnrBLTB NANP CSP β -ShdA (Pm); carril 8) pnrBLTB NANP β -MisL (PT).

Comparación de la expresión de NANP y CSP en extractos proteicos totales (PT) y extractos proteicos periplásmicos (Pm)

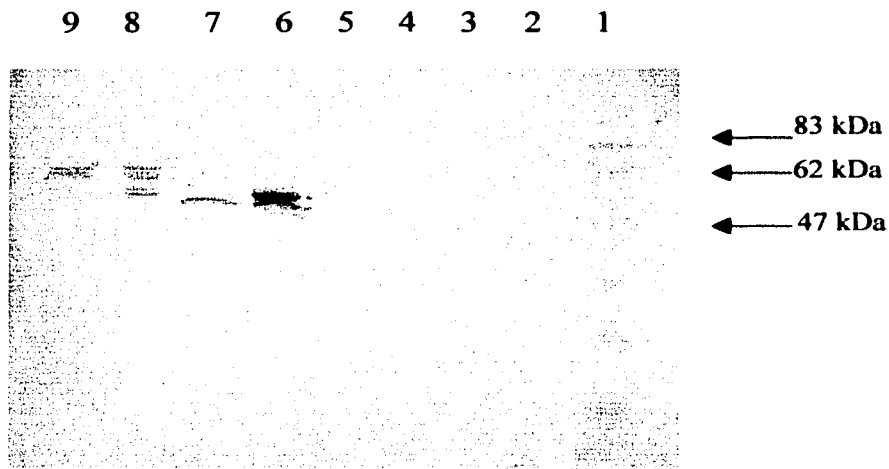


Fig. 10. Western-blot comparativo donde se muestran las diferencias entre la expresión del epítipo heterólogo NANP y la CSP recombinante (fusionados al dominio β de ShdA) en periplasma y en proteínas totales. Obsérvese que solo la forma madura (de menor peso molecular) de estos epítipos heterólogos es expresada a nivel de periplasma. Carril 1) Marcador de PM; carril 2) pnirB LTB sp (PT); carril 3) pnirB LTB sp (Pm); carril 4) pnirBLTB β ShdA (PT); carril 5) pnirB LTB β -ShdA (Pm); carril 6) pnirBLTB NANP β -ShdA (PT); carril 7) pnirBLTB NANP β -ShdA (Pm); carril 8) pnirBLTB NANP CSP β -ShdA (PT); carril 9) pnir LTB NANP CSP β -ShdA (Pm).

5.3. Evaluación de la expresión del péptido NANP y la CSP en la superficie de *Salmonella typhimurium*.

Para demostrar que el dominio β de ShdA es capaz de translocar el péptido heterólogo NANP y/o la CSP hacia la superficie bacteriana se llevaron a cabo 2 técnicas: inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.

5.3.1. Inmunofluorescencia indirecta.

La inmunofluorescencia indirecta es una técnica inmunomicroscópica que permite la localización de un antígeno en un tejido ó una célula. Si el anticuerpo primario (específico contra el antígeno problema) está marcado con una sustancia que fluoresce, llamamos a la técnica inmunofluorescencia **directa**. De otra forma, si el anticuerpo marcado con la sustancia fluorescente, es el anticuerpo secundario (ó eventualmente terciario), la técnica es llamada inmunofluorescencia **indirecta**. Esta última fue realizada en el presente trabajo, ya que el anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es de tipo secundario. El anticuerpo monoclonal 2 A10 (no marcado) funge como anticuerpo primario.

Los resultados obtenidos por esta técnica, se representan a través de la figura 11. Los controles negativos, es decir las cepas portadoras de los plásmidos pnirBLTBsp (fig 11a). y pnirBLTB β -ShdA (fig 11b), no poseen señal de inmunofluorescencia, ya que no portan el antígeno NANP ó CSP específico para el Ac Mo 2 A10. La no fluorescencia en la cepa portadora de pnirBLTB β -ShdA (fig. 11b), nos ayuda a descartar la posibilidad de un falso positivo o la presencia de

alguna inespecificidad. Por otra parte, la cepa pnrBLTBANP β -ShdA (fig 11c) pone de manifiesto la expresión del péptido heterólogo NANP en toda la superficie de *Salmonella typhimurium*. Similares resultados se obtuvieron con la cepa bacteriana portadora del plásmido pnrBLTB NANP CSP β -ShdA (fig 11d).

Evaluación de la expresión del epítipo NANP y de la CSP en la superficie de *Salmonella typhimurium* mediante inmunofluorescencia indirecta.

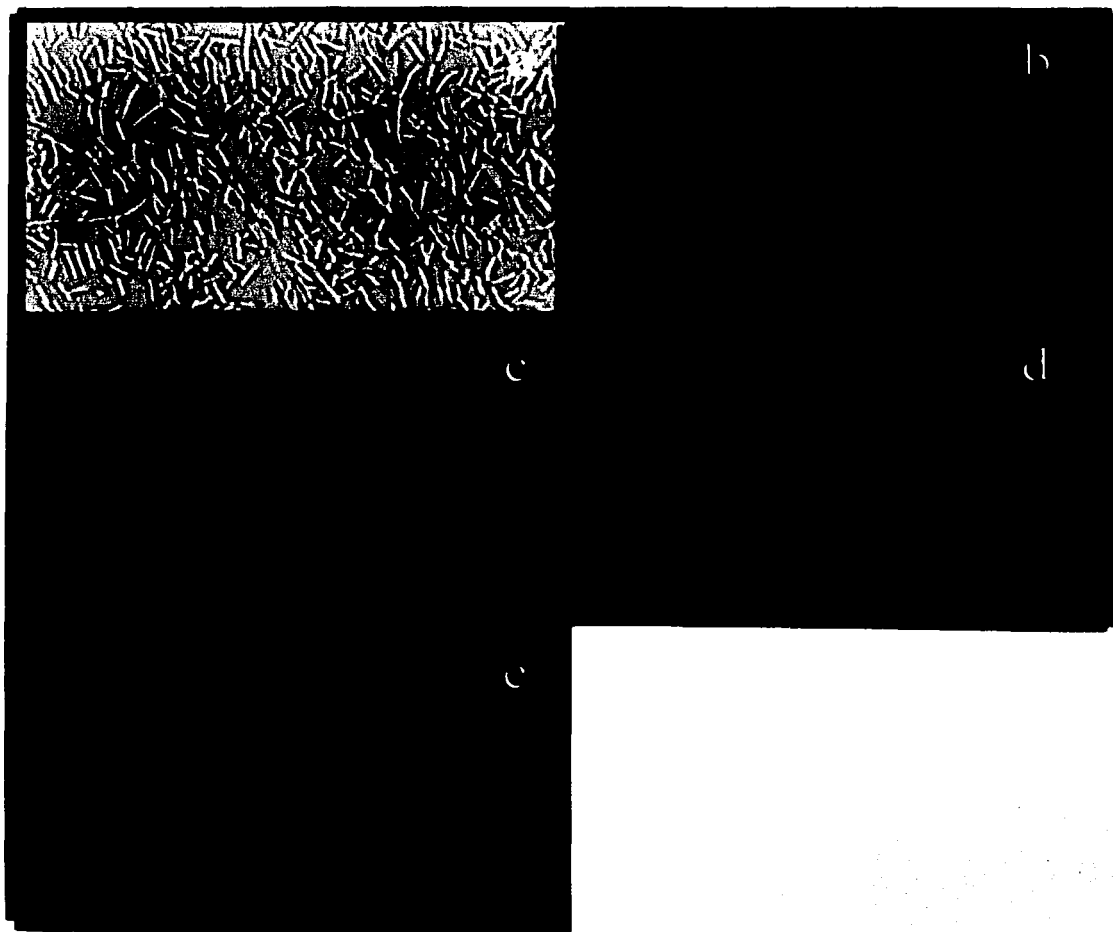


Fig 11. Evaluación de la expresión del epítipo NANP y de la CSP, en la superficie de *Salmonella typhimurium*, mediante inmunofluorescencia indirecta. a) Cepa pnrB LTB sp.(control negativo, campo claro), b) Cepa pnrB LTB β -ShdA (control negativo bajo luz UV), c) Cepa pnrBLTB NANP β -ShdA, d) pnrBLTB NANPCSP β -ShdA; e) *Salmonella typhimurium* pnrBLTB NANP β -MtsL (control positivo). Aumento 1000X. Nótese la señal inmunofluorescente en toda la superficie bacteriana en c y d.

