



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Purificación y obtención de anticuerpos de las proteínas
EspA y EscJ del sistema de secreción de efectores de
virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

DELGADO HERNÁNDEZ ERIKA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO



2007



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.

Hoja de datos del jurado

1. Delgado
Hernández
Erika
57673561 Universidad nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099089117

2. Dra
Bertha
González
Pedrajo

3. Dr
Heliodoro
Celis
Sandoval

4. Dr
Georges
Dreyfus
Cortes

5. Dra
Laura
Kawasaki
Watanabe

6. M.en I.B.B.
Claudia Andrea
Segal
Kischinevzky

7. Purificación y obtención de anticuerpos de las proteínas EspA y EscJ del sistema de secreción de efectores de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena.

66 pp
2007

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 325 Norte del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Bertha González Pedrajo, con el apoyo de los donativos P46551-Q de CONACYT y IN217105 de la DGAPA, UNAM.

Este trabajo se lo dedico a:

A mis papás por apoyarme en todo momento, por creer en mí y saber impulsarme en los momentos más difíciles. Ustedes esculpieron mi carácter, me dieron las bases y gracias a ello ahora soy lo que soy. Mis triunfos no solo son míos, también son suyos.

A mis hermanos con los que he compartido toda una vida de experiencias, con los que he llorado de alegría y tristeza, que siempre me han apoyado y aconsejado.

A Dom, por estar siempre a mi lado (a pesar del tiempo y la distancia), por escucharme y enseñarme a creer en mí.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra Bertha González Pedrajo por permitirme formar parte de su grupo de investigación, compartir conmigo lo que sabe y ayudarme a crecer como persona. Toda mi vida estaré agradecida por la oportunidad que me dio.

A la Dra. Norma Espinosa Sánchez por resolver mis dudas hasta en los momentos más inoportunos, por ayudarme cuando las cosas se atoraron y por darme sus opiniones sobre este trabajo.

A mis amigos del laboratorio Angel, Eli, Mariana, Miguel, Raulito y Julia por haberme hecho la estancia en el laboratorio tan amena. Voy a extrañarlos.

ÍNDICE

Resumen.....	I
Índice.....	II
Lista de abreviaturas	III
I. Introducción.....	1-22
1.1. Cepas diarregénicas de E.coli.....	1
1.2. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC) y la lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E).....	4
1.3. Secreción de proteínas	8
1.3.1. Sistemas de secreción Sec dependientes.....	9
1.3.2. Sistemas de secreción Sec independientes	10
1.4. Sistema de secreción Tipo 3 (SST3).....	10
1.4.1. Sistemas de secreción tipo 3 asociado a virulencia o inyectisoma	10
1.4.2. El complejo aguja	13
1.4.3. El anillo del complejo aguja está formado por un anillo de lipoproteína.....	15
1.4.4. El ensamblaje del complejo aguja.....	17
1.5. El inyectisoma de EPEC.....	18
1.5.1. El filamento EspA.....	18
1.5.2. El anillo EscJ.....	20
II. Objetivos	23
III. Material y métodos.....	24-36
3.1. Esquema general.....	24
3.2. Amplificación de los genes <i>espA</i> y <i>escJ</i> por PCR.....	26
3.3. Clonación de los genes <i>espA</i> y <i>escJ</i>	27
3.3.1. Clonación del gen <i>espA</i> en el vector pUC18.....	28
3.3.2. Subclonación del gen <i>espA</i> y clonación del gen <i>escJ</i> en el vector pET19b.....	29
3.3.3. Subclonación del gen <i>espA</i> y clonación del gen <i>escJ</i> en el vector pTrc99aFF4.....	30
3.4. Inducción de la construcción pEEespA y purificación de la proteína recombinante His-EspA.....	32
3.5. Obtención de anticuerpos anti-EspA	33
3.6. Determinación del título de anticuerpos	34
3.7. Ensayo de secreción.....	34
3.8. Inducción de la construcción pEEescJ y purificación de la proteína recombinante His-EscJ.....	35
3.9. Análisis bioinformático de la proteína EscJ.....	35
IV. Resultados.....	37-47
4.1. Amplificación del gen <i>espA</i>	37
4.2. Clonación del gen <i>espA</i>	37
4.3. Inducción de la construcción pEEespA y purificación de la proteína recombinante His-EspA.....	39
4.4. Caracterización del suero anti His-EspA.....	41
4.5. Ensayo de secreción.....	42
4.6. Amplificación del gen <i>escJ</i>	43
4.7. Clonación del gen <i>escJ</i>	43
4.8. Inducción de la construcción pEEescJ y purificación de la proteína recombinante His-EscJ.....	44
4.9. Análisis bioinformático de la secuencia de la proteína EscJ.....	46
V. Discusión.....	48-54
VI. Conclusión.....	55
VII. Referencias.....	56-59
Apéndice A.....	60-63
Apéndice B.....	64-66

LISTA DE ABREVIATURAS.

Arp2/3	<u>A</u> ctin related protein 2/3
A/E	<u>A</u> dherence and <u>e</u> ffacement
AA	<u>A</u> gregative <u>a</u> dherence
AAA+	<u>A</u> TPases associated with various cellular <u>a</u> ctivities
AAF	<u>A</u> ggregative <u>a</u> dherence <u>f</u> imbria
AND	<u>A</u> cido <u>d</u> esoxirribonucleico
AT	<u>A</u> uto <u>t</u> ransporter
BFP	<u>B</u> undle forming <u>p</u> ilus
Ces	<u>C</u> haperone for <u>E. coli</u> secretion
CU	<u>C</u> haperon- <u>u</u> sher
DA	<u>D</u> iffusely <u>a</u> dherent
DO	<u>D</u> ensidad <u>ó</u> ptica
DAEC	<u>D</u> iffusely <u>a</u> dherent <u>E. coli</u>
EAEC	<u>E</u> nteroaggregative <u>E. coli</u>
EAF	<u>E</u> PEC adherent factor
EHEC	<u>E</u> ntero <u>h</u> emorrhagic <u>E. coli</u>
EIEC	<u>E</u> ntero <u>i</u> nvasive <u>E. coli</u>
EPEC	<u>E</u> nteropathogenic <u>E. coli</u>
Esc	<u>E. coli</u> secretion
ETEC	<u>E</u> nterotoxigenic <u>E. coli</u>
GAP	<u>G</u> TPase activating protein
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
LEE	<u>L</u> ocus of enterocytic <u>e</u> ffacement
Ler	<u>L</u> EE-encoded <u>r</u> egulator
ORF	<u>O</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame
PCR	<u>P</u> olimerase chain reaction
Sep	<u>S</u> ecretion of <u>E. coli</u> proteins
SST1	<u>S</u> istema de secreción <u>t</u> ipo <u>1</u>
SST2	<u>S</u> istema de secreción <u>t</u> ipo <u>2</u>
SST3	<u>S</u> istema de secreción <u>t</u> ipo <u>3</u>
SST5	<u>S</u> istema de secreción <u>t</u> ipo <u>5</u>
TPS	<u>T</u> wo partner system
WASP	<u>W</u> iskott- <u>A</u> ldrich syndrome protein
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
TBS	<u>T</u> ris-buffered saline
BB	<u>B</u> inding <u>b</u> uffer
PBS	<u>P</u> hosphate-buffered saline

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es una cepa diarreagénica de *E. coli* que se caracteriza por la formación de la lesión de adherencia y eliminación (A/E). Este fenotipo es inducido por la translocación de proteínas efectoras con la ayuda del sistema de secreción tipo 3 (SST3) asociado a virulencia o inyectisoma. Las proteínas efectoras producen alteraciones en el citoesqueleto, inducen una serie de transducción de señales y finalmente producen la eliminación de las microvellosidades del intestino. Este sistema es complejo y se compone por alrededor de 20 proteínas, 8 de las cuales presentan homología con el cuerpo basal flagelar. Dentro de este grupo de proteínas destaca la lipoproteína EscJ que forma un anillo periplásmico asociado a la membrana interna por ser una de las proteínas purificadas en este trabajo. El inyectisoma de EPEC está caracterizado por la presencia de una estructura filamentosa denominada filamento EspA, formado por la proteína EspA, la cual también fue purificada en este trabajo. Debido a que varios componentes del inyectisoma han sido pobremente estudiados, las características estructurales en detalle y la organización molecular del sistema siguen sin entenderse por completo. En este trabajo se purificaron dos de las proteínas que forman componentes estructurales del inyectisoma de EPEC (anillo EscJ y filamento EspA) y se generaron anticuerpos específicos para éstas. Estos anticuerpos serán muy útiles para detectar interacciones con otros componentes del sistema y de esta manera caracterizar al inyectisoma de EPEC.

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias se han adaptado a un amplio espectro de ambientes, incluyendo el cuerpo humano. Pocos microorganismos son tan versátiles como *Escherichia coli*, que es una bacteria anaerobia facultativa que constituye una parte importante de la microbiota intestinal del humano (Eslava *et al.*, 2001). *E. coli* y su hospedero humano coexisten con mutuo beneficio por décadas, ya que las cepas comensales no provocan enfermedades a menos que se trate de un individuo inmunocomprometido o cuando las barreras gástricas son interrumpidas. El principal nicho de esta bacteria es la mucosa del colon de los mamíferos en donde, es un buen competidor, siendo la bacteria anaerobia facultativa más abundante (Kaper *et al.*, 2004).

Por otro lado, existen numerosas clonas patógenas de *E. coli* que están muy adaptadas gracias a la adquisición de atributos de virulencia específicos, que les confieren la capacidad de colonizar nuevos nichos y les permiten provocar una gran diversidad de enfermedades (Kaper *et al.*, 2004) Las enfermedades más comunes causadas por *E. coli*, son las del tracto urinario, sepsis/meningitis y enfermedades gastrointestinales, en las que se produce diarrea acuosa o algunas formas de infección localizada o invasiva (Nataro y Kaper, 1998). Las manifestaciones clínicas provocadas por esta bacteria en ocasiones se parecen a las ocasionadas por otras bacterias entéricas como *Shigella* y *Salmonella*.

1.1 Cepas diarreagénicas de *E. coli*.

El tracto gastrointestinal de los humanos es susceptible a las infecciones por *E. coli* diarreagénicas, ya que estos patógenos son ingeridos por la vía oral. Entre las cepas que son causantes de enfermedades gastrointestinales destacan *E. coli* enteropatógena EPEC, *E. coli* enterotoxigénica ETEC, *E. coli* enteroinvasiva EIEC, *E. coli* enterohemorrágica EHEC y *E. coli* enteroagregativa EAEC, que constituyen un serio problema de salud pública a nivel mundial (Chen y Frankel, 2005).

Una de las características más conservadas dentro de las cepas diarreagénicas de *E. coli* es su capacidad de colonizar la superficie de la mucosa del intestino a pesar de sus movimientos peristálticos y la competencia por nutrientes con el resto de la biota intestinal, así como la presencia de fimbrias utilizadas para la adherencia epitelial (Nataro y Kaper, 1998).

Existe una variedad de mecanismos por los cuales *E. coli* puede causar diarrea: i) la producción de enterotoxinas (EPEC y EAEC), ii) la invasión (EIEC) y iii) la adherencia íntima (EPEC y EHEC) (Figura 1). A continuación se hablará de las características principales en la infección de cada una de estas cepas.

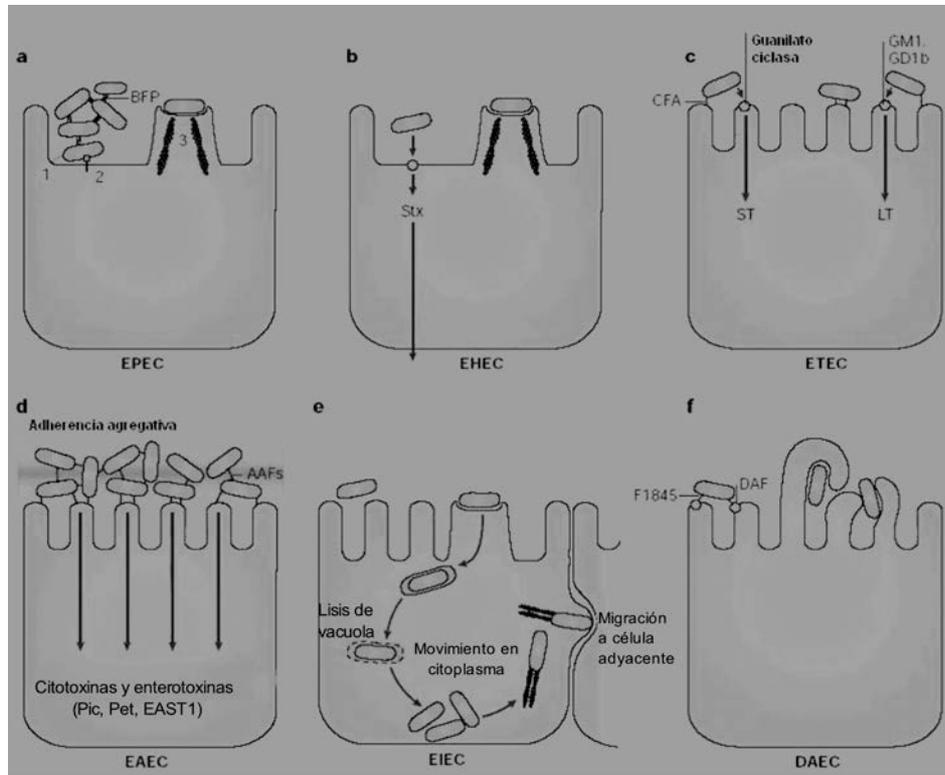


Figura 1. Representación de los mecanismos de patógenesis de las diferentes *E. coli* diarreagénicas. a) *E. coli* enteropatógena (EPEC), 1. Adherencia localizada (BFP: bundle forming pilus), 2. Translocación de proteínas por el SST3, 3. Formación de pedestal; b) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Stx: toxina Shiga); c) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (ST: enterotoxina termoestable, LT: enterotoxina termolábil, CFA: antígeno factor de colonización, GM1 y GD1b: gangliósidos de superficie); d) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (AAF: fimbria de adherencia agregativa, Pic: proteína involucrada en colonización intestinal, Pet: enterotoxina codificada en plásmido, EAST1: ST1 de *E. coli* enteroagregativa); e) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y f) *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (F1845: adhesina fimbrial, DAF: factor de aceleración de descomposición) (Modificada de Kaper *et al.*, 2004).

EPEC. Esta cepa de *E. coli* se relaciona con diarrea en niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo. La bacteria se adhiere inicialmente a la célula del hospedero por medio de la fimbria BFP (bundle forming pilus). La infección está caracterizada por una lesión histopatológica denominada A/E (adherence and effacement), la cual se caracteriza por la eliminación de las microvellosidades del epitelio intestinal y la adherencia íntima de la bacteria al enterocito. Como consecuencia, se efectúan cambios en el citoesqueleto de la célula hospedera por debajo del sitio de unión de la bacteria y se forma una estructura rica en actina denominada pedestal. Este fenotipo se describirá con detalle más adelante (Figura 1a) (Nataro y Kaper, 1998).

EHEC. Produce colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico debido a la producción de las toxinas Stx y hemolisina. Tiene su reservorio en el tracto intestinal del ganado y otros animales y su transmisión se da a través de una amplia variedad de alimentos siendo la carne el vehículo más común de infección, produciendo la llamada “enfermedad de la hamburguesa”. Debido a que es necesaria una muy pequeña dosis infecciosa se dan altas tasas de infección y contagio persona-persona. Al igual que EPEC, EHEC induce la formación de la lesión A/E (Figura 1b) (Nataro y Kaper, 1998).

ETEC. Esta cepa se relaciona principalmente con dos síndromes clínicos: diarrea en niños pequeños de países en vías de desarrollo y con la llamada “diarrea del viajero” en adultos de países desarrollados. La enfermedad es abrupta y tiene un periodo de incubación corto. La infección se caracteriza por diarrea acuosa, fiebre y vómito. ETEC coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado y provoca diarrea a través de la acción de las enterotoxinas LT y ST (Figura 1c) (Nataro y Kaper, 1998).

EAEC. Esta cepa provoca diarrea persistente en niños. Las bacterias están cubiertas por estructuras fimbriales delgadas y adhesivas que les permiten agregarse en cúmulos. Se ha identificado que algunos de sus factores de virulencia son las fimbrias de AAF, las proteasas denominadas Pic y Pet, así como EAST1, que es una proteína similar a la ST de ETEC y que contribuye a la diarrea acuosa (Figura 1d) (Kaper *et al.*, 2004; Puente y Finlay, 2001; Nataro y Kaper, 1998).

EIEC. Esta cepa exhibe características idénticas a las encontradas en *Shigella spp.* Ambos organismos invaden el epitelio del colon, fenotipo mediado por un plásmido y un locus cromosómico, y ambos elaboran una o más enterotoxinas secretoras que pueden tener papeles importantes en el desarrollo de la enfermedad. Estas bacterias penetran a la célula epitelial, lisan la vacuola endocítica, se multiplican dentro de la célula hospedera y son capaces de moverse dentro de la célula eucarionte por medio de la nucleación de los filamentos de actina. Además, son capaces de moverse lateralmente a través del epitelio, diseminándose de una célula a otra. La infección por EIEC produce diarrea acuosa, que puede ser confundida con la producida por ETEC (Figura 1e) (Nataro y Kaper, 1998).

DAEC. Está implicada en casos de diarrea acuosa en niños de entre 1 y 5 años; sin embargo poco se sabe del mecanismo de patogénesis de esta cepa. Se ha descrito una fimbria que media el fenotipo DA (diffusely adherent). Esta bacteria desencadena la activación de diferentes cascadas de transducción de señales en los enterocitos del intestino

delgado, conduciendo al desarrollo de proyecciones celulares (Kaper *et al.*, 2004), que embeben a la bacteria, la cubren, pero no la introducen a la célula por completo. Todavía se desconoce el papel de este fenotipo en la patogénesis (Figura 1f) (Nataro y Kaper, 1998).

1.2 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y la lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E).

EPEC fue la primera cepa implicada como la causa de brotes de diarrea infantil en las décadas de los 40 y 50 (Garmendia *et al.*, 2005; Chen y Frankel, 2004). En países en desarrollo, EPEC es responsable del 30 al 40% de los episodios de diarrea y se estima que ocasiona varios cientos de miles de muertes al año (Chen y Frankel, 2004; Goosney *et al.*, 2000). El cuadro clínico de EPEC está caracterizado por diarrea crónica y acuosa que es acompañada por fiebre y vómito. Al igual que la mayoría de los patógenos causantes de diarrea, su transmisión es vía fecal-oral (Goosney *et al.*, 2000).