5.3.2. Citometría de flujo

La citometría de flujo permite separar y distinguir subpoblaciones de células en base a las características moleculares de superficie, que pueden comprender determinantes antigénicos ó complejos receptores (Kruisbeek A M, 1991). Los datos generados en una citometría de flujo pueden representarse a través de un gráfico de puntos ó "dot-plot" (porcentaje de células positivas para un marcador específico) ó como histogramas (que evalúa la intensidad media de fluorescencia emitada por un marcador específico). En la figura 12, se muestra el análisis por citometría de flujo de las cepas bacterianas utilizadas, en el panel a, se identifica y selecciona la población de estudio (**R2**) en función de su tamaño y granularidad. En los paneles b-f se analiza la intensidad media de fluorescencia (IMF) emitida por cada una de las cepas en estudio. Los controles negativos, cepas pnrBLTBsp (fig.12-b) y pnrBLTB β -ShdA (fig. 12-d) muestran una IMF basal de 4 y 60 respectivamente. En la figura 12-d se puede observar el desplazamiento a la izquierda de la curva correspondiente al control negativo pnrB LTB β -ShdA, en comparación con el desplazamiento a la derecha de las cepas positivas para NANP: pnrB LTB NANP β -ShdA (fig. 12-e) y pnrB LTB NANP CSP β -ShdA (fig. 12-f).

Los gráficos de punto (figura 12 g-i) analizan el porcentaje de bacterias que expresan el péptido NANP en su superficie celular. Los datos porcentuales en la parte superior derecha de estos gráficos, indican que un 48.2% de las bacterias de la cepa pnrBLTB NANP β -ShdA, expresan el antígeno NANP en la superficie celular, mientras que un 47.7% de las bacterias cepa pnrBLTB NANPCSP β -ShdA lo hacen.

Por otra parte, la figura 13 representa un histograma, donde se analizan simultáneamente las IMF de las poblaciones bacterianas que expresan el autotransportador β -ShdA. Una mayor IMF equivalente a 601 es detectada, cuando se trasloca la CSP hacia la superficie, con respecto a los resultados generados por la cepa que solo transporta el péptido heterólogo NANP (IMF= 508) hacia la superficie bacteriana de *Salmonella typhimurium*.

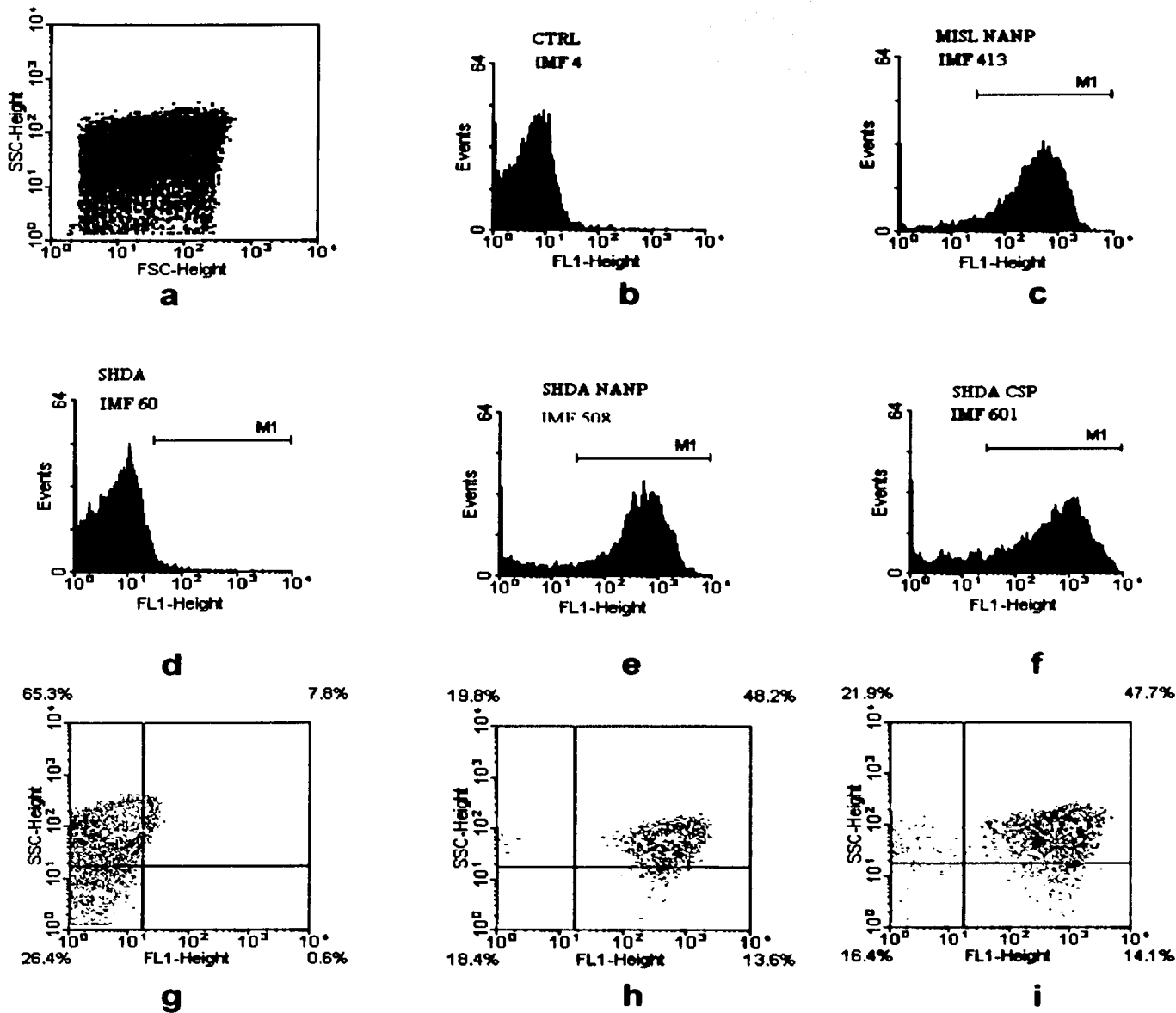
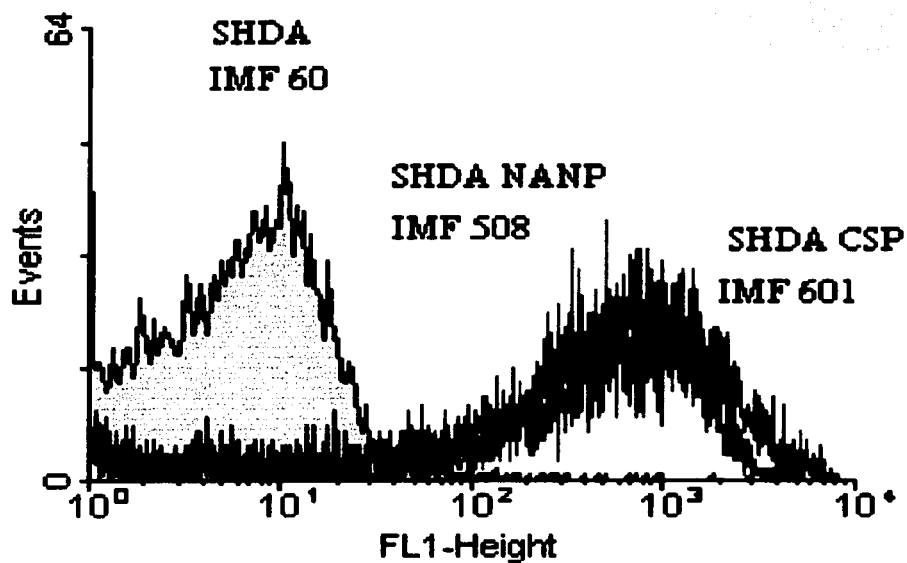


Fig. 12. Evaluación de la expresión del epítopo NANP y de la CSP en la superficie de *Salmonella typhimurium*, mediante citometría de flujo. Los paneles b-f son histogramas, mientras que los paneles a, g-i son gráficos de punto (dot-plot). Panel a) Población bacteriana seleccionada para el análisis en función de su tamaño y granularidad (R2). Panel b) Control negativo, cepa pnrBLTBsp. Panel c) Control positivo, pnrBLTB NANP β -Misl; panel d y g) Cepa control pnrBLTB β -ShdA; panel e y h) cepa pnrBLTBANPP β -ShdA; panel f e i) cepa pnrBLTBANPCSP β -ShdA. FL1-Height corresponde al anticuerpo anti-NANP (Ac. Mo. 2A10), SSC-Height= granularidad, FSC-Height= tamaño y Events es equivalente al número de células.



- pnirB LTB NANP β-ShdA
- pnirB LTB NANP CSP β-ShdA
- pnirB LTB β-ShdA

Fig.13. Citometría de flujo de las cepas que expresan la proteína β-ShdA. El histograma analiza simultáneamente los resultados de las cepas ShdA positivas, la selección de las bacterias está en función de su tamaño y granularidad. El control negativo pnirLTβ-ShdA tiene una IMF basal de 60 (curva gris), la cepa pnirLTB NANPβ-ShdA tiene una IMF=508 (curva púrpura) y la cepa pnirLTB NANP CSPβ-ShdA tiene una IMF=601 (curva azul). FL1-Height corresponde al anticuerpo anti-NANP (Ac. Mo. 2A10), mientras que Events equivale al número de células.

6.0 DISCUSIÓN

La identificación de los sistemas de secreción es necesaria para entender los procesos patogénicos inducidos por bacterias gramnegativas. De los 5 sistemas de secreción (I-V) descritos a la fecha en bacterias gramnegativas, el quinto sistema de secreción corresponde a una familia de proteínas llamadas autotransportadores (ATs). La gran mayoría de estas proteínas son codificadas por genes que se localizan dentro de las Islas de patogenicidad (Henderson IR & Nataro J, 2000) y algunas de ellas están asociadas con factores de virulencia, o inclusive algunas son factores de virulencia *per se*.

La estructura primaria de los ATs es única y comprende 3 dominios: una secuencia líder N-terminal, un dominio pasajero α (la proteína madura por translocar ó secretar) y un dominio β ó C-terminal (el dominio translocador). Consecuentemente, los ATs forman una estructura secundaria a base de hojas β -plegadas. En 1998 se pensó en un modelo hipotético de los ATs, con una estructura terciaria conformada por un β -barril insertado en la OM, con un poro central por el cual pasa el dominio pasajero (ó dominio α) y se transloca hacia la superficie bacteriana (Henderson IR & Nataro J, 1998). Aunque los conceptos acerca de las estructuras primaria y secundaria que conforman a los ATs, siguen siendo válidos en la actualidad, no sucede lo mismo con el modelo del β -barril monomérico, ya que una investigación reciente sobre el dominio C de la proteasa de IgA (C-IgAP) de *Neisseria gonorrhoeae*, demostró que este dominio anclado en la OM posee actividad formadora de poro a través de un complejo oligomérico de

aproximadamente 500 kDa, el complejo oligomérico está conformado por 6 monómeros de β -barril, dando como resultado una estructura de forma anular con una cavidad central de 2nm y un diámetro exterior de 8 nm. El poro a través del cual pasa el dominio pasajero, es aquel formado por los 6 monómeros y no el poro central de cada β -barril (Veiga E., et al., 2002). Este mecanismo es muy similar al empleado por otros sistemas de secreción observados en secretinas y estructuras fimbriales (Thanassi et al., 1998 y Stathopoulos et al., 2000).

Cabe subrayar que existen alrededor de 40 ATs (señalados en la tabla 2), entre los más estudiados se encuentran las proteínas AIDA-1 de *Escherichia coli* e lcsA de *Shigella flexneri*. Adicionalmente, existen otros ATs que aún no han sido completamente caracterizados, tal es el caso del ATs MisL de *Salmonella typhimurium*, descrito recientemente y que es codificado por un gen localizado dentro de la isla de patogenicidad SPI-3 (Ruiz-Pérez F et al., 2002). Muchas proteínas pertenecientes a la familia de los ATs, comparten homología en su dominio C-terminal (la parte que se ancla en la membrana). Ejemplo de ello son los ATs MisL, AIDA-1 y una proteína llamada ShdA recientemente descrita.

La proteína ShdA es el producto de un gen específico de *Salmonella entérica* subtipo I y se ha demostrado que está implicada en la prolongación del tiempo de eliminación de bacterias en las heces fecales del ratón (Kingsley et al, 2000).

Existen investigaciones destinadas a demostrar el papel de ShdA en la patogénesis inducida por *Salmonella typhimurium*, en las que se describe a ShdA como una proteína de 220 kDa, una vez que es expresada a partir del promotor pT7. En estos trabajos, se utilizó el dominio pasajero nativo de la proteína ShdA,

logrando inducir *in vivo* la expresión de la proteína, después de infectar ratones con *Salmonella typhimurium*. Sin embargo no lograron inducir *in vitro* la expresión de esta proteína. A este respecto, es importante señalar que la inducción *in vivo* de la expresión de ShdA, se debe a las condiciones de anaerobiosis presentes en el intestino. Más aún, encontraron que ShdA se expresaba en la superficie bacteriana e interactuaba con una proteína presente en el epitelio intestinal, muy similar a la fibronectina. Estos datos indicaron que la proteína ShdA está implicada en la colonización a nivel intestinal, aspecto patogénico que coloca a ShdA como un factor de virulencia de *Salmonella* (Kingsley R., et al., 2002).

Por otra parte, el dominio carboxilo terminal (dominio beta) de ShdA es homólogo a los dominios C-terminales de los ATs AIDA-1 de *E. coli*, IcsA de *Shigella flexneri* y MisL de *Salmonella entérica* serotipo *Typhi* y *Typhimurium*, lo que sugiere una función semejante. Sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado experimentalmente una función autotransportadora de ShdA.

El objetivo del presente trabajo fue demostrar que el dominio carboxilo (ó β) de la proteína ShdA, posee actividad autotransportadora, translocando péptidos ó proteínas hacia la superficie bacteriana. El péptido heterólogo NANP y la proteína CSP fueron usados como dominios pasajeros; ambos se expresaron bajo control del promotor *pnirB* inducible en anaerobiosis *in vitro* y el cual ha sido utilizado en otras investigaciones con el fin de obtener una expresión estable de antígenos heterólogos en cepas vacunales de *Salmonella* (Chatfield SN et al, 1992). Los resultados obtenidos en el presente trabajo acerca de la expresión de proteínas totales de las cepas recombinantes que expresan ShdA, demuestran que el péptido

heterólogo NANP fusionado al dominio β de ShdA aparece como un producto proteico de 58-60 kDa. En el caso de la proteína de fusión CSP, se observó un peso aproximado de 65 kDa. En la SDS-PAGE al 7.5%, se pudo observar un nivel adecuado de inducción en la expresión proteica, mediante condiciones anaeróbicas *in vitro*. Esto fue apoyado por los resultados generados de los ensayos tipo "Western-blot", en los que la presencia de la proteína de fusión de las cepas pnrBLTB NANP β -ShdA se manifestó como 2 bandas, que fueron más intensas en las cepas inducidas. En el caso de la cepa pnr BLTB β -ShdA NANP CSP, el ensayo tipo "western-blot" realizado con extractos de PT reveló la presencia de la proteína de fusión, a través de una sola banda de 65 kDa, posteriormente los resultados del ensayo tipo "Western-blot" hecho con PT y Pm, se observa un barrido, lo que indicaría una probable degradación de la CSP. A este respecto, en trabajos realizados con la proteína de fusión β -MisLCSP (Ruiz-Pérez F., datos no publicados), los ensayos tipo "Western-blot" han puesto de manifiesto a la CSP como una banda definida con un barrido, con un peso aproximado de 70 kDa. El barrido posiblemente se debe a un cierto grado de degradación de la proteína, algo también observado en *Escherichia coli* cepa pUC19CSP (Ruiz-Pérez F., et al., 2002).