Se ha propuesto un modelo que describe la formación de la lesión A/E en tres fases: 1. Adherencia localizada, 2. Transducción, reacomodo y eliminación y 3. Adherencia íntima.

1. La adherencia localizada es la primera etapa de formación de la lesión A/E y está caracterizada por la interacción no íntima de EPEC con la célula del hospedero, para lo cual se requiere de la participación de varias adhesinas: la fimbria BFP, el filamento EspA, asociado con el sistema de secreción tipo 3 (SST3) y el flagelo (Giron *et al.*, 2002). En esta etapa se da la formación de densas colonias, que es inducido por la fimbria BFP, que tiende a agregarse en forma de cordones y participa tanto en la adherencia bacteria-bacteria, como en la adherencia inicial con la célula hospedera. Dicha fimbria es codificada por el plásmido EAF (EPEC adherent factor), que tiene un grupo de 13 genes necesarios para su expresión y ensamblaje. Muchos de estos genes codifican para proteínas similares a las requeridas para la biogénesis de la fimbria en otros patógenos Gram negativos como *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*, pero algunas de ellas no tienen homólogos obvios (Figura 2) (Nataro y Kaper, 1998; Wales *et al.*, 2005). El filamento EspA asociado a la secreción de efectores de virulencia en EPEC, que se describirá más adelante, interactúa con las células del hospedero durante las etapas tempranas de formación de la lesión A/E y se ha propuesto que puede funcionar como adhesina (Figura 2) (Cleary *et al.*, 2004). A su vez, se ha propuesto que el flagelo puede actuar como una estructura adhesiva y que está directamente relacionado con la adherencia inicial (Girón *et al.*, 2002).

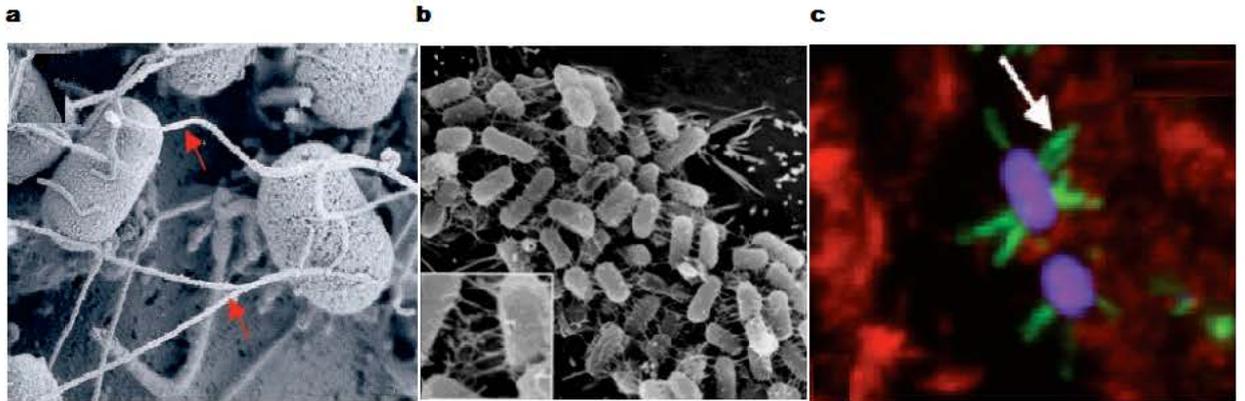


Figura 2. a) Fotografía de microscopía electrónica de barrido que muestra células HeLa infectadas por EPEC en donde se observan filamentos flagelares largos y ondulados que rodean a las células bacterianas (flechas rojas) y los filamentos cortos que sobresalen de la superficie de la bacteria representan los filamentos EspA (Tomada de Girón *et al.*, 2002); b) En células Caco-2, se muestran las microcolonias formadas por el pilus BFP (Tomada de Wales, 2005); c) Imagen de microscopio confocal en donde se muestra una mutante *bfp* unida a células Caco-2 mediante filamentos EspA teñidos con verde Alexa488. La flecha señala los filamentos EspA (Tomada de Cleary *et al.*, 2004).

2. En la segunda etapa de la formación de la lesión A/E se lleva a cabo la transducción de señales, el reacomodo del citoesqueleto y la eliminación de microvellosidades de la superficie epitelial (Nataro y Kaper, 1998). El sistema de secreción tipo III (SST3) está presente en bacterias Gram negativas y es utilizado para la exportación de proteínas a través de las membranas lipídicas, pasando directamente al citosol de la célula eucarionte. Este sistema es utilizado por una gran variedad de patógenos de plantas y animales, así como en algunas bacterias endosimbiontes (Mota *et al.*, 2005). Como resultado de la adherencia de EPEC al enterocito, el SST3 transloca su propio receptor, denominado Tir, y a un número aún indeterminado de proteínas efectoras. Dichos efectores inducen una serie de rutas de transducción de señales que provocan alteraciones en el citoesqueleto de la célula eucarionte, lo que resulta en la despolimerización de actina y la pérdida de las microvellosidades del epitelio intestinal (Clarke *et al.*, 2003) (Figura 3).

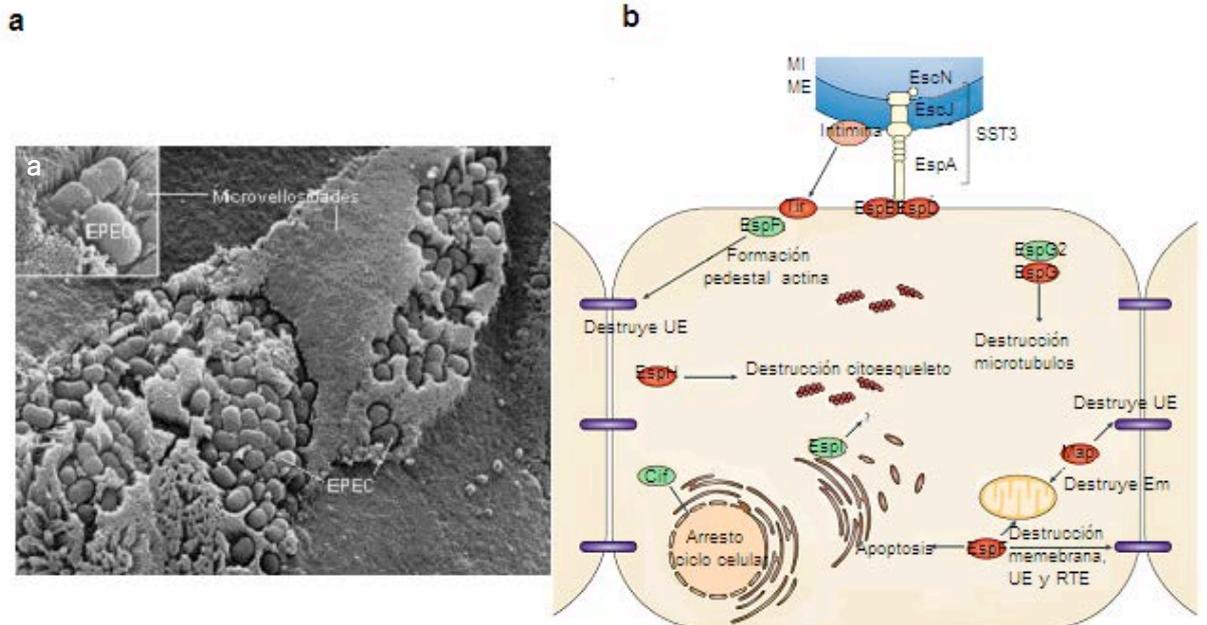


Figura 3. Formación de la lesión A/E. a) Fotografía de microscopía electrónica de barrido mostrando mucosa duodenal infectada por EPEC. Se puede apreciar la eliminación de las microvellosidades intestinales, (Tomada de Shaw, 2005); b) Se observa en el esquema como EPEC una vez que se ha unido a la célula hospedera secreta múltiples proteínas efectoras, las que interfieren con las funciones celulares y contribuyen a la patología de la bacteria *in vivo*. UE Uniones estrechas, Em Potencial de membrana de la mitocondria y RTE Resistencia transepitelial eléctrica (Modificado de Hayward *et al.*, 2006).

3. La tercera etapa es la adherencia íntima. EPEC se adhiere de forma íntima a las células epiteliales gracias a la unión de una adhesina de membrana externa llamada intimina con el receptor Tir (Figura 4). Tir es codificado por la bacteria y translocado al enterocito vía el SST3. Dentro de la célula hospedera Tir es fosforilado por las cinasas del hospedero Fyn y Abl en los residuos de tirosina 454 y 474, se inserta en la membrana plasmática y recluta a la molécula adaptadora eucarionte Nck, la que a su vez recluta a la proteína N-WASP (Wiskott-Aldrich sndrome protein) y al complejo Arp2/3 (Actin related protein 2/3); lo que promueve la polimerización de actina y otras proteínas del citoesqueleto como la α actinina, talina y vinculina, formándose el pedestal. En la membrana plasmática, Tir se dimeriza y presenta dos dominios transmembranales, una región extracelular que contiene el sitio de unión a intimina y el amino y carboxilo terminales que están involucrados en la cascada de señalización en la célula eucarionte (Figura 4) (Goosney *et al.*, 2000). Las proteínas efectoras interrumpen las funciones celulares, lo que lleva a la pérdida de la integridad de las uniones estrechas así como de la función mitocondrial por lo que se pierden electrolitos y la célula muere (Clarke *et al.*, 2003).

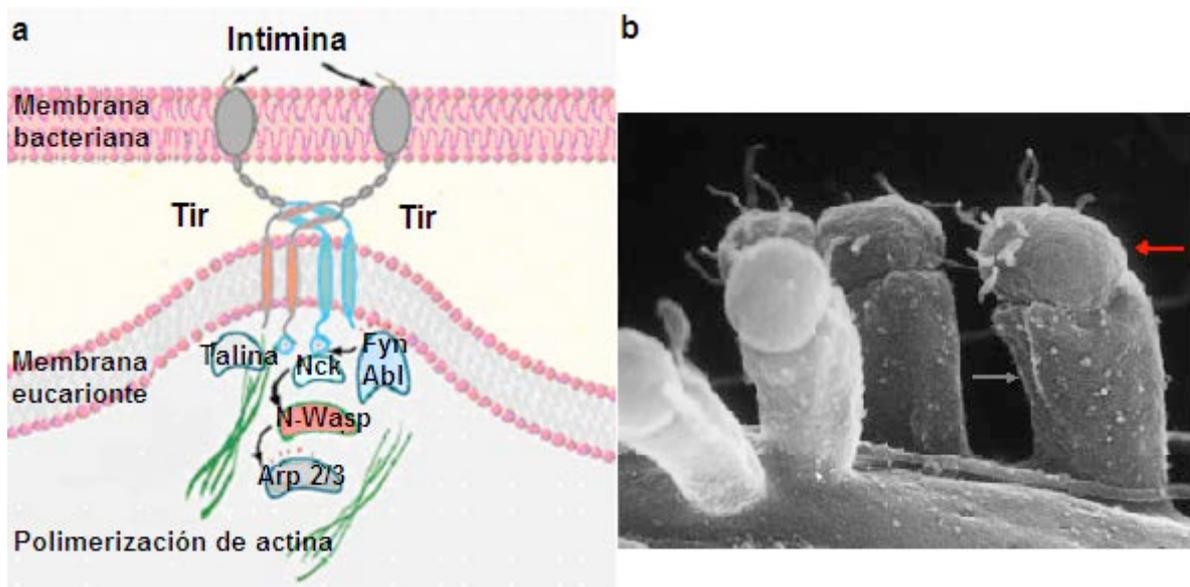


Figura 4. Adherencia íntima. a) Interacción Tir/intimina y formación del pedestal. EPEC inyecta al citosol de su célula blanco la proteína Tir, la cual se integra a la membrana plasmática, se dimeriza y funciona como receptor para la adhesina intimina. La interacción Tir/intimina promueve la fosforilación de Tir por Fyn y Abl, lo que induce el reclutamiento de la proteína Nck, la cual a su vez recluta a N-WASP y al complejo Arp2/3, lo que lleva a la formación de estructuras conocidas como pedestales debajo del sitio de adhesión bacteriana. Se reclutan en el pedestal proteínas de unión a la actina como la talina, que estabilizan la estructura (Modificada de Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006); b) Lesión A/E en células HEL infectadas por EPEC. Se muestra la unión íntima de la bacteria (flecha roja) con la membrana del enterocito y la formación de pedestales (flecha gris) (Tomada de Knutton *et al.*, 1998).

El marco genómico relacionado con virulencia en *E. coli*, está complementado con plásmidos e islas de patogenicidad, que a menudo se relacionan con un aumento en la virulencia al dotarlas de un mayor nivel de adaptación (Garmendia *et al.*, 2005; Nataro y Kaper, 1998).

Los genes de virulencia de EPEC y EHEC están organizados en bloques a que se les llama islas de patogenicidad. Dichas islas también han sido descritas en cepas uropatógenas y cepas de *E. coli* causantes de enfermedades sistémicas, y pueden representar una forma común en la que los genomas de las cepas patógenas y no patógenas de *E. coli* divergieron genéticamente (Nataro y Kaper, 1998). En EPEC todos los genes que se requieren para la formación de la lesión A/E están agrupados en una isla de patogenicidad de 35.6 Kpb localizada en el cromosoma, denominada LEE (locus de esfacelamiento enterocítico) (Figura 5) (Garmendia *et al.*, 2005). Esta región de DNA se caracteriza por tener un bajo contenido de G+C (38% en comparación con 51% del cromosoma), lo que sugiere que se adquirió mediante transferencia genética horizontal (Puente y Finlay, 2001).

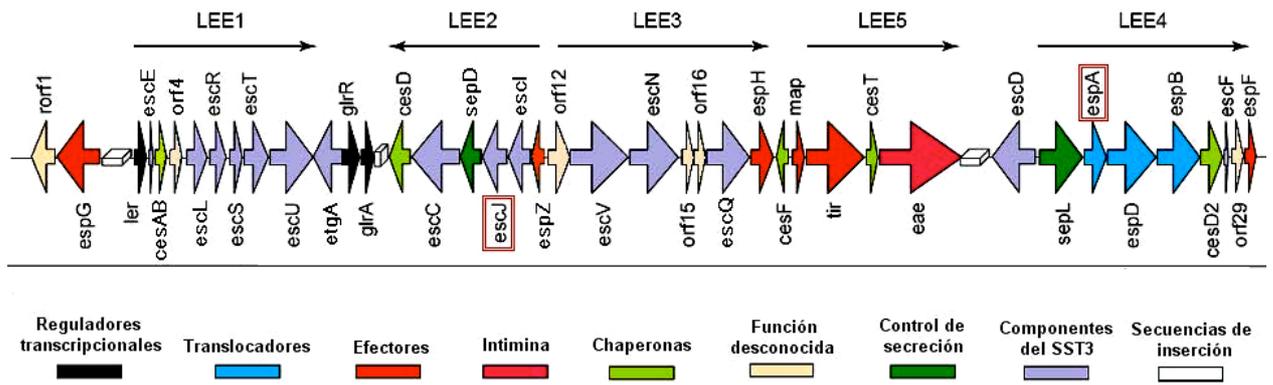


Figura 5. Isla de patogenicidad LEE de EPEC. Con cuadros rojos se señalan los genes *espA* y *escJ*, con los cuales se trabajó en esta tesis (Modificada de Dean *et al.*, 2005).

LEE contiene 41 marcos de lectura abiertos, la mayoría de los cuales se organizan en cinco operones policistrónicos: LEE 1, LEE 2, LEE 3, *tir* (LEE5) y LEE4. Los operones LEE 1, LEE 2, y LEE 3 contienen los genes *sep* (*secretion of E. coli proteins*) y *esc* (*E. coli secretion*) que codifican a los componentes estructurales del SST3, así como al regulador transcripcional *Ler* (*LEE-encoded regulator*). El operón *tir* contiene el gen que codifica a la adhesina de la membrana externa o intimina (gen *eae*), para el receptor translocado de la intimina (*tir*) y a la chaperona de Tir (*cesT*); el operón LEE4 contiene los genes *esp* (*E. coli secreted proteins*) que codifican a las proteínas efectoras que se secretan y los genes *ces* (*chaperone for E. coli secretion*) que codifican a las chaperonas de estos efectores (Dean *et al.*, 2005; Elliot *et al.*, 1998; McDaniel *et al.*, 1995).

1.3 Secreción de proteínas.

Las bacterias secretan una amplia variedad de proteínas que cumplen diversas funciones como la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la virulencia entre otras (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

Las proteínas que serán secretadas tienen que atravesar una o más membranas. En el caso de las bacterias Gram negativas, las proteínas tienen que atravesar la membrana interna y la membrana externa, separadas por el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano (Kostakioti *et al.*, 2005).

A pesar de la diversidad de funciones que desempeñan las proteínas secretadas, sólo existe un número limitado de rutas de translocación, llamadas vías de secreción. En las bacterias Gram negativas, se pueden clasificar en dos grupos tomando en cuenta el mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana interna: Sec

dependientes y Sec independientes (Kostakioti *et al.*, 2005; González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

1.3.1 Sistemas de secreción Sec dependientes.

Las proteínas que son secretadas utilizando una ruta Sec dependiente utilizan una maquinaria en común para atravesar la membrana interna: la translocasa Sec (Figura 6) (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

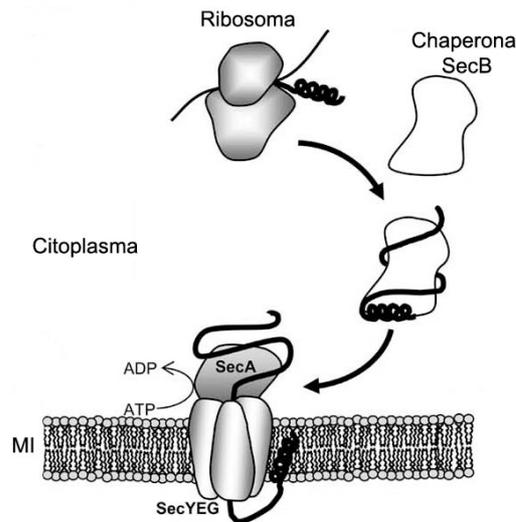


Figura 6. Esquema de la vía Sec en *Escherichia coli*. La chaperona SecB se une al precursor parcialmente plegado, el reconocimiento puede ser cuando la cadena naciente está todavía unida al ribosoma o bien cuando se encuentra libre en el citoplasma. El complejo SecB-proteína precursora se dirige a la membrana interna en donde la proteína se transfiere a la ATPasa SecA unida a la translocasa SecYEG. MI membrana interna (Modificado de Stephenson, 2005).