La presencia de 2 bandas en los ensayos tipo "Western-blot" de extractos de PT y correspondientes a la proteína de fusión NANP β -ShdA, posiblemente se deba a que la proteína se sintetice como un zimógeno ó una proteína precursora (una forma inmadura), que una vez cortada proteolíticamente se convierte en la forma madura que pasa a periplasma y que después se ancla en OM. En *Escherichia*

coli, cada una de las proteínas periplásmicas y de OM, se sintetizan en el citoplasma como una proteínas precursoras y con una secuencia señal amino-terminal. Esta secuencia señal dirige al precursor a un conjunto de proteínas que catalizan la translocación del precursor a través de la IM. Durante la translocación, la secuencia señal es proteolíticamente cortada, generando una forma madura de la proteína, que es transportada hacia otro compartimento celular (von Heijne G, 1990; Danese PN & Silhavy TJ, 1998). Para apoyar la hipótesis de que la forma madura de la proteína de fusión, se encuentra en periplasma antes pasar a la superficie, adicionalmente se necesita analizar qué tipo de forma proteica se encuentra en la OM.

Las metodologías empleadas en este trabajo permitieron demostrar que el dominio β de ShdA es capaz de translocar antígenos heterólogos. La citometría de flujo revela que la mayor IMF (601) se detectó en la cepa que expresa la proteína CSP (fig.13), pero esto no quiere decir que β -ShdA sea más eficiente en el transporte de la proteína CSP en relación al transporte del péptido heterólogo NANP hacia la superficie celular. La diferencia podría explicarse en función de que la IMF es un parámetro directamente proporcional a la cantidad de antígeno de superficie. Adicionalmente, se debe considerar que el plásmido pnrB LTB NANP β -ShdA codifica para 4 péptidos NANP, en tanto que el plásmido pnrB LTB NANP CSP β -ShdA codifica 44 NANP (que constituyen la CSP). Lo anterior es confirmado al analizar los gráficos de punto, en donde se observa igual porcentaje de células que expresan el antígeno NANP en su superficie (48.2% para la cepa pnrB LTB NANP β -ShdA y 47.7% para la cepa pnrB LTB NANP CSP β -ShdA), (fig. 12 paneles h-i),

sugiriendo que el autotransportador ShdA no solo puede transportar a la superficie péptidos, sino también proteínas y con la misma eficiencia .

Esta investigación demostró por primera vez la capacidad autotransportadora de β -ShdA. Sin embargo, falta analizar si este autotransportador es capaz de formar oligómeros, como lo hace la C-IgAP (Veiga E., et al., 2002). A este respecto, cabe mencionar que los ATs presentan una substancial heterogeneidad, (Henderson IR & Nataro J, 1998) y no pueden comportarse de la misma manera.

7.0 CONCLUSIONES

1. La proteína ShdA es un autotransportador (ATs), capaz de translocar péptidos heterólogos, hacia la superficie de *Salmonella typhimurium*, a través de su dominio β , el cual presenta homología con el dominio C-terminal de los ATs: AIDA, IcsA y MisL.
2. ShdA es el segundo autotransportador descrito en el género *Salmonella* (después de MisL).
3. Péptidos y proteínas son transportados con igual eficiencia a través del autotransportador ShdA.

8.0 PERSPECTIVAS

Esta proteína podría representar un nuevo sistema biotecnológico para el desarrollo de vacunas, basadas en la utilización de vectores vivos atenuados ó "acarreadores" de antígenos inmunogénicos. Además de las aplicaciones vacunales, también existen otras como la construcción de absorbentes celulares bacterianos, la producción de dominios variables de inmunoglobulinas, exportación de dominios proteicos para estudios de interacciones ligando-receptor, creación de bibliotecas de péptidos útiles para ensayos de especificidad de anticuerpos, así como la exportación de proteínas biológicamente activas para uso biomédico y biotecnológico.

9.0. APENDICE

I. Medios de cultivos

Caldo BHI (BIOXON)

- Infusión cerebro-corazón.....	6.0 g
- Peptona de carne.....	6.0 g
- Cloruro de sodio (NaCl).....	5.0 g
- Dextrosa.....	3.0 g
- Peptona de gelatina.....	14.5 g
- Fosfato de sodio (Na ₃ PO ₄)	14.5 g
- Agua destilada (cbp).....	1000 mL

Disolver 37g en 1 L de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

BHI agar (BIOXON)

- Infusión cerebro-corazón.....	6.0 g
- Peptona de carne.....	6.0 g
- Cloruro de sodio (NaCl).....	5.0 g
- Dextrosa.....	3.0 g
- Peptona de gelatina.....	14.5 g
- Fosfato de sodio (Na ₃ PO ₄)	14.5 g
- Agar bacteriológico.....	1.5 g
- Agua destilada (cbp).....	1000 mL

Pesar 37g de infusión BHI y adicionar el 1.5% de agar, aforar con 1 L de agua destilada. Ajustar pH a 7.1 ± 0.02 a 25°C. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Cuando el medio de cultivo se encuentre aprox a 45°C, suplementar con 3 µL de ampicilina y 2µL de DHB 0.01% por cada mL de medio de cultivo. Homogeneizar y vaciar en cajas petri bajo condiciones de esterilidad.

Tioglicolato (NIH tioglicolato base DIFCO)

- (Bacto) Casitona.....	15.0 g
- (Bacto) extracto de levadura.....	5.0 g
- Dextrosa.....	5.5 g
- NaCl.....	2.5 g
- L-cisteína.....	0.5 g
- Tioglicolato de sodio.....	0.5 g

Pesar 29g y disolver en 1 L de agua. Llenar el frasco de cultivo $\frac{3}{4}$ partes de sus capacidad para favorecer las condiciones de anaerobiosis. Esterilizar de 121°-124°C por 15 min. Cuando el medio de cultivo se encuentre frío, suplementar con 3 µL de ampicilina y 2µL de DHB 0.1% por cada mL de medio decultivo, en condiciones de esterilidad. Cerrar herméticamente el frasco de cultivo para favorecer las condiciones de anaerobiosis.

Acido 2,3-dihidroxibenzoico (DHB) al 0.01%.

- Ac. 2,3-dihidroxibenzoico (Sigma)..... 0.01 g
- Metanol absoluto (JT Baker) (cbp)..... 100 mL

Disolver el DHB en metanol, filtrar por membrana de 0.22µm. Guardar de preferencia en frasco ámbar y a 4°C. Abrir en condiciones de esterilidad.

Ampicilina (Sector salud)

- Ampicilina..... 500 mg
- Agua inyectable (cbp)..... 2 mL

Disolver la ampicilina con 2 mL de agua inyectable. Agitar para homogeneizar perfectamente. Alicuotar en tubos eppendorf de 1 mL. Guardar a -20°C.

II. Extracción de proteínas totales.

Solución salina isotónica ó NaCl al 0.9% (SSI)

- NaCl..... 0.9 g
- Agua destilada (cbp)..... 100 mL

Pesar el NaCl, aforar a 1L de agua. Esterilizar a 121°C.

Buffer muestra para proteínas.

- Azul de bromofenol..... 0.01 g
- Glicerol (JT Backer)..... 10 mL
- SDS (grado electroforesis)..... 10 g
- Tris-base 200 mM disueltos en de Buffer stacking..... 40 mL
- Agua destilada (cbp)..... 100 mL

Disolver (a temperatura ambiente) todos los reactivos en 80 mL de agua destilada hasta homogenización completa. Aforar a 100 mL, alicuotar en volúmenes de 1mL y congelar a 20°C bajo cero hasta su uso. Al momento de usar, adicionar 50µL de 2-β-mercaptoetanol, mezclar por inversión.

III. Extracción de proteínas periplásmicas.

Sol. Stock de Tris-HCl[(hidroximetil)aminometano] 1 M, pH 8.0

- Tris-HCl..... 121 g
- Agua destilada (cbp)..... 1000 mL

Disolver el Tris-HCl en 800 mL de agua destilada, ajustar pH a 8.0 con ácido clorhídrico. Se necesitan aproximadamente 42 mL para ajustar a pH 8.0.

Sol. 30mM Tris-HCl + 20% de sacarosa pH 8.0

- Sol. stock de Tris-HCl..... 3mL
- Sacarosa (Merk)..... 20g
- Agua destilada (cbp)..... 100mL

Sol. 1mM EDTA pH 8.0

- Na₂ EDTA·2H₂O..... 186.1 g
- Agua destilada (cbp)..... 1000 mL

Disolver el Na₂ EDTA·2H₂O en 700 mL de agua. Ajustar el pH hasta 8.0 con sol. 10 mM de NaOH. Aforar a 1000 mL. Guardar a temperatura ambiente. Si se cuenta con solución concentrada comercial 0.5 mM EDTA pH 8.0 GIBCO-BRL, disolver 1 parte de la solución concentrada en 4 partes de agua destilada.

Sol. 5mM de MgSO₄

-MgSO₄·7 H₂O.....70.5 mg

-Agua destilada (cbp).....100 mL

Disolver el sulfato de magnesio en 50 mL y aforar a 100 mL con agua destilada. Guardar a 4°C hasta su uso.

IV. SDS-PAGE 12.5% y 7.5%

Colorante Azul de Coomassie al 0.25% para geles de proteínas.

-Metanol absoluto (JT Backer).....227 mL

-Acido acético glacial (JT Backer).....45 mL

-Agua destilada.....227 mL

-Azul de Coomassie (R250).....1.25 g

Mezclar todos los reactivos y homogenizar. Filtrar por gravedad en embudo con papel filtro Whatman No. 1. Guardar en frasco ámbar de preferencia a temperatura ambiente.

Sol. Fijadora.

-Metanol absoluto (JT Backer).....45 mL

-Agua destilada.....45 mL

-Ac. Acético glacial.....10 mL

Sol. decolorante.

-Metanol absoluto.....30 mL

-Ac. Acético glacial.....10 mL

-Agua destilada.....60 mL

Persulfato de Sodio (APS) al 10%

-Persulfato de sodio (SIGMA).....0.1 g

-Agua destilada (cbp).....10 mL

Pesar la sal y disolverla en el agua. Aforar a 10 mL. Disolver hasta completa homogenización, alicuotar en volúmenes de 100µL. Congelar a -20°C.

Buffer de corrimiento (5X) pH 8.3.

-Glicina.....94 g

-Tris base.....15.1 g

-Dodecil sulfato de sodio (SDS), sol. al 10%.....50 mL

-Agua destilada (cbp).....1000 mL

Pesar los reactivos sólidos en balanza granataria. Disolver en 600 mL agua destilada. Adicionar los 50 mL de la sol. de SDS y ajustar a pH 8.3 con HCl ó NaOH.

Buffer de empaque (stacking buffer) Tris 1M, pH 6.8 + SDS 0.27%

-Tris.....12.11 g

-SDS (grado electroforesis, Bio-Rad).....0.8 g

-Ac. Tricloroacético.....2 mL

-Agua (cbp).....100 mL

Disolver el Tris en 60 mL de agua. Ajustar a pH 6.8 con ác. tricloroacético. Adicionar poco a poco el SDS, sin agitar para evitar la formación de espuma. Aforar a 100 mL. Almacenar a 4°C.

Buffer de resolución (Resolving buffer) 1.5M Tris-base pH 8.8

Tris·HCl (Sigma).....2.28 g

Trizma-base (Sigma).....16.41 g

Agua destilada (cbp).....100 mL

Disolver las sales en 50 mL de agua destilada. Ajustar el pH de 8.8 a 8.9 con HCl y NaOH. Aforar a 100 mL con agua destilada.

Sol. de Acrilamida-Bisacrilamida

- Acrilamida..... 60 g
- Bis-acrilamida..... 1.6 g
- Agua destilada (cbp)..... 200 mL

Disolver la bis-acrilamida en 100 mL de agua destilada con agitación constante. Adicionar la acrilamida. Disolver con agitación y a 45°C de temperatura. Aforar a 200 mL. Almacenar en frasco ámbar y a 4°C.

Precaución: la acrilamida es neurotóxica, por lo que siempre debe ser manejada con guantes y cubrebocas.

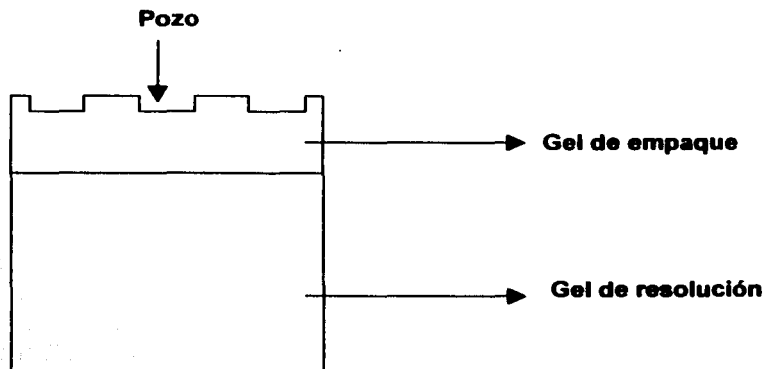
Resolving-gel

Reactivo	SDS-PAGE 7.5%	SDS-PAGE 12.5%
Acrilamida-Bisacrilamida al 30%	2.82 mL	4.7 mL
Resolving buffer pH 8.8	3.0 mL	3.0 mL
SDS 10%	120 µL	120 µL
Cloruro de sodio (NaCl) al 20%	240 µL	240 µL
Agua destilada	6.0 mL	6.0 mL
Persulfato de amonio (APS) al 10%	60 µL	60 µL
TEMED	12 µL	12 µL

Stacking-gel

Reactivo	SDS-PAGE (cualquier %)
Agua destilada	7.0 mL
Stacking buffer pH 6.8	1.25 mL
Acrilamida-Bisacrilamida 30 %	1.3 mL
Persulfato de sodio (APS) al 10%	50 µL
TEMED	8 µL

El gel de poliacrilamida consta de 2 partes, el gel de resolución (resolving gel) en la parte inferior; y el gel de empaque (stacking gel) en la parte superior. Ver figura la siguiente figura:



Preparar el gel de resolución, en un tubo falcon de 50 mL. Utilizar guantes en todo momento. Depositar las cantidades de los reactivos en el orden de aparición en la tabla, adicionar al último el TEMED, ya que este es el agente polimerizante. La mezcla anterior, se deposita en la cámara de electroforesis hasta llenar $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad. Inmediatamente, llenar hasta el tope de los vidrios de la cámara, con 2 mL de isopropanol. Lo anterior tiene como finalidad el evitar una superficie cóncava que interfiere con un buen corrimiento. La polimerización (solidificación) del gel resolviendo, es verificada con el gel residual en tubo falcon. Después de la polimerización, se lava con agua destilada la superficie del gel resolviendo. Se prepara el gel stacking de la misma manera que el resolviendo. El gel stacking se deposita sobre el gel resolviendo. Inmediatamente y antes de que se polimerice. Se coloca el peine y la polimerización se verifica con el gel residual en tubo falcon. Lavar los pozos con agua destilada con mucho cuidado. Adicionar el buffer de corrimiento a la cámara según las instrucciones del aparato. Cargar las muestras de proteínas.