En *E. coli*, la ruta Sec comprende las proteínas de membrana interna SecG, SecE y SecY que forman un canal heterotrimérico por el cual se transportan las proteínas; la ATPasa SecA que provee la energía para la exportación de proteínas; la chaperona SecB que se une a las proteínas a secretar parcialmente plegadas en el citosol o antes de ser liberadas por el ribosoma. Las proteínas que utilizan este sistema tienen una secuencia señal de aproximadamente 30 aminoácidos en el extremo amino terminal. El complejo SecB-proteína, es dirigido hacia SecA que se asocia con la secuencia señal de la proteína a transportar, promoviendo la liberación de SecB y el transporte de la proteína a través del canal SecYEG. Posteriormente, una peptidasa periplásmica (SPase) va a cortar la secuencia señal tras la exportación a través de la membrana interna. La proteína en el periplasma adquiere su conformación nativa para ser secretada por otro sistema a través de la membrana externa (Hueck, 1998; Kostakioti *et al.*, 2005; Remaut y Waksman, 2004).

Las proteínas que atraviesan la membrana interna vía Sec dependiente una vez en el periplasma pueden atravesar la membrana externa utilizando el SST2 (sistema de secreción tipo 2), o el SST5 (sistema de secreción tipo 5) (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

1.3.2 Sistemas de secreción Sec independientes.

En las rutas Sec independientes las proteínas no utilizan la translocasa Sec para atravesar la membrana interna; permiten el transporte directo del citoplasma al espacio extracelular en un solo paso sin intermediarios periplásmicos. Estas rutas incluyen el SST1 (sistema de secreción tipo 1), el SST3 y el SST4 (sistema de secreción tipo 4) (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003; Kostakioti *et al.*, 2005).

1.4 Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3).

El SST3 es un mecanismo utilizado por especies de bacterias Gram negativas que interactúan con otros organismos, como patógenos o simbioses (Mota *et al.*, 2005). Estas interacciones dependen de la secreción de proteínas y la energía necesaria para el transporte de éstas es aportada por una ATPasa que se localiza en la base del complejo secretor, que se describirá más adelante.

El SST3 es una ruta de exportación empleada por dos “nanomáquinas” distintas: el aparato de exportación flagelar y el sistema de secreción de efectores de virulencia o inyectisoma (Cornelis, 2006). En esta tesis sólo se discutirá este último.

1.4.1 Sistema de secreción tipo 3 asociado a virulencia o inyectisoma.

Se ha identificado el SST3 de efectores de virulencia en una gran variedad de patógenos de humanos, animales y de plantas. Este sistema permite que las bacterias unidas a la célula hospedera puedan translocar proteínas efectoras, lo cual involucra atravesar la envoltura celular bacteriana y además la membrana plasmática eucarionte (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003). Lo anterior hace que el inyectisoma tenga una importancia central para la patogénesis de muchas bacterias Gram negativas (Kostakioti *et al.*, 2005).

Como se muestra en la figura 7, el inyectisoma está compuesto de dos partes distintas: una proyección que se extiende por varios nanómetros desde la superficie bacteriana y una base cilíndrica similar al cuerpo basal flagelar que presenta estructuras anulares en las dos membranas bacterianas y un eje central que las conecta. Asociada periféricamente con la porción citoplásmica de la membrana interna, se encuentra la ATPasa, la cual es una

proteína altamente conservada entre los diferentes SST3. La función principal de la ATPasa es proporcionar la energía necesaria para el proceso de exportación (Akeda y Galan, 2005).

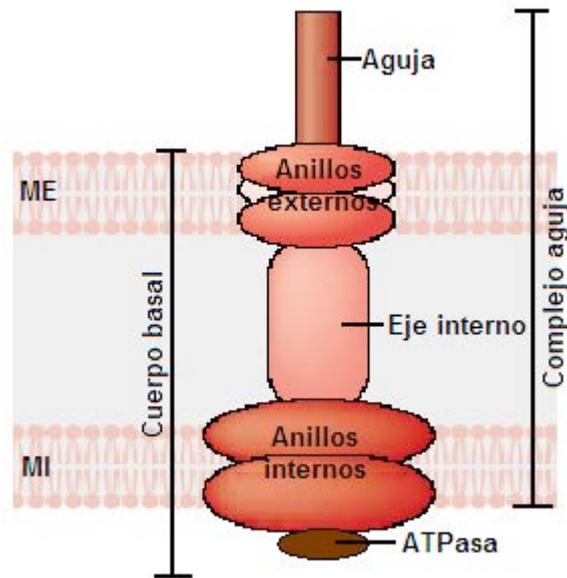


Figura 7. Esquema de la estructura general del inyectisoma. Se muestran las estructuras que conforman a este complejo macromolecular y los componentes que forman el complejo aguja y el cuerpo basal. ME, Membrana externa, MI Membrana interna. (Modificada de Remaut y Waksman, 2004)

Por medio del uso de microscopía electrónica, se ha demostrado que la morfología de los inyectisomas de diferentes patógenos tiene una estructura común, la cual es además asombrosamente similar a la del flagelo. En la figura 8 podemos observar la estructura del inyectisoma de diferentes patógenos entre los que destaca el de *Yersinia spp.* por ser el sistema prototipo, ya que ha sido el más estudiado. Esta bacteria utiliza el SST3 para resistir la captura por las células fagocíticas en las fases tardías de la patogénesis (He *et al.*, 2004). Por su parte, EPEC es un patógeno extracelular cuyo SST3 está dotado de una extensión filamentosa asociada a la aguja llamada filamento EspA. Dicho filamento es indispensable para la formación de la lesión A/E y la translocación de efectores a la célula eucarionte (Garmendia *et al.*, 2005). Por su parte, los patógenos de plantas infectan células con pared celular, por lo que para atravesar esta gruesa capa cuentan con un filamento similar al pili bacteriano, pero mucho más largo y con el mismo diámetro que el filamento EspA (He *et al.*, 2004). Todos estos sistemas están compuestos por alrededor de 25 proteínas diferentes (Tampakaki *et al.*, 2004).

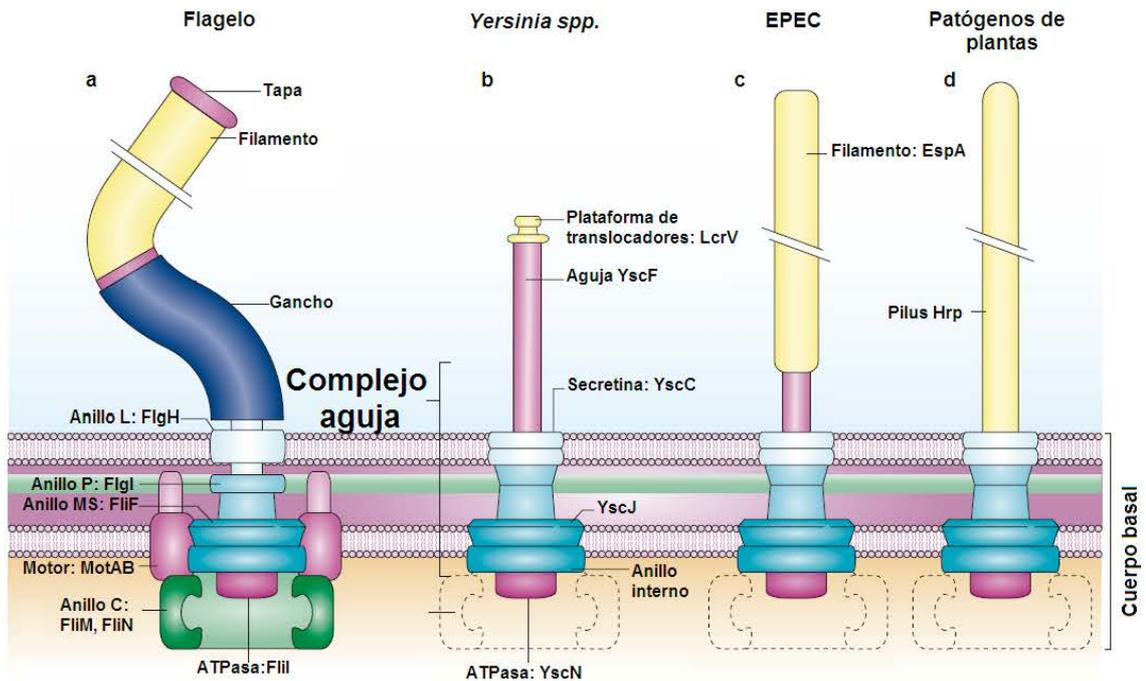


Figura 8. Estructura del flagelo y los inyectisomas. a) Flagelo; b) Inyectisoma de *Yersinia spp.*; c) Inyectisoma de EPEC; d) Inyectisoma de patógenos de plantas. El anillo C de los inyectisomas se muestra con líneas punteadas por la poca información disponible. ME, Membrana Externa, MI, Membrana Interna. (Modificada de Cornelis, 2006.)

Estudios filogenéticos recientes indican que el inyectisoma y el flagelo son dos grupos hermanos, los cuales divergieron a partir de un sistema de secreción ancestral. Al comparar los árboles evolutivos de las bacterias con el de los inyectisomas, se ha propuesto que éstos son completamente diferentes, lo que indicaría que los genes que codifican a los inyectisomas han sido distribuidos de forma horizontal y recientemente en la evolución bacteriana (Pallen y Matzke, 2006; Cornelis, 2006).

Existe un grupo de 9 proteínas altamente conservadas dentro de las familias de inyectisomas, éste incluye 8 homólogos con proteínas flagelares y una proteína de la familia de las secretinas (Tabla 1) (Cornelis, 2006). Dentro de este grupo destaca la lipoproteína EscJ por ser una de las proteínas que se purificaron en este trabajo.

Tabla 1. Proteínas de la estructura basal del inyectisoma que comparten similitud de secuencia.

Flagelo (<i>Salmonella typhimurium</i>)	Inyectisomas			Estructura/ Función
	Yersinia spp	EPEC	Patógenos de plantas	
FliF	YscJ	EscJ	HrcJ	Anillo de MI. Lipoproteína
FliH	YscN	EscN	HrcN	ATPasa
FliN/M	YscQ	EscQ	HrcQ(HrcQ _A /HrcQ _B)	Probable Anillo C o citoplásmico
FliP	YscR	EscR	HrcR	Proteína integral de membrana interna.
FliR	YscT	EscT	HrcT	Proteína integral de membrana interna
FliB	YscU	EscU	HrcU	Proteína integral de membrana interna que participa en el cambio de la especificidad de sustrato
FliA	YscV	EscV	HrcV	Proteína integral de membrana interna
FliQ	YscS	EscS	HrcS	Proteína integral de membrana interna
Sin secretina	YscC	EscC	HrcC	Secretina. Proteína de membrana externa

Muchas de las proteínas necesarias para el ensamblaje del SST3 son componentes estructurales, pero también existen componentes auxiliares que participan durante el proceso de ensamblaje, entre los que destacan las chaperonas del SST3, que asisten a las proteínas efectoras y a las proteínas translocadoras que forman el poro de secreción en la membrana eucarionte (Garmendia *et al.*, 2005).

Mientras que la maquinaria de translocación está conservada entre los diferentes patógenos, las proteínas secretadas, llamadas efectoras, difieren completamente, por lo que un mismo mecanismo de transporte puede generar una amplia gama de enfermedades (González Pedrajo y Dreyfus, 2003). Entre los efectores utilizados por las bacterias para la adhesión a las células y su invasión, se incluyen desde proteínas monoméricas, hasta macromoléculas encargadas de modificar la respuesta de algunas moléculas reguladoras del hospedero (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006).

1.4.2 El complejo aguja

El complejo aguja fue purificado por primera vez en *Salmonella typhimurium* y subsecuentemente en muchas otras bacterias (Galan y Wolf-Watz, 2006). Con el uso de criomicroscopía electrónica se determinó la estructura del complejo aguja de *S. flexneri* (Figura 9a). El canal central de 2-3 nm se extiende desde la parte baja de los anillos hasta la

punta de la aguja extracelular. Este canal sirve para el transporte de las proteínas secretadas por el SST3; sin embargo, el diámetro de dicho conducto indica que las proteínas deben de estar parcialmente desplegadas durante su paso. En la figura 9b se muestra la estructura tridimensional del complejo aguja promedio codificado por *Salmonella*.

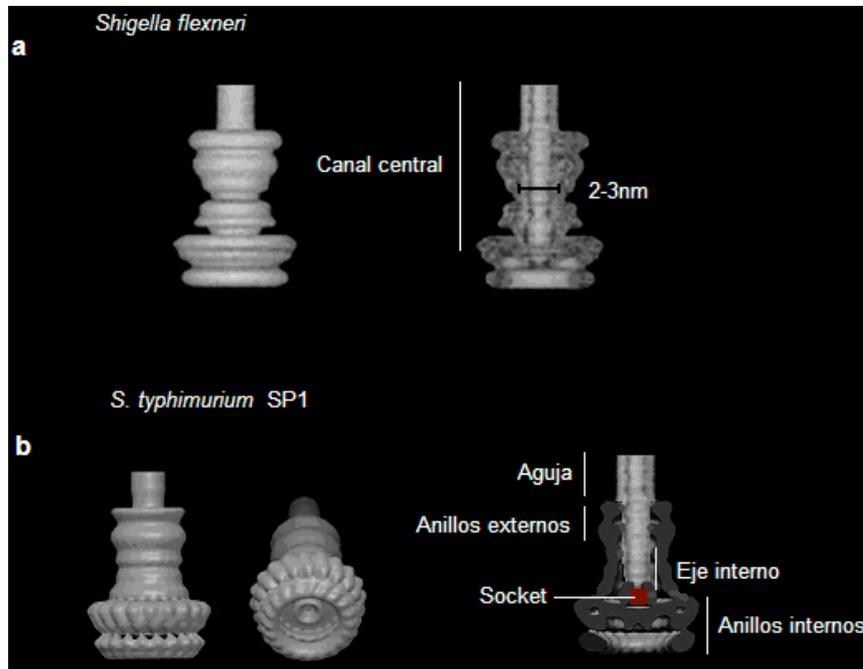


Figura 10. Estructura tridimensional del complejo aguja de *Shigella flexneri* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (isla de patogenicidad SPI-1). a) La estructura mostrada del inyectisoma de *S. flexneri* muestra el canal central, por el que las proteínas pasan parcialmente desplegadas; b) Se presentan diferentes vistas que dejan ver como el anillo se forma en promedio por 20 subunidades. Se muestra un corte del inyectisoma de *S. typhimurium* indicando la localización de cada una de sus estructuras. En rojo se señala la estructura de “socket”, la cual sirve como punto de anclaje para el eje interno (Modificada de Blocker *et al.*, 2001).

La aguja es una estructura hueca de aproximadamente 80nm de longitud y 8nm de ancho. En *Salmonella* esta estructura está formada por la proteína PrgI (Kubori *et al.*, 2000)

Los anillos asociados con la membrana externa de lipopolisacáridos están compuestos por una proteína perteneciente a la familia de las secretinas, la cual se caracteriza por la formación de poros en la membrana externa. Su correcta inserción requiere de la asistencia de una lipoproteína que se encuentra unida a la membrana externa. Esta proteína presumiblemente actúa como una chaperona que facilita el plegamiento correcto y el arreglo multimérico de la subunidad del anillo externo (Galan y Wolf-Watz, 2006; Cornelis, 2006). En *Salmonella* la proteína que forma los anillos externos es InvG.

A pesar de que el papel de la proteína PrgJ de *Salmonella* en la formación del complejo aguja aún no es claro, numerosos estudios estructurales, bioquímicos y bioinformáticos

apuntan a que compone el eje interno que une al anillo externo InvG con el anillo interno PrgH-PrgK (Ogino *et al.*, 2006).

1.4.3 El anillo interno del complejo aguja está formado por un anillo de lipoproteína

El anillo interno en *Salmonella* está formado por las proteínas PrgH y PrgK, que se asocian para formar el anillo que servirá como base del complejo aguja. La familia de lipoproteínas PrgK/YscJ tiene dos dominios: 1. Un péptido señal de lipoproteína en el extremo amino terminal y 2. Un segmento de 20-30 aminoácidos hidrofóbicos en el carboxilo terminal (b. Yip *et al.*, 2005).

La secuencia señal de lipoproteína se caracteriza por estar seguida de un residuo de cisteína y por ser cortada por la peptidasa de señal II (SPase II), también llamada peptidasa de señal de lipoproteína (Lsp). Las SPases son proteínas de membrana interna que tienen un dominio catalítico en el lado periplásmico en donde se realiza el corte del péptido señal (Stephenson, 2005).

Como se observa en la figura 10 la biosíntesis de las lipoproteínas se da en tres pasos: 1. Transferencia de un grupo diacilglicérido al grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína de la prolipoproteína; 2. Corte de la secuencia señal por la SPase II con lo que se forma una apolipoproteína y 3. Acilación del grupo α -amino del extremo amino de la cisteína de la apolipoproteína (Juncker *et al.*, 2003).

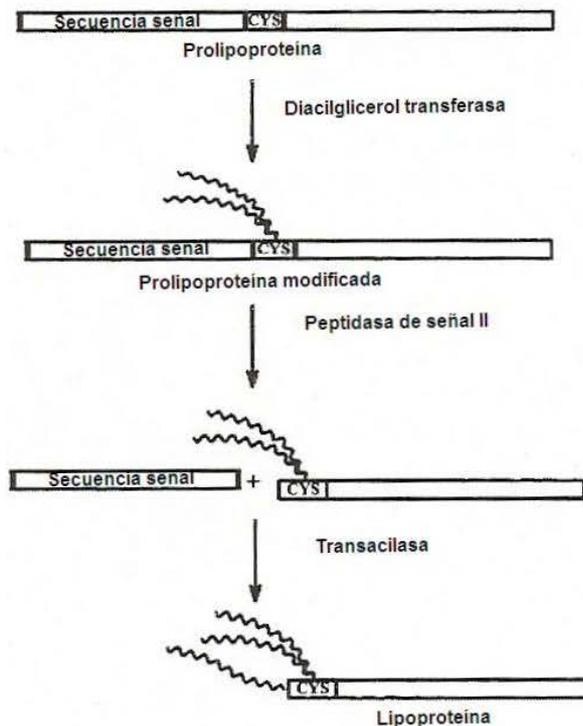


Figura 10. Biosíntesis de una lipoproteína. Los lípidos se unen a la cisteína. Los péptidos se muestran a la izquierda y a la derecha del residuo de cisteína. Las enzimas catalíticas que actúan en cada paso están escritas a un lado de cada flecha (Modificada de Juncker *et al.*, 2003).