Marcador de pesos moleculares (preteñido) para proteínas. Biolabs^R

PROTEINA	FUENTE	Masa molecular aparente (kDa)
MBP- β -galactosidasa	E. coli	175
MBP-paramiosina	E. coli	83
Glutamato deshidrogenasa	Hígado bovino	62
Aldolasa	Músculo de conejo	47.5
Trisafosfato isomerasa	Músculo de conejo	32.5
β -Lactoglobulina A	Leche bovina	25
Lisozima	Clara de huevo	16.5
Aprotinina	Pulmón bovino	6.5

V. Electrotransferencia

Buffer de transferencia (1X) pH 8.3

-Glicina.....	2.9 g
-Tris-base.....	5.8 g
-SDS.....	0.37 g
-Metanol absoluto.....	200 mL
-Agua destilada (cbp).....	1000 mL

Disolver la glicina y el tris-base en 500 mL de agua destilada con agitación constante. Adicionar el metanol y al último el SDS para evitar la formación de espuma. Ajustar a pH 8.3. Aforar a 1L. Guardar en frasco ámbar a 4°C.

La transferencia es llevada a cabo toda vez que se recupera uno de los geles provenientes de la SDS-PAGE. Entre los aspectos relevantes de ésta técnica, se encuentra el cuidado de colocar la membrana de nitrocelulosa y el gel de poliacrilamida, en contacto directo para que la dirección de la corriente eléctrica permita la transferencia de las bandas proteicas. En el presente trabajo, la transferencia se verificó, por la nítida visualización de las bandas correspondientes al marcador de pesos moleculares.

VI. Ensayo tipo "Western-blot"

Buffer salino de fosfatos (PBS 1X) pH 7.2 -7.4

-Cloruro de sodio (NaCl).....	8.0 g
-Cloruro de potasio (KCl).....	0.2 g
-Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄).....	1.44 g

-Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄)..... 0.24 g
 -Agua destilada (cbp)..... 1000 mL
 Disolver las 4 sales en 600 mL de agua, con agitación constante. Ajustar el pH de 7.2 a 7.4 con HCl. Aforar a 1000 mL. Esterilizar por filtración con membrana 0.44 µm. No esterilizar por autoclave. Almacenar a 4°C ó temperatura ambiente.

PBS- leche descremada al 5%.

-Leche descremada (Nestlé[®])..... 0.5 g
 -PBS 1X (cbp)..... 10 mL
 Disolver la leche descremada en 5 mL de PBS 1X, después aforar a 10 mL. Usar inmediatamente.

Anticuerpo monoclonal 2 A 10 dilución 1:1000

-PBS-leche descremada al 5%..... 5 mL (5000 µL)
 -Anticuerpo monoclonal 2 A10 5 µL
 -Ampicilina (solución de trabajo)..... 100 µL
 Diluir 5µL de anticuerpo 2 A10 en 5 mL de solución de leche descremada al 5%. Adicionar el antibiótico justo antes de la reacción. Recuperar y congelar a -80°C. Se puede volver a usar hasta veces más.

Segundo anticuerpo (Anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano) dilución 1:1000

-PBS-leche descremada al 5%..... 5 mL (5000 µL)
 -Anticuerpo Goat anti-mouse IgG (H+L) Premium Quality Peroxidase labeled. Zymax (1 mg/mL)..... 5 µL
 Diluir el anticuerpo en los 5 mL de la solución de leche descremada al 5%. No se necesita antibiótico ni de reciclaje.

Sol. reveladora

-1,4-cloro-α-naftol..... 30 mg
 -Metanol absoluto (JT Baker)..... 10 mL
 -PBS 1X..... 50 mL
 -Peróxido de hidrógeno al 30% (H₂O₂) (JT Baker)..... 100 µL

Disolver el 1,4-cloro-α-naftol en los 10 mL de metanol (Sol. A). Depositar en una caja de plástico, la membrana de nylon. Adicionar el PBS, la solución A y al último el H₂O₂. La aparición de una banda morado-café se toma como positiva. La reacción tiene una duración máxima de 5 min. Detener la reacción con PBS 1X ó con agua destilada. Dejar secar la membrana.

VII. Inmunofluorescencia indirecta

Sol. salina isotónica 0.9% (SSI).

Se puede utilizar la misma solución empleada en la extracción de proteínas totales.

PBS 1X (estéril).

Se puede utilizar la misma solución empleada en la técnica de Western-blot.

Anticuerpo 2 A10 dilución 1:500

-PBS 1X (estéril)..... 500 µL
 -Anticuerpo monoclonal 2 A10..... 1 µL

Preparar el anticuerpo en un tubo eppendorf de 1 mL. Diluir el anticuerpo en el PBS estéril. No adicionar antibiótico. Si se requiere de recuperarlo, centrifugar hasta 3 veces para eliminar el pellet bacteriano, congelarlo a -20°C .

Segundo anticuerpo (anti-IgG conjugado con isotiocianato de fluoresceína) dilución 1:100

-PBS 1X (estéril)..... 100 μL

-Anticuerpo Goat anti-mouse IgG (H+L). FITC conjugate

1.5 mg/mL. Zymax..... 1 μL

Diluir el anticuerpo en el PBS. No adicionar antibiótico. Cuando se incuba con las bacterias, proteger de la luz, envolviendo los tubos de reacción en papel aluminio.

VIII. Citometría de flujo

Buffer salino de fosfatos (PBS 10X) pH 7.2

-NaCl..... 137 mM

-KCl..... 2.7 mM

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.7 mM

- KH_2PO_4 1.4 mM

-Agua destilada (cbp)..... 1000 mL

Disolver las sales en 700 mL de agua, ajustar el pH a 7.2 con NaOH y aforar a 1000 mL. Guardar la solución a 4°C .

Anticuerpo 2 A10 dilución 1:250

-PBS 1X (comercial)..... 500 μL

-Anticuerpo monoclonal 2 A10..... 2 μL

Diluir el anticuerpo en el PBS. Hacer esta dilución en un tubo eppendorf. Si se requiere de recuperarlo, no adicionar antibiótico, solo centrifugar 3 veces para eliminar el pellet bacteriano. Congelar a -20°C .

Segundo anticuerpo (anti-IgG conjugado con isotiocianato de fluoresceína) dilución 1:100

-PBS 1X (comercial)..... 100 μL

-Anticuerpo Goat anti-mouse IgG (H+L). FITC conjugate

1.5 mg/mL. Zymax..... 1 μL

Diluir el anticuerpo en el PBS. Cuidar los tubos de reacción de la luz, protegiéndolos con papel aluminio. No recuperar este anticuerpo.

10.0.REFERENCIAS

1. Anderson KN, Carballeira KE, Magnusson C, Persson O, Stendahl, Wolf-Watz H, Fällmann M. "YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis". *Mol Microbiol.* 1996. 20: 1057-1069.
2. Benz I, Schmidr MA. "Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27)". *Infect & Immun.* 1992. 60 (1): 13-18.
3. Benz I., Schmidt MA. "Cloning and expresion of adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*". *Infect & Immun.* 1989. 57: 1506-1511.
4. Bernardini ML, Mounier J, d' Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ. "Identification of IcsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin" . *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989. 86: 3867-3871.
5. Binet R, Létoffés S, Ghigo J, Delepelaire P, Wandersman C. "Protein secretion by gramnegative bacterial ABC exporters: A review". 1997. *Gene.* 192: 7-11.
6. Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA. " The SPI-3 pathogenecity island of *Salmonella enterica*". *J Bacteriol.* 1999. 181(3): 998-1004.
7. Brok R, Van Gelder P, Winterhalter M, Ziese U, Koster AJ, de Cock H, Koster M. "The C-terminal domain of the *Pseudomas* secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity". *J Mol Biol.* 1999. 181:7212-7220.
8. Burns DL. "Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol.* 1999. 2: 25-29.
9. Chatfield SN, Charles IG, Makoff AJ, Oxe MD, Dougan G, Pickard D, Slater D, Fairweather NF. "Use of the *nirB* promoter to direct the stable expression of the heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine". *Bio/Technol.* 1992. 10: 888-892.

10. Christie PJ, Vogel JP. "Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells" *Trends Microbiol.* 1998. 8(8): 354-360.
11. Christie PJ. "*Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multi-functional transporters in eubacteria". *J Bacteriol.* 1997. 179: 3085-3094.
12. Covacci A, Falkow S, Berg DE, Rappuoli R: "Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*?" *Trends Microbiol.* 1997. 5: 205-208.
13. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL. "Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*". *Science.* 1984. 225: 593-599.
14. Danese PN, Silhavy TJ. "Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*". *Annu Rev Genet.* 1998. 32: 59-94.
15. Enea V, Ellis J, Zavala F, Arnot D. "DNA cloning of *Plasmodium falciparum* gene: amino acid sequence of repetitive epitope" *Science.* 1984. 225: 628-630.
16. Fällmann M, Anderon K, Håkansson S, Magnusson KE, Stendahl O, Wolf-Watz H. "*Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells". *Infect & Immun.* 1995. 63: 3117-3124.
17. Galán JE. "Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells". *Mol Microbiol.* 1996. 20 (2): 263-271.
18. Gennin S, Boucher CA. "A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain". *Mol Gen Genet.* 1994. 243: 112-118.
19. Gentschev I, Mollenkopf H, Sokolovic Z, Hess J, Kaufmann S, Goebel W. "Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway¹". *Gene.* 1996. 179: 133-140.
20. Golberg MB, Barzu O, Parsot C, Sansonetti PJ. "Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement". *Infect Agents Dis.* 1993. 2: 210-211.
21. Golberg MB, Sansonetti PJ. "*Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infect & Immun.* 1993. 61: 4941-4946.

22. Golberg MB, Theriot JA. "Shigella flexneri surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995. 92: 6572-6576.
23. Gómez-Duarte OG, Pasetti MF, Santiago A, Sztein MB, Hoffman SL, Levine MM. "Expresion, extracellular secretion and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 in *Salmonella* vaccine strains". *Infect & Immun*. 2001. 69 (2): 1192-1198.
24. González C, Hone D, Noriega FR, Tacket CO, Davis JR, Genevieve L, Nataro J, Hoffman S, Malik A, Nardin E, Sztein MB, Heppener DG, Fouts TR, Isibasi A, Levine MM. "*Salmonella typhi* Vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: Strain construction and safety immunogenicity in humans". *J Infect Dis*. 1994. 169: 927-931.
25. Guan K, Dixon J E. "Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*". *Science*. 1990. 249: 553-556.
26. Guilvout I, Hardie K, sauvonnet N, Pugsley AP. "Genetic dissection of the outer membrane secretin Pul D: are there distinct domains for multimerization and secretion specificity?". *J Bacteriol*. 1999. 181: 7212-7220.
27. Hacker J, Kaper J B. "Pathogenicity islands and the evolution of microbes". *Annu Rev. Microbiol*. 2000. 54: 641-679 .
28. Hauck CR, Meyer T F. "The lysosomal/phagosomal membrane protein h-lamp-1 is a target of the IgA1 protease of *Neisseria gonorrhoeae*". *FEBS Lett*. 1997. 405:86-90.
29. Hemmilä IA. "Applications of fluorescence in immunoassays". In: Chemical Analysis Series. Vol.117. John Wiley & Sons Inc. New York. USA. 1991.
30. Henderson I, Capello R, Nataro J. "Autotransporters proteins, evolution and redefining protein secretion". *Trends Microbiol*. 2000. 8(12): 529-532.
31. Henderson IR, Nataro J, Kaper J, Meyer T, Farrand S, Burns D, Finlay B. "Renaming protein secretion in the gram-negative bacteria". *Trends Microbiol*. 2000. 8(8): 352-353.
32. Henderson IR, Nataro JP. "Virulence functions of autotransporters proteins". *Infect & Immun*. 2001. 69 (3): 1231-1243.
33. Herrington DA, Clyde G, Lonsonsky G, Cortesia M, Murphy JR, Davis J, Bagar S, Felix AM, Heimer EP, Gillessen D, Nardin E, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Hollingdale MR, Levine MM. "Safety and immunogenecity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites". *Nature*. 1987. 328: 257-259.

34. Hess JG, Dietrich G, Gentschev I, Miko D, Goebel W, Kaufmann SH. "Protection against murine listeriolysis by and attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the naturally somatic antigen superoxide dismutase". *Infect & Immun.* 1997. 65: 1286.
35. Hobbs M, Mattick JS. "Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general for the formation of surface-associated protein complexes". *Mol Microbiol.* 1993. 10: 233-243.
36. Hoiseth SK, Stocker BA. "Aromatic-depend *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines". *Nature.* 1981. 291: 238-239.
37. House D, Bishop A, Parry C, Dougan G, Wain J. "Typhoid fever: pathogenesis and disease". *Curr Opin Infect Dis.* 2001. 14: 573-578.
38. Hueck C. " Type III protein secretion system in bacterial pathogens of animals and plants". *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998. 62: 379-433.
39. Jarchau T, Chacrabarty T, Garcia F and Goebel W. "Selection for transport competence of C-terminal polypeptides derived from *Escherichia coli* hemolysin: the short test polypeptides capable of autonomous Hly B-Hly D-dependent secretion comprise the C-terminal 62 amino acids of the Hly A". *Mol Gen Genet.* 1994. 245:53-560.
40. Jose J, Jähnig F, Meyer T F. "Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters". *Mol Microbiol.* 1995. 18: 377-382.
41. Jose J, Wolk D, Lorenzen H, Wenschuh, Meyer T F. "Humann T-cell response to meningococcal immunoglobulin A1 protease associated alpha proteins. *Scand J Immunol.* 2000. 51: 176-185.
42. Kantele A, Kantele JM, Savilahti E, Westerholm M, Arvilommi H, Lazarovits A, Butcher Ec Mälekä PH. "Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation". *J Immunol.* 1997. 158: 574-579.
43. Kingsley RA, Santos RL, Keestra AM, Adams LG, Bäumlér AJ. "*Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine". *Mol Microbiol.* 2002. 43 (4): 895-905.
44. Kingsley RA, van Amsterdam K, Kramer N, Bäumlér AJ. "The ShdA gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding". *Infect & Immun.* 2000. 68: 2720-2727.

45. Klauser T, Kramer J, Otzelberg K, Pohler J, Meyer T F. "Characterization of the *Neisseria* IgA β -core: The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion". *J Mol Biol.* 1993. 234: 579-593.
46. Koronakis V, Li J, Koronakis E, Stauffer K: "Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux systems, derived from two-dimensional crystals". *Mol Microbiol.* 1997, 23: 617-626.
47. Kruisbeck AM, Margulles DH, Shevach EM, Strover W. "Immunofluorescence and cell sorting". In: Currents Protocols in Immunology. Vol I. John Wiley & Sons. Wiley-Interscience. New York. USA. 1991.
48. Kruisbeck AM, Margulles DH, Shevach EM, Strover W. "Isolation and Analysis of proteins". In: Currents Protocols in Immunology. Vol I. John Wiley & Sons. Wiley-Interscience. New York. USA. 1991.
49. Kumar S, Miller LH, Quanky LA. "Cytotoxic T-cell specific for circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*". *Nature.* 1988. 334: 258-261.
50. Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature.* 1987. 227: 680-685.
51. Lattemann CT, Maurer J, Gerland E, Meyer T. "Autodisplay: Functional display of active β -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter". *J Bacteriol.* 2000. 182 (13): 3726-3733.
52. Letellier L, Howard SP, Buckley JT. "Studies on the energetics of proaerolysin secretion across the outer membrane of *Aeromonas* species". *J Biol Chem.* 1997. 272 (17): 11109-11113.
53. Letoffe S, Delepelaire P, Wandersman C: "Protein secretion in gram negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exports is ordered and prompted by substrate binding". *EMBO J.* 1996. 15: 5804-5811.
54. Levine MM, Galen J, Barry E, Noriega F, Chatfield S, Sztein M, Dougan G, Tacket C. "Attenuated *Salmonella* as live oral vaccines against typhoid fever and as live vectors". *J Biotechnol.* 1996. 44: 193-196
55. Lin L, Ayala P, Larson J, Mulks M, Fukuda M, Carlsson SR, Enns C, So M. "The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells". *Mol Microbiol.* 1997. 24: 1083-1094.
56. Lorenzen D.R. Dux F, Wolk U, Tsirpouchtsidis A, Hass G, Meyer T F. "Immunoglobulin A1 protease, an exoenzyme of pathogenic *Neisseria*, is a potent inducer of proinflammatory cytokines. *J Exp Med.* 1999. 190: 1049-1058.