Antes de que se procese la prolipoproteína, lo cual ocurre en el lado periplásmico de la membrana interna, ésta se exporta a través de la membrana interna utilizando la ruta general de secreción Sec. En bacterias Gram-negativas, las lipoproteínas se anclan por medio de su lípido en el extremo amino terminal, ya sea a la membrana interna o a la externa. Yamaguchi y colaboradores (1998) propusieron que el aminoácido situado inmediatamente después del residuo de cisteína acilado, también referido como aminoácido en posición 2+, determina su destino final (Juncker *et al.*, 2003). Se ha propuesto que un residuo de aspartato en ésta posición provoca la retención de la lipoproteína en la membrana interna, mientras que aquellas que tengan un residuo de lisina o ácido glutámico en posición 2+ es más probable que se encuentren insertas en la membrana externa (Crepin *et al.*, 2005). Las secuencias señal de lipoproteínas tienen tres regiones: N, H y C. La región N es polar y contiene al menos un residuo de lisina o arginina; estos residuos se piensa que promueven interacciones con los fosfolípidos y el aparato de translocación. El dominio H se compone de aminoácidos hidrofóbicos, es el más característico y es crucial para el transporte e inserción en la membrana. La región C, también llamada lipocaja (lipobox), es polar y contiene cuatro aminoácidos característicos a un lado del sitio de corte de la SPase II con una secuencia consenso (Leu-(Ala/Ser)-(Gly/Ala)-Cys) (Stephenson, 2005). Esta secuencia señal se ha comparado con la reconocida por la peptidasa de señal I.

Ambas tienen una región N similar, pero la región H de la secuencia señal de lipoproteínas es más corta que la encontrada en las secuencias señal reconocidas por la SPase I, además de que estas últimas tienen una región C polar antes del sitio de corte (Juncker *et al.*, 2003).

El dominio hidrofóbico en el extremo carboxilo terminal de la lipoproteína se predice que está inserto en la membrana interna bacteriana

En *Salmonella* se propone que la proteína PrgK, una de las proteínas que forma el anillo interno, está unida a la membrana interna a través de un lípido en el extremo amino y posiblemente también con un segmento transmembranal que posee en el extremo carboxilo terminal. Los miembros de esta familia comparten similitud de secuencia con el dominio central de la proteína flagelar FliF, la cual forma el anillo MS en la membrana interna, lo que inicia el ensamblaje del flagelo (b. Yip *et al.*, 2005).

Por el momento no se conoce la ubicación y función exacta de varios de los componentes integrales de la membrana interna del cuerpo basal del inyector (Cornelis, 2006).

1.4.3 El ensamblaje del complejo aguja

El ensamblaje del complejo aguja se da por pasos. La formación de la base (anillo interno) precede a la formación del eje y éste precede a su vez la polimerización de la aguja. Las proteínas membranales poseen una secuencia señal en el amino terminal, por lo que son transportadas a la membrana bacteriana por la translocasa Sec (Crepin *et al.*, 2005).

Una vez que la base del inyector se encuentra ensamblada se da el reclutamiento de un conjunto de proteínas altamente conservadas, las cuales se cree forman parte del aparato secretor que reconoce a las proteínas a secretarse a través del complejo aguja. Posteriormente comienza la secreción de los componentes del eje interno y la aguja vía SST3 (Galan y Wolf-Watz, 2006).

Ya que la aguja es ensamblada, se cambia la especificidad de la maquinaria de secreción y se vuelve competente para la secreción de proteínas efectoras. Este fenómeno también se observa en el flagelo (Cornelis, 2006).

1.5 El inyectisoma de EPEC.

Al igual que otros inyectisomas, el de EPEC posee un complejo aguja (Figura 11). Este complejo está formado por un cuerpo basal compuesto por: un doble anillo de membrana externa formado por la secretina EscC y dos anillos de membrana interna, uno periplásmico formado por la proteína EscJ, de la cual se hablará más adelante y otro inserto en la membrana interna cuya composición exacta se desconoce. Estos anillos se ha especulado que están unidos por un eje. Este eje aún no se ha descrito, sin embargo por estudios bioinformáticos se piensa que está formado por la proteína EscI. La aguja del sistema está constituida por la proteína EscF. A diferencia del complejo aguja descrito anteriormente, el inyectisoma de EPEC se caracteriza por la presencia de una estructura filamentosa llamada filamento EspA, la cual se describirá a continuación. La proteína EspA es el otro componente que se purificó en este trabajo.



Figura 11. Inyectisoma de EPEC. En este esquema se muestran las estructuras que forman este aparato. Se señala el filamento EspA y el anillo EscJ por ser las estructuras formadas por las proteínas de interés para esta tesis. ME, Membrana Externa, MI, Membrana Interna. (Modificada de Tampakaki *et. al.*, 2004).

1.5.1. El filamento EspA.

Como ya se había mencionado, el inyectisoma de EPEC posee una estructura larga y flexible denominada filamento EspA que es una extensión de la aguja (Figura 12) (Garmendia *et al.*, 2005). El filamento EspA es un homopolímero formado por la proteína

translocadora EspA, cuya polimerización está mediada por interacciones tipo *coiled-coil* entre subunidades.

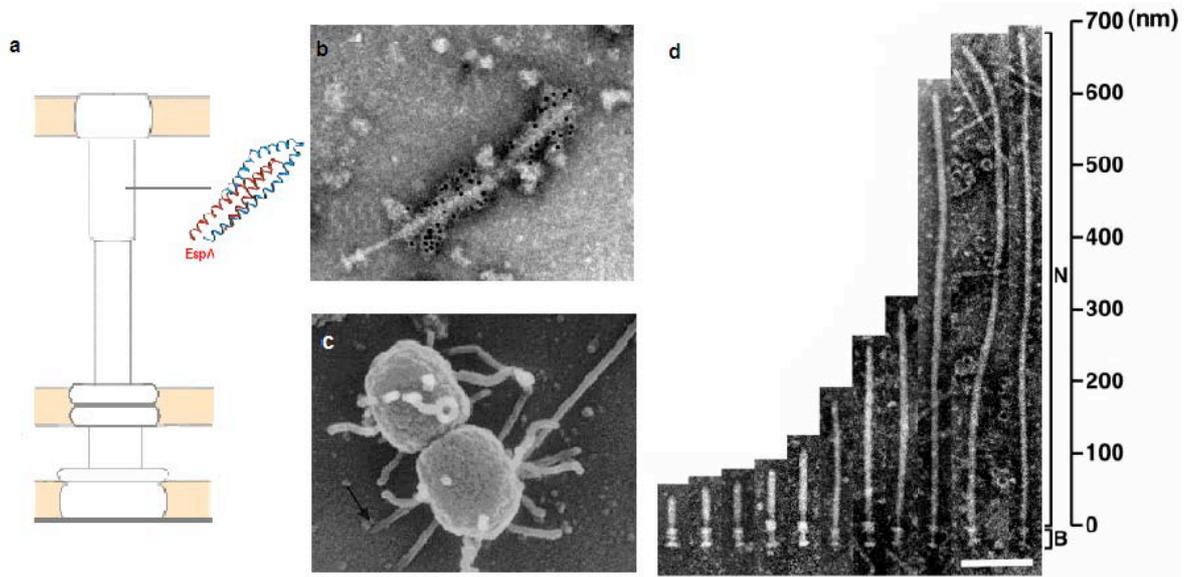


Figura 12. El filamento EspA. a) Esquema del injectisoma de EPEC en el que se señala la localización de la proteína EspA. Se muestra una representación de la estructura de la proteína EspA (rojo) en conjunto con su chaperona Cesa (azul). b) El complejo aguja de una cepa silvestre de EPEC en donde el filamento EspA fue detectado con anticuerpos anti EspA acoplados a partículas de oro (Tomada de Sekiya, *et.al.*, 2001) c) Se muestran filamentos EspA en la infección de una célula HEL (Tomada de Knutton *et al.*, 1998). d) Fotografías de microscopía electrónica de complejos aguja purificados alineados para mostrar las diferentes longitudes que pueden alcanzar los filamentos de EPEC (Tomada de Sekiya *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que EspA por sí misma es capaz de formar filamentos sin la ayuda de ningún otro componente del LEE y que la proteína Cesa es su chaperona. Por medio de análisis cristalográficos se obtuvo la estructura del heterodímero Cesa-EspA y se observó que EspA tiene un dominio de α -hélices mediante el cual se da la interacción EspA-EspA. Por su parte, Cesa mantiene a la proteína EspA en su estado monomérico, inhibiendo la polimerización citoplásmica del filamento, al interactuar por medio de un motivo tipo *coiled-coil* en el carboxilo terminal (Figura 13) (a. Yip *et al.*, 2005).

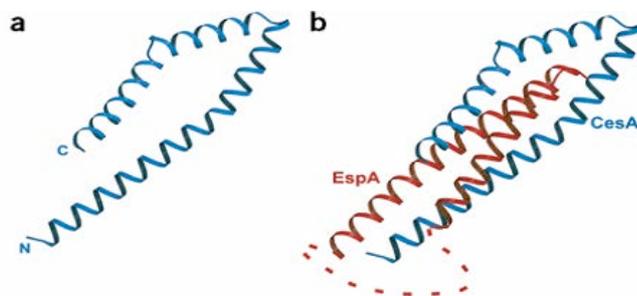


Figura 13. Estructura del complejo EspA-Cesa. a) Representación de Cesa en base a la estructura del complejo Cesa-EspA. b) Estructura de Cesa (Azul) unida a EspA (Rojo). La región flexible de EspA punteada en rojo. Dos alfa hélices de EspA interactúan de manera cercana con Cesa formando un complejo proteico (Tomada de a. Yip *et al.*, 2005).

Daniell y colaboradores (2003) determinaron la estructura tridimensional del filamento EspA (Figura 14). Consiste en un tubo helicoidal con un diámetro externo de 12nm y un canal central continuo de 2.5 nm de diámetro. De manera homóloga al flagelo, las moléculas de EspA son incorporadas en la punta del filamento (Crepin *et al.*, 2005) y la longitud del filamento EspA está relacionada con la concentración intracelular de proteína monomérica EspA, por lo que sus longitudes son muy variadas (desde 75 hasta 680 nm) (Figura 12d).

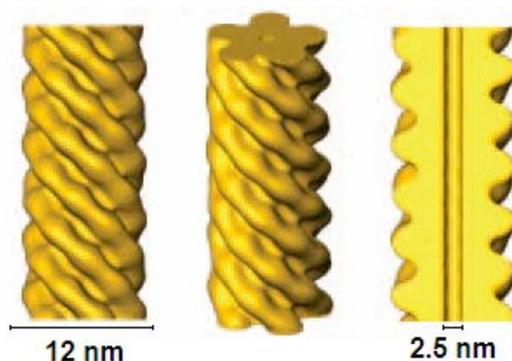


Figura 14. Modelo tridimensional del filamento EspA. Corte longitudinal, vista lateral y vista lateral inclinada. (Modificada de Daniell *et al.*, 2003).

Los filamentos EspA son conductos a través de los que se translocan las proteínas efectoras (Crepin *et al.*, 2005) y para esto es necesaria la formación de un poro de translocación en la membrana de la célula hospedera. El ensamblaje de éste requiere de las proteínas EspD, EspB y EspA. Las proteínas translocadoras EspB y EspD tienen dominios hidrofóbicos, mientras que EspA es hidrofílico. Se ha demostrado que las tres proteínas translocadoras interactúan entre ellas.

1.5.2. El anillo EscJ

En EPEC el homólogo de PrgK es la lipoproteína EscJ que posee una secuencia señal de peptidasa II (SPase II).

Debido a que esta proteína tiene un residuo de ácido glutámico en posición 2+ se predijo su asociación con la membrana externa; sin embargo Yip y colaboradores en 2005 demostraron con la ayuda de un gradiente de sacarosa, que esta proteína se asocia con la membrana interna. Así como EscJ, se han encontrado otros ejemplos como el de la lipoproteína de membrana interna MexA en *Pseudomonas*, que tiene un residuo de glicina en posición 2+. Estos datos sugieren que el mecanismo mediante el que se decide el destino de las lipoproteínas debe ser más complejo y aún no se entiende por completo. Con la determinación de la estructura atómica de EscJ se reveló que esta proteína forma un anillo

de 24 subunidades que sirve como plataforma para el ensamblaje del resto del complejo aguja (Figura 15) (b. Yip *et al.*, 2005).

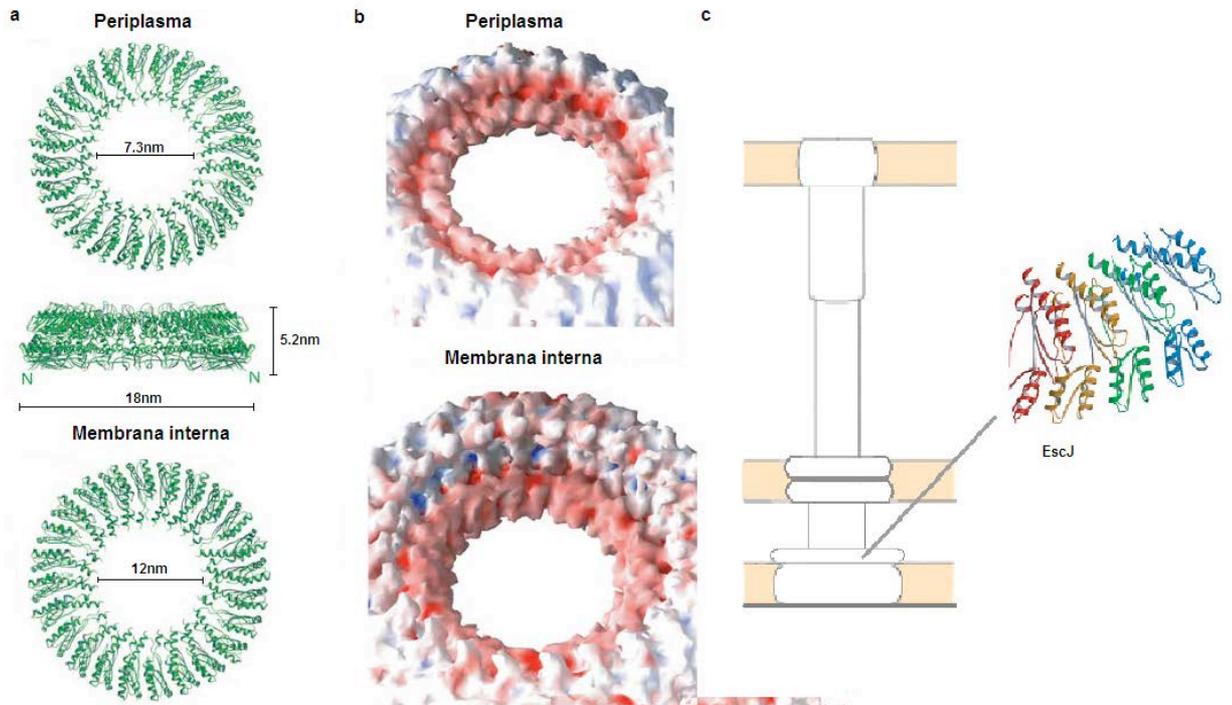


Figura 15. Modelaje, análisis electrostático y localización del anillo EscJ. a) Se muestra una representación del anillo EscJ. La vista lateral muestra la estructura exterior en dos capas. El amino terminal de todas las subunidades está localizado en la cara ancha del anillo. El extremo amino de dos subunidades EscJ se marca con dos N hacia la cara más ancha del anillo. El anclaje a la membrana interna se da por medio de estos extremos. b) Superficie electrostática del anillo EscJ. Se muestra la cara citoplásmica y periplásmica del canal y los anillos están ligeramente inclinados para que se aprecie la profundidad y la gran cantidad de cavidades presentes. La región que rodea el canal central en la cara periplásmica tiene carga negativa (Modificada de b. Yip *et al.*, 2005). c) Localización de la proteína EscJ en el SST3. Se muestra un tetrámero de la proteína EscJ.

En este modelo destaca, como ya se había mencionado: 1. La falta del fragmento transmembranal en el carboxilo terminal lo que podría significar que el anillo EscJ está situado encima de la membrana interna y por lo tanto es poco probable que genere un poro hueco dentro de ésta. El sitio en el que este anillo se une a la membrana puede servir para reclutar componentes transmembranales críticos como EscR, EscS, EscT, EscU y EscV que forman parte del aparato secretor que facilita el paso de las proteínas a secretarse a través de la membrana interna (Galán y Wolf-Watz, 2006). 2. Su amplio interior junto con sus características electrostáticas polares dan suficiente espacio y sitios de interacción para el anclaje de estos componentes transmembranales, muchos de los cuales se predice que contienen dominios periplásmicos que pueden interactuar con el anillo EscJ. 3. Este anillo tiene una porción que rodea la entrada periplásmica del mismo, que es altamente negativa y podría usarse como una región adaptadora para la unión del eje interno (b. Yip *et al.*, 2005).