57. Marciano DK, Russel M, Simon SM. "An aqueous channel for filamentous phage export". *Science*. 1999. 284: 1516-1519.
58. Maurer J, Jose J, Meyer T. "Autodisplay: One-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*". *J Bacteriol*. 1997. 179: 794-804.
59. Maurer J, Jose J, Meyer T F. "Autodisplay: One-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*". *J Bacteriol*. 1997. 179 (3): 794-804.
60. Noegel A, Redest U, Spring W, Goebel W. "Plasmid cistrons controlling synthesis and excretion of the exotoxin α -haemolysin of *Escherichia coli*". *Mol Gen Genet*. 1979. 175:343-350.
61. Nowen N, Ranson N, Saibil H, Wolpensinger B, Engel A, Ghazi A, Punsley AP. "Secreitin Pul D: association with pilus PulS, structure, and ion-conducting channel formation". *Proc natl Acad Sci USA*. 1998. 96:8173-8177.
62. Nunn DN. "Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies?". *Trends Cell Biol*. 1999. 9: 402-408.
63. Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer F. "Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease". *Nature*. 1987. 325: 458-462.
64. Poquet I, Faucher D, Pugsley AP. "Stable periplasmic secretion intermediate in the general secretory pathway of *Escherichia coli*". *EMBO J*. 1993. 12 (1): 271-278.
65. Pugsley A. "The complete general secretory pathway in gramnegative bacteria". *Microbiol Rev*. 1993. 57: 50-108.
66. Pugsley AP, Poquet I, Kornacker MG. "Two distinct steps in pullulanase secretion by *Escherichia coli* K12". *Mol Microbiol*. 1991. 5 (4):865-873.
67. Rosqvist R, Bölin I, Wolf-Watz H. "Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infect & Immun*. 1988. 56: 2139-2143.
68. Ruiz-Pérez F, Barry EM, Paton J, Sampson E, Levine MM. "High level anti-PSA antibodies response by a single-dose oral recombinant-*Salmonella* vaccine expressing the PSA antigen in the periplasmic space". (Manuscrito en preparación).

69. Ruiz-Pérez F, León-Kempis R, Santiago-Machuca A, Ortega-Pierres G, Barry E, Levine M, González C. "Expresion of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)₄ on the surface of *Salmonella enterica* using the Autotransporter MisL". *Infect & Immun*. 2002. 70 (7): 3611-3620.
70. Rüsman H, Homayoun S, Poblete F, Fu X, Galán E, Donis R. "Delivery of epitopes by the *Salmonella* type secretion system for vaccine development". *Science*. 1998. 281: 565-568.
71. Salmond G, Reeves P. "Membrane traffic wardens and proteins secretion in gram-negative bacteria". *Trends Biochem Sci*. 1993. 18: 7-12.
72. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. "Molecular cloning: A Laboratory manual". Cold spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 1982.
73. Sandkvist M, Ovebye ML, Hough LP, Morales VM, Bagdasarian M. "General secretion pathway (eps) genes required for toxine secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*". *J Bacteriol*. 1997. 179 (122):6994-7003.
74. Sansonetti PJ, Egile C. "Moleclar bases of epithelial cell invasion by *Shigella flexneri*". *Antonie Leeuwenhoek*. 1998. 74: 191-197.
75. Sansonetti PJ. "Genetic and molecular bases of epithelial cell invasion by *Shigella* species". *Rev Infect Dis*. (Suppl). 1991. 13 (4):S285-S292.
76. Schirmer T, Keller TA, Wang YF, Rosenburch JP. "Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution". *Science*. 1995. 267: 512-514.
77. Schneider E, Hunke S. "ATP-binding cassette (ABC) transport systems: Functional and estructural aspects of the ATP hydrolysing subunits domains". *FEMS Micobiol Rev*. 1998. 22: 1-20.
78. Segal G, Purcell M, Shuman HA: "Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome". *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998. 95:1669-1674.
79. Sirad JC, Niedergang F, Kraehnstuhl JP. "Live attenuated *Salmonella* : a paradigm of mucosal vaccines". *Immunol Rev* . 1999.171: 5-26.
80. Stathopoulos C, Hendrixon DR, Thanassi DG, Hultgren SJ, St Geme JW.III, Curtiss R III. "Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story". *Microbes Infect*. 2000. 2: 1061-1072.

81. Strom MS, Nunn DN, Lory S. "Multiple roles of pilus biogenesis protein PilD: Involvement of pilD in excretion of enzymes from *Pseudomonas aeruginosa*". *J Bacteriol.* 1991. 173:1175-1180.
82. Suhr M, Benz I, Schmidt MA. "Processing of the AIDA-1 precursor: removal of AIDA^c and evidence for the outer membrane anchoring as a β -barrel structure". *Mol Microbiol.* 1996. 22 (1): 31-42.
83. Sukhan A. "The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella typhimurium*: common and unique features". *Cell Mol Life Sci.* 2000. 57:1033-1049.
84. Thanabalu T, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V: substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bringing of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.* 1998. 17: 6487-6496.
85. Thanassi D, Hultgren J. "Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane". *Curr Opin in Cell Biol.* 2000. 12: 420-430.
86. Thanassi DG, Saulino ET, Lombardo MJ, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. "The PapC usher form an oligomeric channel: Implications for pilus biogenesis across the outer membrane". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998. 95:3143-3151.
87. Veiga E, Sugawara E, Nikaido H, de Lorenzo V, Fernández LA. "Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains". *EMBO J.* 2002. 21(9): 2122-2131.
88. Verma NK, Ziegler HK, Stocker BA, Schoolnick GK. "Induction of a cellular immune response to a defined T-cell epitope as an insert in the flagellin of a live vaccine strain of *Salmonella*". 1995. *Vaccine.* 13: 235.
89. Vogel JP, Andrews HL, Wong SR, Isberg RR. "Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*". *Science.* 1998. 279: 873-876.
90. Von Heijne G. "The signal peptide". *J Membr Biol.* 1990. 115: 195-201.
91. Wagner W, Vogel M, Goebel W. "Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions". *J Bacteriol.* 1983. 154:200-210.
92. Weiss AA, Johnson FD, Burns DL. "Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993. 90: 2970-2974.

93. Wu S, Pascual DW, Lewis GK, Hone DM. "Induction of mucosal and systemic responses against human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 in mice after oral immunization with a single dose of a *Salmonella*-HIV vector". *AIDS Res Hum Retrov*. 1997. 13: 1187.
94. Young GM, Schmiel DH, Miller VL. "A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999. 96: 6456-6461.
95. Zavala F, Tam JP, Masuda A. "Synthetic peptides as antigens for the detection of humoral immunity to *Plasmodium falciparum* sporozoites". *J Immunol Methods*. 1986. 93: 55-61.