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

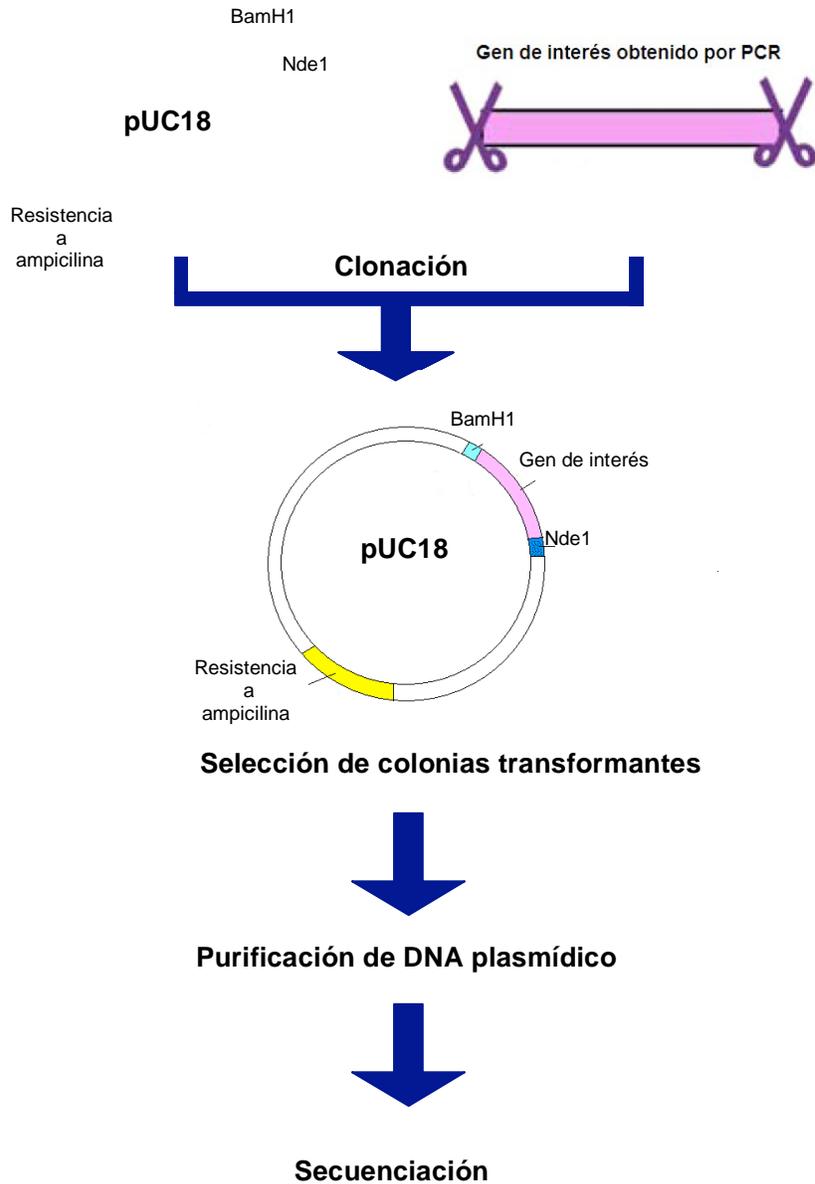
En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en la caracterización del sistema de secreción de efectores de virulencia en EPEC. Para llevar a cabo estos análisis se requiere generar las herramientas de estudio necesarias, por lo que el objetivo principal de este trabajo consistió en la generación de anticuerpos específicos para las proteínas recombinantes His-EspA y His-EscJ, componentes estructurales del SST3 de EPEC. Para ello se plantearon los objetivos particulares que enseguida se describen.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Amplificación de los genes *espA* y *escJ* a partir de DNA cromico de EPEC.
- Clonación de los genes *espA* y *escJ* en los vectores de expresión pUC18, pET19b y pTrc99a.
- Secuenciación de los genes *espA* y *escJ* clonados para certificar que no hubiera mutaciones en las construcciones obtenidas.
- Sobreexpresión de los genes *espA* y *escJ* en células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS .
- Purificación de las proteínas recombinantes His-EspA y His-EscJ por medio de cromatografía de afinidad.
- Generación de anticuerpos policlonales específicos contra las proteínas recombinantes en conejos hembra raza New Zealand White.

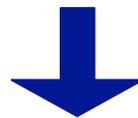
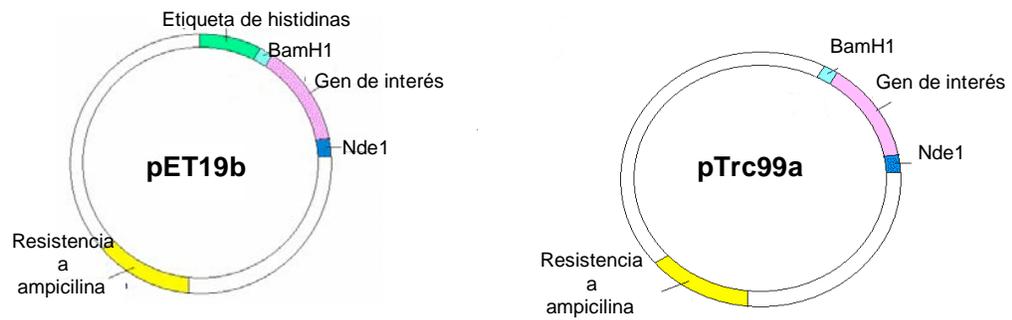
III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Esquema general





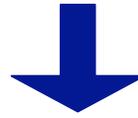
Subclonación en pET19b y pTrc99a



Transformación en la cepa de *E.coli* BL21



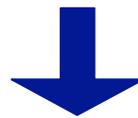
Inducción de las proteínas recombinantes



Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.



Inmunización de conejos



Obtención de anticuerpos

Tabla 2. Cepas y vectores y utilizados en este estudio.

Vectores		
	Descripción	Referencia
pUC18	Vector que presenta el sitio de multiclonación en el gen <i>lacZ</i> , por lo que es posible distinguir a las clonas que contengan el DNA de interés mediante \square -complementación. Confiere resistencia a la ampicilina.	New England Biolabs
pTrc99AFF4	Vector generado a partir del plásmido pTrc99A por la sustitución del sitio de restricción <i>NcoI</i> del sitio de multiclonación por el sitio <i>NdeI</i> , y la eliminación del único sitio <i>NdeI</i> en el vector	Ohnishi <i>et. al.</i> , 1997
pET19b	Vector de expresión que contiene un promotor T7 útil para la expresión de proteínas recombinantes, las cuales poseerán una etiqueta de 10 histidinas en el extremo amino. Confiere resistencia a ampicilina.	Novagen
Cepas		
E2348/69	EPEC tipo silvestre serotipo 0127:H6	Levine <i>et. al.</i> , 1978.
Nova Blue	Cepa que produce plásmidos de buena calidad.	Novagen
BL21(DE3)pLysS	Cepa lisogénica del bacteriófago DE3 empleada para expresión que posee el promotor lacUV5 que controla la transcripción de la RNA polimerasa T7. Este gen es inducible por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Es deficiente en la proteasa lon y carece de la proteasa de membrana externa ompT. Provee la lisozima T7 para reducir los niveles de expresión basal.	Studier <i>et.al.</i> , 1990
Top10	Permite la transformación eficiente de DNA, el escrutinio de colonias recombinantes y la obtención de preparaciones más limpias de DNA.	Invitrogen

La preparación y composición de los medios de cultivo, soluciones, amortiguadores y antibióticos utilizados en este trabajo se detallan en el Apéndice A.

3.2 Amplificación de los genes *espA* y *escJ* por PCR.

Para la clonación de las diferentes construcciones utilizadas en este estudio se amplificaron mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) los genes de interés (*espA* de 578 pares de bases y *escJ* de 572 pares de bases) que querían ser clonados en los diferentes vectores. Se utilizó como templado DNA cromosomal de una cepa de EPEC resistente a estreptomycin. Se diseñaron oligonucleótidos que introducen sitios de corte para enzimas de

restricción. Los oligonucleótidos *forward* tienen el sitio de restricción para la enzima *NdeI* y los *reverse* para la enzima *BamHI* (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes *espA* y *escJ*. Los sitios de corte para enzimas de restricción están marcados en negritas.

<i>espA</i>		
	5'	3'
Forward	AAGAGGTATAC CATAT GGATACATC	
Reverse	GGATGGTT GGATCC GGTTATTTAC	
<i>escJ</i>		
	5'	3'
Forward	GATGCAATAC CATAT GAAAAAACAC	
Reverse	TATTGTT CGGATCC ATTACCCGTC	

Para la amplificación de los genes de interés se utilizó un volumen final de 100 μ l (Tabla 4). El programa que se utilizó para la amplificación del gen *espA* es el siguiente: 3 ciclos de 2 min a 95°C, 1 min a 45°C, 1 min a 72°C y 24 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C y al término de éstos; 10 min a 72°C, y por último 10 min a 4°C.

Tabla 4. Reacción de PCR utilizada para la amplificación de los genes *espA* y *escJ*.

Componentes	Volumen (μ l)	Concentración final
DNA molde	2	500ng
Amortiguador de Taq 10X	10	1X
Mezcla de dNTPs	10	2mM
Primer forward	2	0.05nmol
Primer reverse	2	0.05nmol
Polimerasa Taq	1	2.5 unidades
Agua	73	-
<i>Total</i>	<i>100</i>	-

El gen *escJ* se amplificó utilizando la enzima Pfu. El programa que se empleó para su amplificación fue el siguiente: 4 min a 95°C para la completa separación de las hebras de DNA; y 3 ciclos de 1 min a 95°C; 1 min a 43°C; 2 min a 72°C y 27 ciclos de 1 min a 95°C; 1 min a 58°C; 2 min a 72°C y al término de éstos, 10 min a 72°C, por último 30 min a 4°C. Se empleó un termociclador de la marca MJ Research.

3.3 Clonación de los genes *espA* y *escJ*.

El producto de PCR se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Apéndice B) y se visualizaron los fragmentos amplificados por tinción con bromuro de etidio. Se utilizó el Kit QIAquick Gel Extraction de Qiagen para su purificación apartir de gel (Apéndice B). Las muestras se digirieron con las enzimas *BamH1* y *Nde1*. Estos fragmentos fueron utilizados para su clonación en los diferentes vectores.

3.3.1 Clonación del gen *espA* en el vector pUC18.

La clonación del gen *espA* se hizo en el vector pUC18 debido a su alto número de copia y a que tiene un sitio de multiclونación en la región *lacZ*, por lo que cualquier inserción de DNA en este vector no permitirá la α complementación en una cepa *lacZDM Δ 15*; por lo que será posible la selección de colonias blancas en placas que contienen IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) y el sustrato X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (Figura 16).

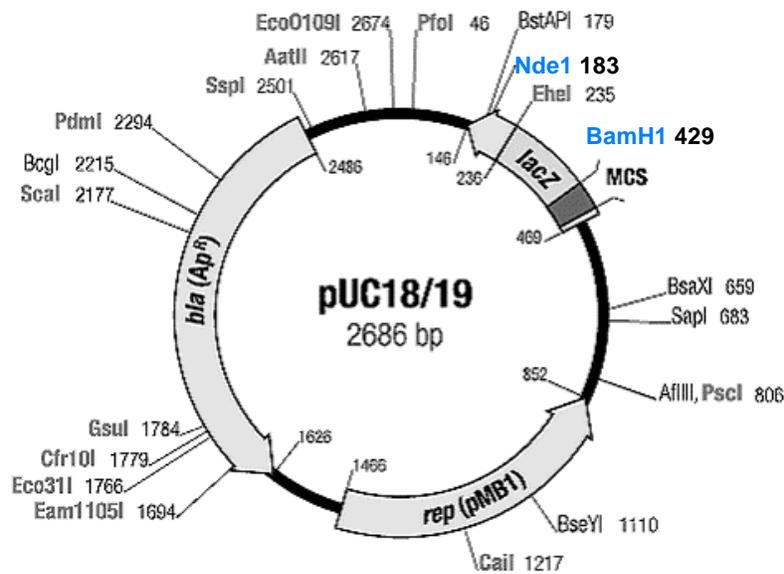


Figura 16. Mapa del vector pUC18. En azul se muestran los sitios de corte de las enzimas *BamH1* y *Nde1*, que fueron empleados para la clonación del gen *espA*.

La reacción de ligación entre el inserto y el vector previamente digeridos se hizo utilizando la ligasa T4 de New England Biolabs (Tabla 5). Se incubó 16 horas a 16°C. Al final de este tiempo se transformaron (Apéndice B).

Tabla 5. Reacción de ligación utilizada para la clonación de *espA* en el vector pUC18.

pEUespA		
Componentes	Volumen (µl)	Concentración final
Inserto	15	225ng
Vector	10	200ng
Ligasa	1	400 unidades
Amortiguador	3	1x
Agua	1	-
<i>Total</i>	<i>30</i>	-

En todos los casos de clonación, algunas colonias transformantes fueron seleccionadas, y se utilizó el Kit QIAprep Spin de Qiagen para la extracción de DNA plasmídico (Apéndice B), el cual fue sometido a un análisis de restricción con las enzimas *BamHI* y *NdeI* con el fin de certificar que la construcción fuera correcta. Se seleccionó una de ellas y las demás se desecharon. Posteriormente la construcción seleccionada se mandó a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, para descartar cualquier mutación que se hubiera podido insertar en el gen durante su amplificación. Esta construcción se denominó pEUespA.

3.3.2 Subclonación del gen *espA* y clonación del gen *escJ* en el vector pET19b.

El gen *espA* se subclonó en el vector pET19b (Tabla 6) y la construcción obtenida se nombró pEEespA. El vector pET19b se utilizó para la producción de las proteínas debido a que incorpora en el extremo amino terminal de éstas una etiqueta de 10 histidinas, lo que permite su posterior purificación (Figura 17).

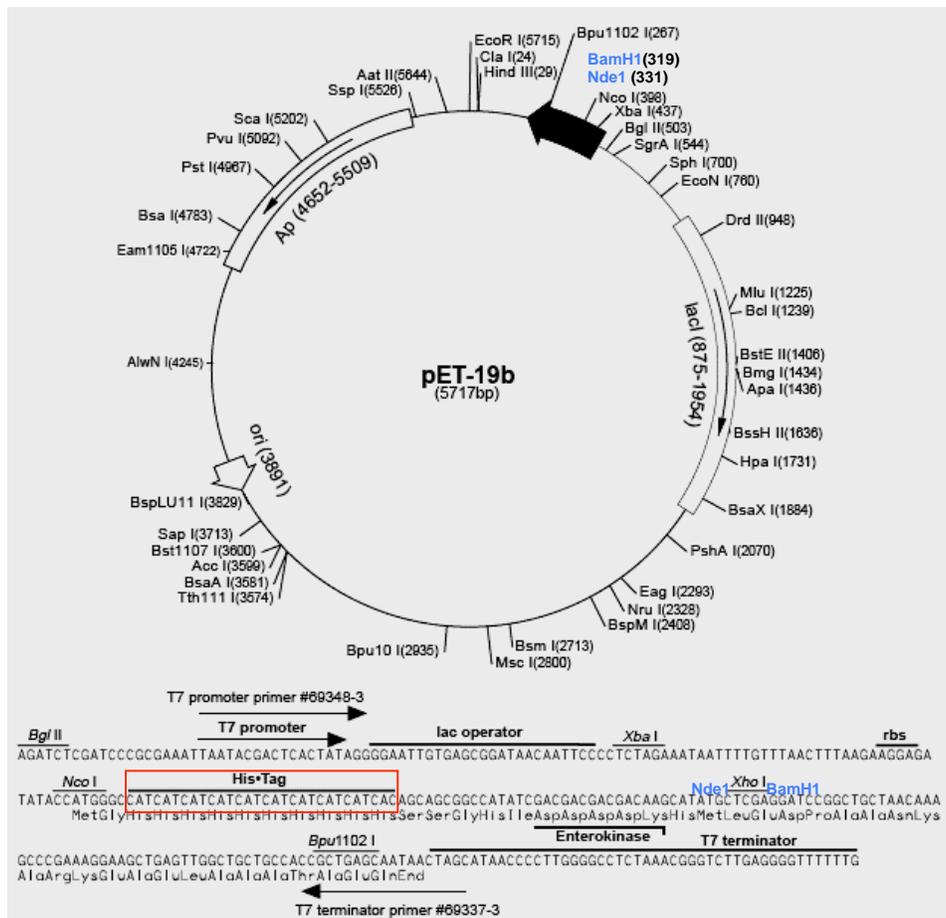


Figura 17. Mapa del vector de expresión pET19b. En azul se muestran los sitios de corte para las enzimas de restricción *BamHI* y *NdeI* que fueron utilizadas para clonar en este vector. Con rojo se resalta el fragmento que codifica para la etiqueta de histidinas.

Tabla 6. Reacción de ligación empleada para la subclonación del gen *espA* en el vector pET19b.

pEEespA		
Componentes	Volumen (µl)	Concentración final
Inserto	2	30ng
Vector	15	20ng
Ligasa	1	400 unidades
Amortiguador	2	1X
Agua	-	-
<i>Total</i>	<i>20</i>	-

El gen *escJ* se clonó directamente en el vector pET19b. La construcción obtenida se mandó a secuenciar y se nombró pEEescJ (Tabla 7).

Tabla 7. Reacción de ligación empleada para la clonación del gen *escJ* en el vector pET19b.

pEEescJ		
Componentes	Volumen (µl)	Concentración final

Inserto	3	30ng
Vector	2	20ng
Ligasa	1	400 unidades
Amortiguador	2	1x
Agua	12	-
<i>Total</i>	<i>20</i>	-

3.3.3 Subclonación del gen *espA* y clonación del gen *escJ* en el vector pTrc99aFF4.

Se utilizó el vector de expresión pTrc99aFF4, el cual nos permite obtener una proteína nativa (sin etiquetas), que será importante para estudios de interacción en futuras investigaciones (Figura 18).

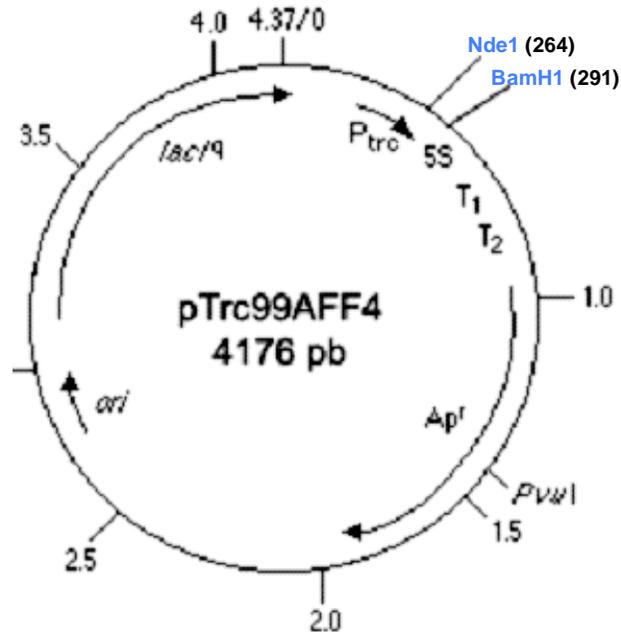


Figura 18. Mapa del vector pTrc99aFF4. En azul se marcaron los sitios de corte de las enzimas *BamHI* y *NdeI*, los cuales fueron utilizados para clonar los genes de *espA* y *escJ*.

El gen *espA* se subclonó en el vector pTrc99aFF4 (Tabla 8) y la construcción obtenida se denominó pETespA

Tabla 8. Reacción de ligación empleada para la clonación del gen *espA* en el vector pTrc99a.

pEEespA		
Componentes	Volumen (µl)	Concentración final
Inserto	9	135ng
Vector	3	120ng

Ligasa	1	400 unidades
Amortiguador	1.5	1X
Agua	0.5	-
<i>Total</i>	<i>15</i>	-

El gen *escJ* se clonó en el vector pTrc99aFF4 (Tabla 9) y la construcción obtenida se mandó a secuenciar y se denominó pETescJ

Tabla 9. Reacción de ligación empleada para la clonación del gen *escJ* en el vector pTrc99a.

pETescJ		
Componentes	Volumen (µl)	Concentración final
Inserto	3	30ng
Vector	1	20ng
Ligasa	1	400 unidades
Amortiguador	2	1X
Agua	13	-
<i>Total</i>	<i>20</i>	-

3.4 Inducción de la construcción pEEespA y purificación de la proteína recombinante His-EspA.

Para la producción de la proteína recombinante la construcción pEEespA que se introdujo por transformación en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS como se describirá en el apéndice B. Se inoculó un precultivo de 2ml de LB con 100µg/ml de ampicilina con una colonia de la cepa BL21 transformada con la construcción pEEespA y se incubó a 37°C con agitación durante 16 horas. Posteriormente se preparó un cultivo con 200ml de LB con ampicilina con una dilución 1:100 del precultivo y se incubó a 37°C hasta que alcanzó una DO₆₀₀ 0.6-0.8. La producción de la proteína se indujo por la adición de 0.5 mM de IPTG y se incubó a 30°C durante 4h, al término de las cuales las células se cosecharon por centrifugación a 11,973x g por 30 minutos a 4°C. La pastilla se almacenó a 4°C. A continuación, la pastilla se resuspendió en 16 ml de amortiguador BB (Binding buffer) (Apéndice A). El cultivo se sonicó en baño de hielo con una intensidad intermedia por 40 segundos en tres ocasiones con intervalos de un minuto entre cada una de ellas. El cultivo se centrifugó a 26,940x g a 4°C por 30 min. La pastilla se desechó y el lisado celular (sobrenadante) se ultracentrifugó a 145, 264x g a 4°C por 1 hora El sobrenadante se cargó en una columna con 2 ml de agarosa acoplada a níquel, la cual se equilibró previamente con 10ml de amortiguador BB. Con el fin de eliminar las proteínas que se unieron de forma

inespecífica a la columna, ésta se lavó con amortiguadores con bajas concentraciones de imidazol de la siguiente manera: 25ml de amortiguador BB con 5mM de imidazol, 7.5 ml de BB con 30mM de imidazol, 7.5ml de BB con 60mM de imidazol y posteriormente se eluyó la proteína de interés con 3ml de BB con 500mM de imidazol. La pureza de la proteína se verificó en geles de poliacrilamida al 15% (Apéndice B) que se tiñeron con azul de Coomassie 0.2%.

La proteína eluida se dializó por 12 horas con 3 cambios de amortiguador PBS (phosphate-buffered saline) empleando una membrana de la marca Spectra/Pore 3 MWCO 3,500.

La concentración de la proteína se cuantificó utilizando el ensayo de proteína de Bio-Rad, basado en el método de Bradford. Éste involucra la adición de un colorante básico a la solución de proteína, por lo que se va a dar un cambio de color en respuesta a la concentración de la proteína. Este cambio se determinó por medio de un espectrofotómetro con longitud de onda de 595nm. Los valores obtenidos se extrapolaron con los de una curva estándar de albúmina bovina de 0 a 1 µg/ml.

3.5 Obtención de anticuerpos anti-EspA

Se utilizó un conejo hembra (*Orhyctolagus cuniculus*, raza New Zealand White) de 1.5 kg. El conejo llegó a las instalaciones del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM una semana antes del comienzo del protocolo de inmunización.

Antes de la primera inmunización, se extrajeron 10 ml de sangre y se obtuvo el suero preinmune. La sangre se dejó a temperatura ambiente durante una hora y toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la sangre se centrifugó a 11,973x g durante 20 min a 4°C para separar el suero del coágulo formado. El suero obtenido se etiquetó y se conservó a -70°C.

La inmunización se realizó por vía subcutánea. Este tipo de inyección permite inocular volúmenes más grandes al administrado en más de un sitio del lomo del animal. En un inóculo de 2ml totales se administraron 300 µg de la proteína purificada con un volumen igual de adyuvante completo de Freund, el cual va a estimular la respuesta inmune y protegerá al antígeno del catabolismo rápido.

Después de la inmunización se administraron tres dosis como se indica en la tabla 8. En cada una de estas inoculaciones se administraron 200 μ g de antígeno con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund.

Los anticuerpos alcanzan su máxima concentración alrededor de 10-14 días después de la inoculación, por lo que 12 días después de cada refuerzo se realizó la sangría para obtener los diferentes sueros. La sangre se extrajo por punción de la arteria auricular.

Tabla 8. Esquema de inmunización

Día	Procedimiento	Sangrado
-7	Adquisición del conejo	
1	Obtención de suero preinmune/Inmunización	Sí
20	Primer refuerzo	
32	Obtención de suero titular	Sí
50	Segundo refuerzo	
62	Obtención de suero titular	Sí
80	Tercer refuerzo	
92	Sangría final	Sí

3.6 Determinación del título de anticuerpos.

Los antisueros obtenidos se analizaron mediante la técnica de Western blot. Se probaron diferentes diluciones para determinar a cuál se identificaba sólo la proteína de interés. Se corrió una muestra de la proteína His-EspA en un gel de poliacrilamida 15% junto con una muestra de un lisado celular en el tiempo 4 h de inducción de la proteína EspA. El gel se transfirió durante 16 horas a 25 volts a una membrana de nitrocelulosa de la marca Protran de Bios Science. La membrana se bloqueó con solución bloqueadora toda la noche a 4°C con agitación. La membrana se lavó en tres ocasiones con 30ml de amortiguador TBS-Tween 0.3% durante 10 minutos a 4°C con agitación. Al final de los lavados la membrana se incubó con agitación a 4°C con suero anti EspA 1:55,000 diluido en solución bloqueadora durante una hora. La membrana se lavó en tres ocasiones durante 10 minutos con 30 ml de amortiguador TBS-Tween 0.3% a 4°C con agitación. La membrana se incubó con solución bloqueadora con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con la peroxidasa de rábano a una dilución de 1:25, 000 durante una hora con agitación a 4°C. Se lavó la membrana como se describió anteriormente. Para la inmunodetección, se utilizó el Kit ECL

de Amersham Biosciences. Este kit utiliza dos sustancias: la peroxidasa de rábano y el peróxido de hidrógeno, que reaccionan para formar luminol. El luminol se oxida gracias al peróxido de hidrógeno, lo que va a dar como resultado una señal luminosa que va a ser captada en placas fotosensibles.

3.7 Ensayo de secreción.

.Se inició un precultivo con una colonia fresca de células EPEC E2348/69 tipo silvestre en 2 ml de LB con 25 µg/ml de estreptomicina, las células se crecieron a 37°C con agitación por 12h. Se inocularon 10 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), previamente calentado a 37°C durante 1 h, con 260 µl del precultivo y se incubaron a 37°C sin agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ cercana a 1.0. Se transfirieron 1.3 ml del cultivo a un tubo de microcentrífuga y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos. La pastilla resultante se resuspendió en 100 µl de amortiguador de carga 1X y se utilizó como muestra de células totales.

El resto del cultivo se centrifugó a 11,973 x g por 15 min. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron con 1.2 ml de ácido tricloroacético (TCA) y se incubaron a 4°C por 2h. Las proteínas se recuperaron por centrifugación a 26,940 x g por 30 min. El sobrenadante se removió y el precipitado se resuspendió en amortiguador de corrida 1X de acuerdo con sus valores normalizados de DO y se agregó 1 µl de Tris saturado para neutralizar al ácido residual.

3.8 Inducción de la construcción pEEescJ y purificación de la proteína recombinante His-EscJ.

.Para la producción de la proteína recombinante His-EscJ el plásmido pEEescJ se transformó en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Apéndice B). Se inoculó un precultivo de 10ml de LB con ampicilina con una colonia de la cepa BL21 transformada con el plásmido recombinante y se incubó a 37°C con agitación durante 16 h. Posteriormente se preparó un cultivo de 500 ml de LB con ampicilina el cual se inoculó con el precultivo y se incubó a 37°C hasta que alcanzó una DO₆₀₀ 0.6-0.8. La producción de la proteína se indujo por la adición de 0.5 mM de IPTG a 30°C durante 4 h, al término de las cuales las células se cosecharon por centrifugación a 11,973x g por 15 minutos a 4°C. La pastilla almacenó a 4°C

y al día siguiente se resuspendió en 40 ml de Amortiguador de unión (AU) con 6M de urea. El cultivo se sonicó con una intensidad intermedia por 2 minutos en dos ocasiones con intervalos de un minuto. El cultivo se centrifugó a 26,940 x g a 4°C por 15 minutos. La pastilla se desechó y el lisado celular se ultracentrifugó a 145,264x g a 4°C por 1 hora. El sobrenadante se cargó en una columna con 3 ml de agarosa acoplada a níquel, la cual fue previamente equilibrada con 10ml de amortiguador AU 6M de urea. Posteriormente se lavó la columna con 20ml de AU 6M de urea, 60ml de Amortiguador de lavado (AL) 6M de urea, 30mM imidazol y 20ml de 6M de urea 60mM imidazol y se eluyó con 3ml de amortiguador de elución (AE) 100mM de imidazol, AE 200mM de imidazol, AE 300mM de imidazol y AE 500mM de imidazol

La proteína pura se dializó contra amortiguador de diálisis con cantidades decrecientes de urea. Se empleó una membrana de la marca Spectra/Pore 3 MWCO 3,500. La concentración de la proteína se cuantificó utilizando el ensayo de proteína de Bio-Rad.

3.9 Análisis bioinformático de la proteína EscJ.

Para el análisis de la secuencia de la proteína EscJ se utilizó el programa Lipo P 1.0 (Juncker et. al., 2003) el cual es útil para la predicción de lipoproteínas y para discernir entre secuencias señal y otros péptidos de señal discriminando hélices en el extremo amino terminal que pueden resultar en falsos positivos.

Esta secuencia además se analizó con el programa Prosite, el cual se compone de documentación que describe dominios de proteínas, familias y sitios funcionales, así como los patrones y perfiles que los identifican.

Se utilizó el programa TMpred, el cual hace predicciones de las regiones que atraviesan la membrana y su orientación. El algoritmo se basa en el análisis estadístico de TMbase, una base de datos de proteínas transmembranales.

IV. RESULTADOS

4.1 Amplificación del gen *espA*.

En un gel de agarosa 1% se verificó la reacción de PCR. Se observó que el tamaño del gen amplificado corresponde con el tamaño reportado para el gen *espA*, el cual es de 578 pares de bases (Figura 19).

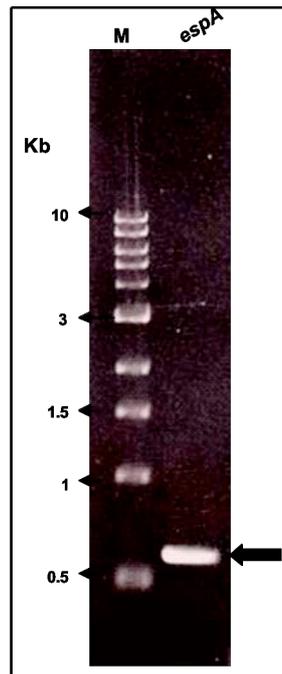


Figura 19. Amplificación de los genes *espA*. Carril 1: Gen *espA* de 0.58 Kb. Con una flecha se marca el fragmento amplificado.

4.2 Clonación del gen *espA*.

El gen de interés, así como el vector (pUC18, pET19b o pTrc99aFF4 según el caso) fueron digeridos y purificados como se describió en la metodología. Se corrió un gel de agarosa 1% con 3 μ l de cada una de las muestras para verificar que no tuvieran contaminantes y conocer su concentración aproximada para así establecer una reacción de ligación (Figura 20).

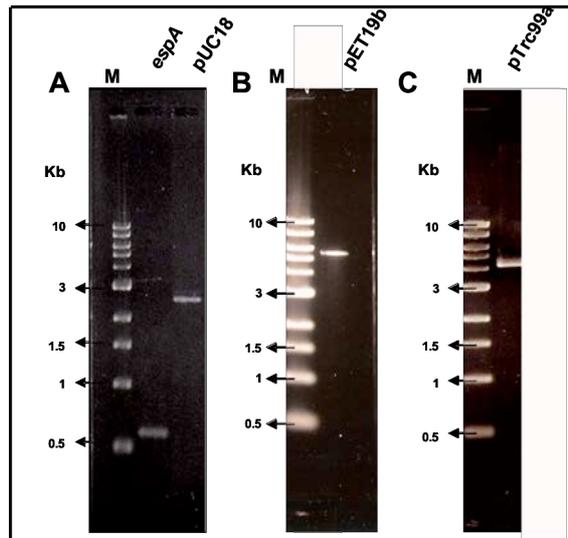


Figura 20. Purificación y digestión de los vectores pUC18, pET19b y pTrc99aFF4 y gen *espA*. A) Carril 1: El gen *espA* de 0.58 Kb; carril 2: El vector pUC18 de 2.7 Kb; B) Carril 1: El vector pET19b de 5.7 Kb; C) Carril 1: El vector pTrc99a de 4.1 Kb.

Se estableció una reacción de ligación como se describió en material y métodos. La reacción de ligación se transformó en células competentes de *E. coli* Top10. De las colonias resultantes se seleccionaron algunas, se les extrajo el DNA plasmídico y se sometieron a un análisis de restricción utilizando las enzimas *Bam*HI y *Nde*I. Para comprobar que la construcción fuera la correcta se observaron las digestiones en geles de agarosa 1% (Figura 21). A cada una de las construcciones se les asignó un nombre. La secuencia del gen *espA* de la construcción pUEespA en el vector pUC18 fue comparada con la reportada en 1998 por Elliot y colaboradores con la ayuda del programa computacional DNAMAN. Ambas secuencias fueron idénticas (dato no mostrado).

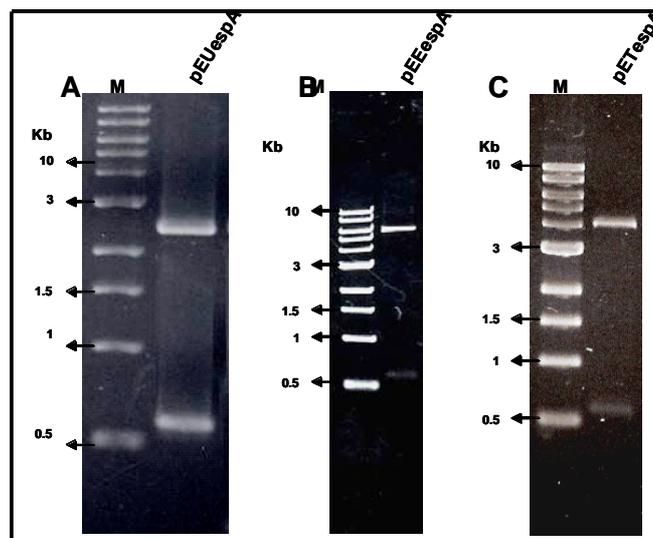


Figura 21. Análisis de restricción de las construcciones obtenidas. A) Carril 1: Construcción pEUespA; B) Carril 1: Construcción pEEespA; C) Carril 1: Construcción pETespA.

4.3 Inducción de la construcción pEEespA y purificación de la proteína recombinante His-EspA.

Como se describe en el apéndice B, la construcción pEEespA se transformó en la cepa BL21 (DE3) plysS de *E. coli* para inducir la producción de la proteína recombinante His-EspA con 0.5 mM de IPTG. El cultivo se creció durante 4 horas a 30°C. Cada hora se colectaron muestras de 1.5 ml para su análisis mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida) al 15% (Figura 22). La proteína nativa EspA tiene un peso molecular de 20.5 kDa y la proteína recombinante His-EspA tiene un peso molecular deducido de 21.9 kDa. En el perfil de inducción se produce una proteína que migra cerca del marcador de peso molecular de 25 kDa y, como se muestra en la figura 22, la mayor producción de proteína se da a las 4 horas de inducción.

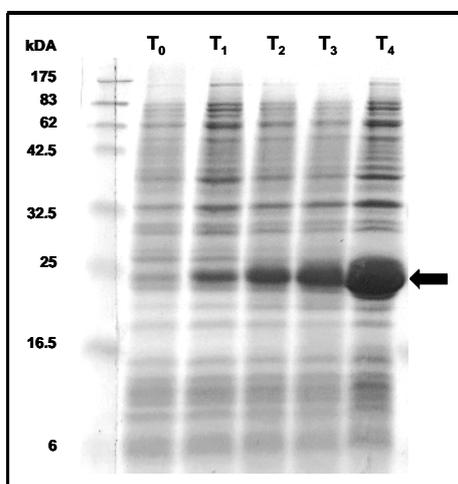


Figura 22. Inducción de un cultivo de células BL21 (DE3) plysS con la construcción pEEespA. SDS PAGE al 15%. Carril 1: Cultivo sin inducir; carril 2: Cultivo a la hora de inducción; carril 3: Cultivo a las 2 horas de inducción; carril 4: Cultivo a las 3 horas de inducción, carril 5: Cultivo a las 4 horas de inducción. Con una flecha se señala la proteína inducida.

Para determinar si la proteína producida se encontraba soluble en el citoplasma o insoluble formando cuerpos de inclusión, las células de un cultivo inducido durante cuatro horas en las condiciones antes mencionadas se fraccionaron mediante sonicación y las fracciones se analizaron por SDS PAGE al 15%. Como se observa en la figura 23A la mayor cantidad de proteína recombinante se encuentra en la fracción insoluble, probablemente formando cuerpos de inclusión; sin embargo existe un fracción importante soluble en el citoplasma. Para confirmar que esta proteína poseía la etiqueta de histidinas y verificar su presencia en la fracción soluble, ambas fracciones se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos anti-histidinas. El ensayo de inmunodetección muestra que el mayor reconocimiento del anticuerpo se obtuvo de la fracción insoluble, y confirma que

existe proteína en la fracción soluble y que la proteína sobreproducida es la recombinante que posee la etiqueta de histidinas (Figura 23 B).

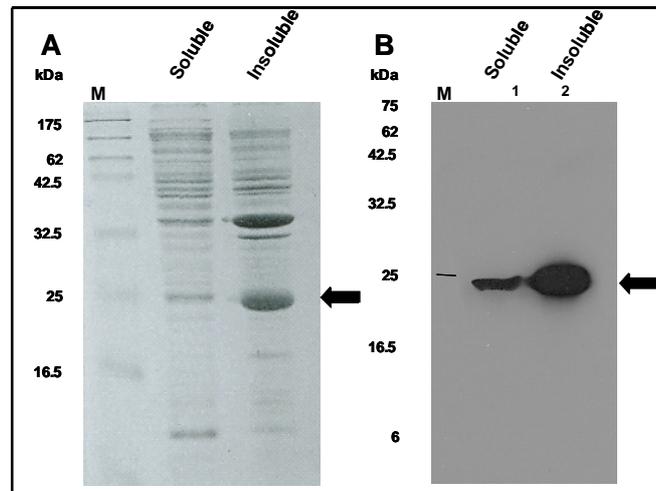


Figura 23. Localización de la proteína His-EspA en las fracciones celulares de *E. coli* BL21 (DE3) plysS. A) SDS PAGE 15% Carril 1. Fracción soluble, carril 2: Fracción insoluble; B) Western blot con anticuerpos anti-His. Carril 1. Fracción soluble, carril 2. Fracción insoluble. Con una flecha se marca la proteína His-EspA.

Debido a que la proteína recombinante His-EspA tiene una etiqueta de 10 histidinas en el extremo amino terminal, se procedió a su purificación por cromatografía de afinidad, utilizando agarosa acoplada a níquel NTA. En la columna previamente equilibrada se cargó el lisado celular de un cultivo de 200 ml. La columna se lavó con amortiguadores de lavado que contenían concentraciones bajas de imidazol, con el fin de eliminar la unión de proteínas no específicas, mientras que His-EspA continuó fuertemente unida a la matriz. Como se muestra en la figura 24 se eluyó la proteína con amortiguador que contiene 500 mM de imidazol, fracción en la cual es notablemente mayoritaria.

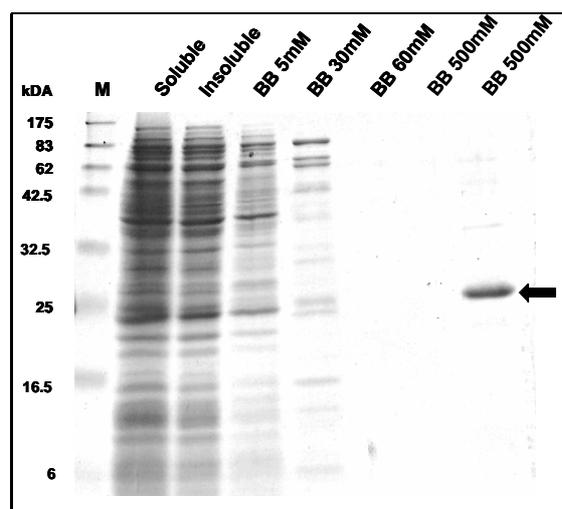


Figura 24. Purificación de la proteína His-EspA. Carril 1: Fracción soluble del lisado celular, carril 2: Fracción no unida a la columna, carril 3: Lavado con BB con 5mM de imidazol, carril 4: Lavado con BB con 30mM de imidazol, carril 5: Lavado con BB con 60mM de imidazol y carril 6 y 7: Eluciones con BB con 500mM de imidazol. Con una flecha se marca la proteína His-EspA purificada.

La proteína resultante se dializó con amortiguador PBS durante 12 horas con 3 cambios. Una vez dializada se cuantificó empleando el método de Bradford y se obtuvo un rendimiento promedio de 4050 μg /litro de cultivo.

4.4 Caracterización del suero anti His-EspA.

El título de los anticuerpos se determinó mediante la técnica de Western blot. En un gel de poliacrilamida se cargó una muestra de la proteína EspA y una muestra de lisados celulares completos de la construcción pEEspA inducida durante 4h. Estas muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se probaron con el suero preinmune obtenido el día uno del calendario de inmunización (Figura 25). Se observa que no hubo reconocimiento de ninguna de las proteínas transferidas a la membrana.

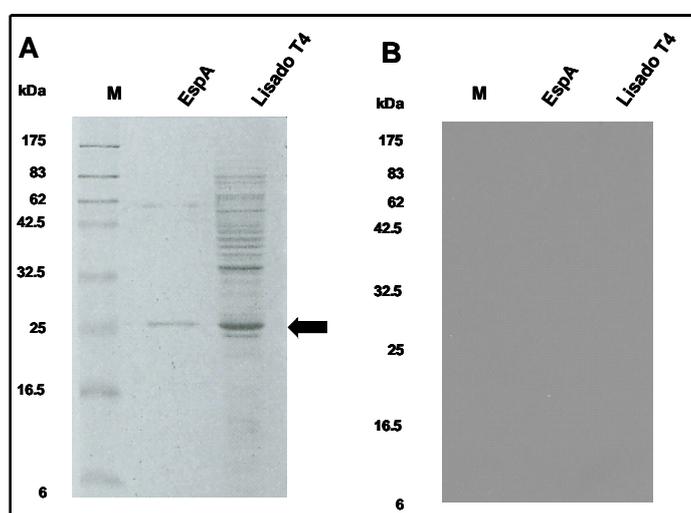


Figura 25. Inmunodetección con el suero preinmune. A) SDS PAGE 15%. Carril 1: Proteína His-EspA purificada, carril 2: Lisado celular de células BL21 transformadas con la construcción pEEspA después de 4 horas de inducción; B) Western blot con el suero preinmune. Carril 1: Proteína His-EspA purificada, carril 2: Lisado celular de células BL21 transformadas con la construcción pEEspA después de 4 horas de inducción. Con una flecha se marca la proteína de interés.

El suero obtenido específico para la proteína His-EspA se probó en varias diluciones y se encontró que la dilución óptima fue 1:55,000 (Figura 26).

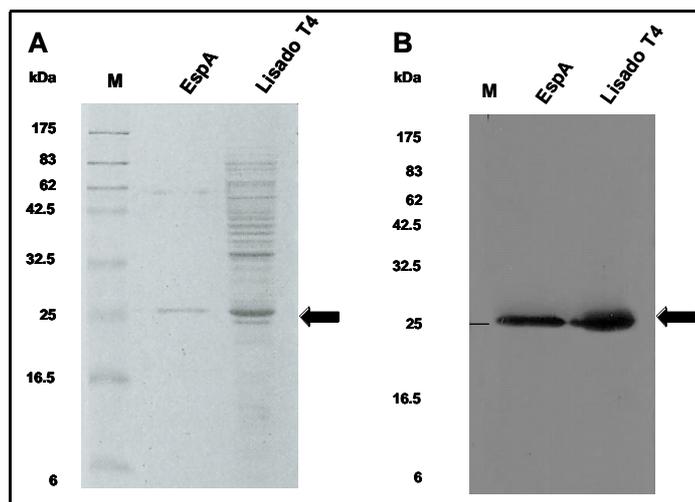


Figura 26. Inmunodetección de la proteína His-EspA con anticuerpos policlonales anti His-EspA. A) Carril 1: Proteína His-EspA purificada, carril 2: cultivo de pEEspA después de 4 horas de inducción; B) Western blot con anticuerpos anti His-EspA. Carril 1: Proteína His-EspA purificada, carril 2: cultivo de pEEspA después de 4 horas de inducción. Con una flecha se marca la proteína His-EspA.

4.5. Ensayo de secreción.

Se hizo un ensayo de secreción con células de EPEC tipo silvestre. Estas células se crecieron en medio DMEM a 37° C sin agitación. En la figura 27 se observa la secreción de las proteínas translocadoras EspA, EspB,, EspD y también la proteína EspC, cuya secreción es independiente de SST3. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con el suero específico para la proteína His-EspA.

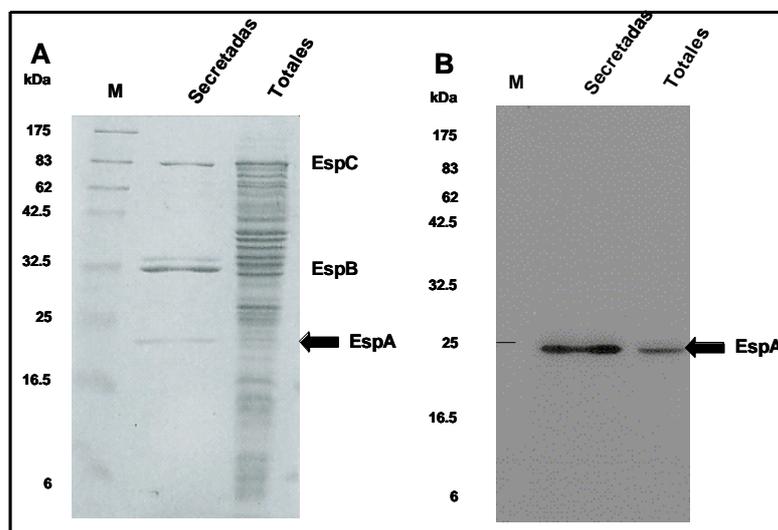


Figura 27. Inmunodetección de la proteína EspA nativa en ensayos de secreción.. A) SDS PAGE del perfil de secreción de EPEC silvestre. Carril 1: Muestra de proteínas secretadas. carril 2: Muestra de lisados celulares completos; B) Western blot con anticuerpos anti His-EspA. Carril 1: Muestra de proteínas secretadas. carril 2: Muestra de lisados celulares completos. Con una flecha se marca la proteína EspA.

Se muestra el reconocimiento específico de los anticuerpos al reaccionar con la proteína EspA nativa, el mayor reconocimiento se da en la fracción de las proteínas secretadas por

EPEC, pero cabe resaltar que se detecta también la proteína EspA en el lisado celular, lo que habla de la alta especificidad del anticuerpo obtenido.

4.6. Amplificación del gen *escJ*.

La amplificación del gen *escJ* se llevó a cabo como se especificó en la sección de material y métodos. La muestra obtenida se analizó en un gel de agarosa 1%. Se observó que el tamaño del producto amplificado con el reportado para dicho gen de 572 pares de bases (Figura 28).

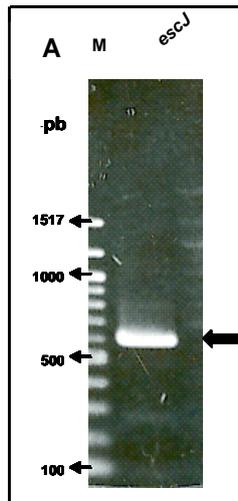


Figura 28. Amplificación del *escJ*. A) carril 1: marcador de tamaño molecular, carril 2: *escJ* de 0.57 Kb. Con una flecha se marca el fragmento amplificado.

4.7 Clonación del gen *escJ*.

Para clonar el gen *escJ* en los vectores pUC18, pET19b o pTrc99aFF4, éstos fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Nde*I, se purificaron (Figura 29).

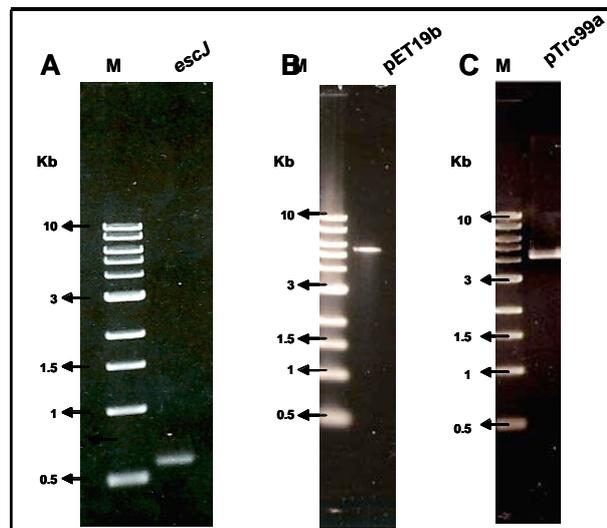


Figura 29. Purificación y digestión del gen *escJ* y los vectores pET19b y pTrc99a FF4. A) Carril 1: El gen *escJ* de 0.57 Kb. B) Carril 1: El vector pET19b de 5.7 Kb. c) Carril 1: El vector pTrc99a de 4.1 Kb.

Estos vectores se ligaron con el producto de PCR como se detalla en la sección de material y métodos. La reacción de ligación se transformó en células competentes de *E. coli* Top10. De una de las colonias obtenidas de la transformación, se obtuvo el DNA plasmídico y se digirió utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I y una vez que se comprobó la presencia del gen de interés en las construcciones (Figura 30), se secuenció y comparó con la secuencia reportada por Elliot y colaboradores encontrando un 100% de identidad.

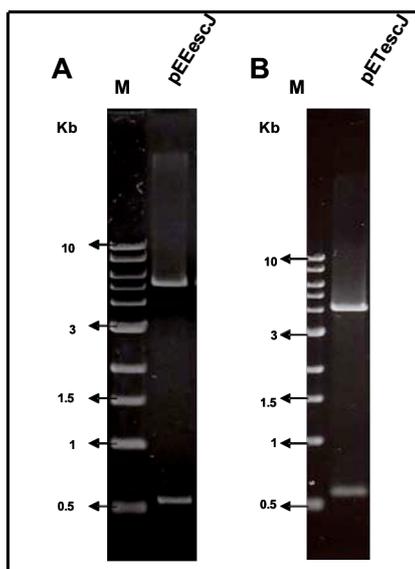


Figura 30. Análisis de restricción de las construcciones obtenidas. A) Carril 1: Construcción pEEescJ. B) Carril 1: Construcción pETescJ.

4.8 Inducción de la construcción pEEescJ y purificación de la proteína recombinante His-EscJ.

Para la producción de la proteína recombinante His-EscJ se bajó la temperatura de incubación e inducción del cultivo. El cultivo se creció durante 4 horas a 30°C y se indujo la producción de la proteína His-EscJ con la adición de 0.5mM de IPTG. Cada hora se tomaron muestras de 1.5 ml para su análisis electroforético. El peso molecular de la proteína EscJ nativa y madura deducido a partir de su secuencia es de 18.7 kDa. Como se observa en la figura 31 la proteína His-EscJ con una masa molecular deducida de 22 kDa, migra por debajo del marcador de 25kDa. Así mismo se muestra que la mayor cantidad de proteína es producida a la cuarta hora de inducción del cultivo.

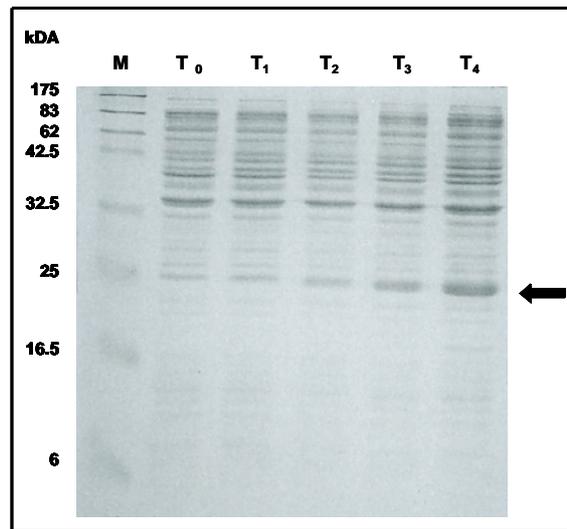


Figura 31. Inducción de la construcción pEEscJ. Carril 1: Cultivo sin inducir carril 2: Cultivo a la primera hora de la inducción, carril 3: Cultivo a la segunda hora de la inducción, carril 4: Cultivo a la tercera hora de la inducción, carril 5: Cultivo a la cuarta hora de la inducción. Con una flecha se marca la proteína inducida. Con una flecha se marca la proteína que producida.

Como se describió con anterioridad, se determinó por medio de geles de poliacrilamida al 15% la localización de la proteína en el lisado celular. Se observa en la figura 32 que la proteína His-EscJ producida forma cuerpos de inclusión. Adicionalmente se hizo una inmunodetección con anticuerpos específicos para la etiqueta de histidinas para comprobar que fuera la proteína de interés y determinar la cantidad presente en la fracción soluble. En la figura 32 B se observa que casi la totalidad de la proteína de interés se encuentra en la fracción insoluble, por lo cual se decidió purificarla a partir de esta fracción.

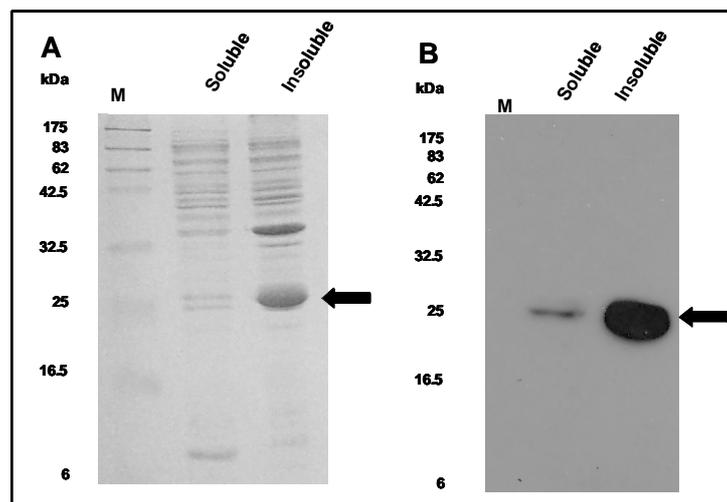


Figura 32. Localización celular de la proteína His-EscJ. A) Carril 1: Fracción soluble, carril 2: Fracción insoluble; B) Western blot con anticuerpos anti-His. Carril 1: Fracción soluble, carril 2: fracción insoluble. Con una flecha se marca la proteína His-EscJ.

A partir de un cultivo de 500ml se purificó por cromatografía de afinidad a la proteína His-EscJ de la fracción insoluble en condiciones desnaturizantes. En la figura 33 se

observa que en las diferentes eluciones la proteína de interés forma la fracción mayoritaria, por lo que éstas se juntaron, concentraron y dializaron como se describió anteriormente.

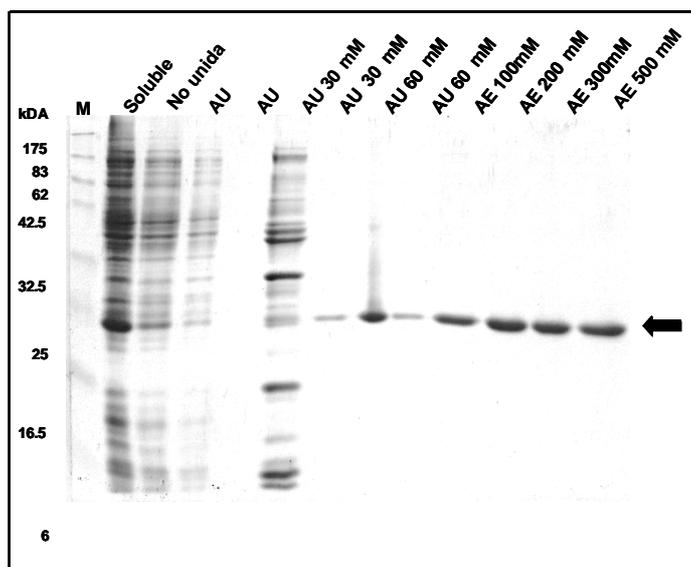


Figura 33. Purificación de la proteína His-EscJ en condiciones desnaturalizantes. Carril 1: Lisado celular, carril 2: Fracción no unida a la columna, carril 3 y 4: Prelavado con amortiguador de elución con 6M urea, carril 5 y 6: Lavado con amortiguador de unión con 6M de urea y 30mM imidazol, carril 7 y 8: Lavado con amortiguador de unión con 6M de urea y 60mM imidazol, carril 8-12: Elución de la proteína His-EscJ con concentraciones crecientes de imidazol (100, 200,300 y 500mM). Con una flecha se marca a la proteína His-EscJ purificada.

La proteína EscJ obtenida fue renaturalizada e inyectada a un conejo New Zealand White utilizando el mismo esquema que se utilizó para la obtención de anticuerpos específicos para la proteína EspA. Este esquema de inmunización aún no ha sido completado.

4.9 Análisis bioinformático de la secuencia de la proteína EscJ.

El gen *escJ* codifica a una proteína de 190 aminoácidos. Por medio de los programas computacionales Lipo P 1.0 y Prosite se determinó que los primeros 19 aminoácidos comprenden una secuencia señal, por lo que la proteína EscJ madura tiene una masa de 18647 Da.

Los homólogos de la proteína EscJ poseen dos dominios: un péptido señal de lipoproteína en el extremo amino terminal, en donde tienen un sitio de corte consenso (Leu-(Ala/Ser)-(Gly/Ala)-Cys) que es específicamente reconocido por la peptidasa de señal II. Además en el extremo carboxilo terminal tienen una región de entre 20-30 aminoácidos hidrofóbicos seguida de residuos básicos.

El análisis de la secuencia de la proteína EscJ reveló que ésta, a diferencia del resto de las lipoproteínas de la familia YscJ/PrgK que cuentan con un sitio de corte (Leu-(Ala/Ser)-

(Gly/Ala)-Cys), posee un sitio de corte alternativo (Thr-Val-Ala-Cys), el cual también se predice que es reconocido por la peptidasa de señal II. Este mismo análisis predijo la localización periplásmica de dicha proteína, lo cual concuerda con lo reportado por Yip y colaboradores en 2005.

No se pudo detectar ningún dominio transmembranal en el extremo carboxilo, lo cual también concuerda con lo reportado por Yip y colaboradores (2005), quienes sugieren que dicha proteína se une a la membrana interna con su extremo amino terminal acilado, formando un anillo periplásmico.

V. DISCUSIÓN.

Los SST3 son “maquinarias macromoleculares” complejas, que están conformadas por más de 20 proteínas diferentes. Un porcentaje significativo de éstas funciona en asociación con moléculas acompañantes (chaperonas), y forman grandes complejos al interactuar con otros componentes o con ellas mismas formando homopolímeros. En una etapa previa al ensamblaje del sistema secretor, cada una de las subunidades de cada proteína debe de ser reconocida específicamente por el aparato secretor y transportada a su punto de incorporación dentro de la estructura en crecimiento (Crepin *et. al.*, 2005). Muchas de estas proteínas estructurales están ampliamente conservadas entre los diferentes SST3 de virulencia y también con el sistema flagelar, lo que da lugar a una estructura global del sistema de transporte también conservada. Sin embargo varios de estos componentes han sido poco estudiados, por lo que las características estructurales en detalle y la organización molecular del SST3 siguen sin entenderse por completo (Yip *et. al.*, 2005). En este sentido, el objetivo de nuestro grupo de trabajo es el de entender cómo se lleva a cabo la biogénesis del injectisoma de EPEC y la secreción de efectores de virulencia a través de éste.

Como se describió en la introducción, el correcto funcionamiento del SST3 involucra la participación de múltiples proteínas, y debido a que, en algunos casos, ha sido posible deducir el papel que juega una proteína de función desconocida si ésta interactúa con otra de función conocida, se ha prestado especial atención a los estudios de interacción proteína-proteína (Golemis, 2002). De esta forma, el uso de ensayos de interacción proteica ha favorecido de forma crítica el avance que la caracterización del SST3 ha tenido en los últimos años.

Las interacciones entre proteínas pueden ser evaluadas mediante diferentes métodos como la resonancia magnética nuclear, la cristalografía de rayos X, el sistema de doble híbrido y la coimmunoprecipitación, entre otros. Diversos métodos de caracterización de interacciones proteína-proteína se han apoyado en el uso de inmunoglobulinas. En los últimos años los métodos inmunológicos para la identificación de interacciones han servido como herramientas poderosas e indispensables dentro de la biología celular, la bioquímica y la biología molecular. La creciente importancia de las inmunoglobulinas en la investigación puede deducirse por el porcentaje de artículos publicados en los que se utilizan anticuerpos para resolver problemas que sería difícil o imposible resolver con el uso de otros métodos (Drenckhahn *et. al.*, 1993).

Las técnicas inmunológicas tienen un amplio espectro de aplicaciones debido a su alta especificidad y sensibilidad, lo que permite la detección selectiva, aislamiento y cuantificación de moléculas hasta el nivel de picogramos (Drenckhahn *et. al.*, 1993).

Dentro de las inmunoglobulinas empleadas se ha visto favorecido el uso de los anticuerpos policlonales debido a que su generación es simple, rápida y poco costosa. Estos anticuerpos se pueden utilizar tanto para inmunolocalización, inmunodetección, inmunoréplica de afinidad, inmunoprecipitación o ensayos de inmunoabsorbencia (Drenckhahn *et. al.*, 1993).

Por otro lado, el SST3 de EPEC y EHEC es único al poseer una extensión hueca y filamentosa de la aguja, llamada filamento EspA. Se piensa que la existencia de dicha estructura adicional obedece al hecho de que estos microorganismos son patógenos extracelulares. EspA es una proteína translocadora y estructural que forma el canal que se requiere para la translocación del receptor Tir y los efectores, la subversión de las cascadas de transducción de señales en la célula hospedera y finalmente la formación de la lesión A/E. Debido a su papel central en la patogénesis de EPEC, el filamento EspA ha sido una de las estructuras del sistema que mejor se han descrito. También se han identificado interacciones con las proteínas EspB (Hartland *et. al.*, 2000) y EspD (Daniell *et. al.*, 2001), que forman el poro de translocación y con ella misma a través de interacciones de tipo *coiled coil* (Delahay *et. al.*, 1999). Por medio de análisis bioinformáticos se reveló que el extremo carboxilo terminal de EspA es homólogo a numerosas flagelinas incluyendo la flagelina de *Salmonella*. El extremo carboxilo terminal de EspA corresponde al carboxilo terminal del dominio D1 (CD1) de la flagelina, por lo que se piensa que la proteína EspA carece del dominio D0. En el filamento flagelar el dominio D0 de la flagelina forma la parte interna del “cilindro”, mientras que el dominio D1 se localiza hacia la parte externa de dicha estructura helicoidal. A pesar de que las interacciones establecidas por el dominio D0 son importantes para la estabilidad del filamento, flagelinas mutantes que carecen de éste pueden ensamblar un filamento con una estructura distinta a la nativa denominada Lt, por lo que se piensa que el filamento EspA tiene una estructura similar a la Lt. La proteína EspA además carece del dominio D3, el cual es altamente variable dentro de las flagelinas y no es esencial para la formación del filamento en *Salmonella*. Yip y colaboradores en 2005 observaron que la proteína EspA contiene un dominio tipo *coiled-coil* en el extremo amino terminal además del que posee en el extremo carboxilo terminal. Esta observación ha generado dos modelos de ensamblaje del filamento EspA. En el primero EspA funciona

como una “mini flagelina” en la que los dos dominios tipo *coiled coil* median la interacción entre subunidades, de manera similar a la encontrada en los monómeros de flagelina. En el segundo modelo se propone que EspA funciona como “media flagelina” dimerizándose con la ayuda de sus dominios tipo *coiled-coil* y posteriormente el dímero, al igual que la flagelina, se polimeriza a través de interacciones hidrofóbicas. Debido a la falta de evidencia experimental aún se desconoce el mecanismo preciso de ensamblaje del filamento EspA (Pallen *et. al.*, 2005).

En este trabajo, se purificó la proteína recombinante EspA en condiciones nativas (Figura 24) con un rendimiento de 800 µg por litro de cultivo, el cual fue suficiente para la inoculación de ésta en un conejo y la generación de anticuerpos específicos para la misma. Debido a que es frecuente que durante la generación de anticuerpos policlonales el suero reaccione con más de una proteína y la razón más común es la contaminación del inmunógeno con otras proteínas, se recomienda que la pureza de la muestra a inocular sea alta (Drenckhahn *et. al.*, 1993). Con este fin, se empleó una matriz de agarosa acoplada a níquel, la cual une covalentemente a la etiqueta de histidinas que se insertó en el extremo amino terminal de las proteínas al clonaras en el vector pET19b, lo que permite que otras proteínas con poca afinidad a la matriz sean eluidas con bajas concentraciones de imidazol. A pesar de esto, y de las diferentes condiciones empleadas no se pudo obtener una pureza del 100% para las proteínas de interés. Es posible que las proteínas contaminantes tengan residuos de histidina cercanos a su superficie, por lo que fueron afines a la resina, se unieron fuertemente a la matriz y persistieron a los lavados y eluciones con concentraciones crecientes de imidazol. También existía la posibilidad de que estas proteínas contaminantes interactúen con las proteínas etiquetadas.

Con el fin de mejorar la pureza de las proteínas de interés para este trabajo sería conveniente aumentar la concentración de imidazol en los amortiguadores de lavado para que las proteínas con menor afinidad por la resina se liberen de la columna. Por otra parte, el volumen de agarosa acoplada a níquel y la capacidad total de unión debe de establecerse de acuerdo con la cantidad de proteína que se desee purificar. Debido a que las proteínas con una etiqueta de histidinas son más afines a la resina que aquellas proteínas del lisado celular con residuos de histidina en su superficie, se espera que muy pocas de estas últimas sean retenidas en la matriz si todos los sitios de unión son ocupados por la proteína con etiqueta. Si se ocupa mucha agarosa acoplada a níquel es posible que se le unan proteínas en los sitios libres. También existía la posibilidad de que las proteínas “contaminantes”

fueran productos de la oligomerización de las proteínas de interés; sin embargo ésta se eliminó al hacer una inmunodetección tipo Western blot utilizando anticuerpos anti-histidinas y solo detectar a la proteína de interés.

En el caso de la purificación de la proteína His-EspA se observan 4 proteínas minoritarias (Figura 24). La proteína que migra por debajo de His-EspA resultó altamente inmunogénica, lo que concuerda con lo encontrado en la literatura en donde se ha visto que la fuerza de la respuesta inmune no depende necesariamente de la dosis del antígeno ya que es posible que un contaminante menor sea un fuerte inmunógeno produciendo anticuerpos altamente específicos (Drenckhahn *et. al.*, 1993). Al probar la especificidad y reactividad del suero se encontró que éste reconocía a la proteína EspA y a la contaminante de aproximadamente 20kDa, por lo que se hicieron diluciones del mismo hasta que se encontró que utilizando una dilución de 1:55,000 ya no se reconocía a la proteína contaminante de 20kDa. A pesar de esto, se encontraron las condiciones en las que el anticuerpo EspA reconoce una sola banda en un lisado celular de EPEC, por lo que los anticuerpos serán útiles en la caracterización de la biogénesis del SST3 y en el hallazgo de interacciones de la proteína EspA con otros componentes del SST3 de EPEC.

Uno de los objetivos del laboratorio es la identificación de interacciones entre complejos efector-chaperona con componentes del aparato secretor del SST3. En *S. enterica* se ha propuesto que la ATPasa InvC tiene un papel central en el reconocimiento de los sustratos. Al pertenecer a la familia de ATPasas AAA+, ésta induce cambios conformacionales en las proteínas a secretar permitiendo la liberación de las chaperonas en una forma dependiente de ATP. Se ha observado que la ATPasa es uno de los componentes más conservados del SST3 por lo que se piensa que la ATPasa de EPEC se puede comportar de manera similar. La obtención de anticuerpos específicos para la proteína EspA será de gran utilidad para la identificación de la interacción del complejo EspA-CesAB por una parte, y de éste con la ATPasa EscN la cual también está siendo caracterizada en nuestro laboratorio. Esta interacción se va a estudiar mediante el uso de diferentes metodologías como ensayos de copurificación por cromatografía de afinidad y por inmunoréplica de afinidad.

Utilizando la técnica de copurificación, la proteína recombinante His-EspA se puede co-producir junto con diferentes productos génicos a evaluar. El experimento se puede hacer por co-expresión de ambos genes en la misma célula, utilizando plásmidos compatibles, o por la mezcla de lisados celulares, o de éstos con proteínas recombinantes

puras. Las proteínas se copurifican por medio de cromatografía de afinidad en columnas de agarosa acoplada a níquel o a glutatión dependiendo de la etiqueta utilizada en la proteína recombinante. Las proteínas retenidas en la columna se eluyen y se analizan en geles de poliacrilamida-SDS, o por inmunodetección utilizando anticuerpos anti-EspA.

Para la inmunoréplica de afinidad, las proteínas recombinantes purificadas se separan por electroforesis en geles de poliacrilamida, y se transfieren a membranas de nitrocelulosa, las cuales se incuban en presencia de la segunda proteína (EspA). La inmunodetección se realiza utilizando anticuerpos anti-EspA y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano, lo que identificará si la proteína EspA es capaz de interactuar con la proteína renaturalizada en la membrana (Minamino y Macnab, 2000).

Por otra parte, Kenny y colaboradores en 1997 describieron cómo la regulación de los genes asociados con la virulencia de EPEC está relacionada con las condiciones del medio externo. En condiciones de laboratorio la secreción de proteínas translocadoras y efectoras por EPEC está determinada por el medio de cultivo, el pH y la temperatura en que las bacterias son crecidas. En medio DMEM pH 6.3-7.6 y temperatura de 36°C, la cepa silvestre secreta grandes cantidades de estas proteínas, debido a que dichas condiciones pueden ser similares a las que EPEC, encontraría en el intestino delgado. Gracias a que se conoce el perfil de secreción de las cepas silvestres de EPEC es posible caracterizar componentes específicos del inyectisoma al comparar el perfil de secreción de una cepa mutante en el componente a analizar con el de una cepa silvestre. Knutton y colaboradores en 1998 observaron que al crecer células silvestres de EPEC en medio DMEM, la presencia de filamentos EspA correlacionó con los niveles altos de la proteína EspA en el sobrenadante de un cultivo crecido hasta fase exponencial media, lo que hace que la proteína EspA sea un buen indicador de que la maquinaria de translocación es funcional. El tener anticuerpos específicos para esta proteína será una herramienta importante en la caracterización de mutantes y su efecto en la secreción y expresión de proteínas.

Como se ha mencionado, el ensamblaje del sistema continúa siendo objeto de estudio y un ejemplo de los recientes avances que se están dando en esta dirección es el de la cristalización de la proteína EscJ que forma el anillo interno. Anteriormente se pensaba que la proteína EscJ era el componente principal del eje interno en EPEC (Crepin *et. al.*, 2005), hasta que con la determinación de su estructura atómica y el uso de modelaje molecular se demostró que esta proteína forma un anillo periplásmico de 24 subunidades que puede servir como una plataforma para el inicio del ensamblaje del eje interno, el cual por

predicciones bioinformáticas se sabe que en EPEC podría estar compuesto por la proteína EscI (Pallen *et. al.*, 2005).

Se ha propuesto que el anillo EscJ puede interactuar con componentes transmembranales como los que forman parte del aparato secretor EscR, EscS, EscT, EscU y EscV (Yip *et. al.*, 2005). Sin embargo, estas interacciones se evaluaron por medio del sistema de doble híbrido en levadura sin detectarse alguna, lo que posiblemente se debió a que las condiciones del ensayo no propiciaron el correcto plegamiento o que se necesitan condiciones específicas para que éstas se den (Creasey *et. al.*, 2003). Se han descubierto interacciones entre homólogos de EscJ y otros componentes del SST3. En *Shigella* MxiJ (homóloga de EscJ de EPEC) interactúa con la proteína de membrana externa MxiD (homóloga de la secretina EscC de EPEC) (Crepin *et. al.*, 2005).

En este trabajo se purificó la proteína recombinante His-EscJ a partir de la fracción insoluble, probablemente a partir de cuerpos de inclusión, con un rendimiento de 1.5 mg por litro de cultivo. Se hicieron numerosos intentos por purificar la proteína en condiciones nativas, desafortunadamente no se alcanzó el rendimiento esperado. Esto probablemente estuvo relacionado con la localización de la etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal. Como muestran los resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína EscJ, ésta es exportada al periplasma por medio de la translocasa Sec gracias a que tiene una secuencia señal de lipoproteína en el amino terminal. La mayoría de la proteína permanece en la fracción insoluble del cultivo celular, lo cual era de esperarse dado que EscJ es una proteína asociada a la membrana interna y en estudios cristalográficos publicados por Yip y colaboradores en 2005, se demostró que esta proteína se oligomeriza para formar un anillo periplásmico. Como se muestra en la figura 32 una cantidad importante de la proteína se encuentra en la fracción soluble; sin embargo cuando se realiza una inmunodetección con anticuerpos anti-His sólo se detecta una señal débil. Estos resultados junto con otros datos experimentales obtenidos en el laboratorio, en los que se observa que cuando la producción de la proteína recombinante His-EtgA (transglicosilasa del SST3 de EPEC) se induce en células BL21 no se afecta su crecimiento (datos no mostrados) sugieren que la proteína recombinante His-EscJ no es reconocida por la maquinaria de translocación Sec. Sin embargo cuando las células son lisadas en condiciones nativas, la peptidasa II presente en el periplasma entra en contacto con las proteínas solubles en el citoplasma y remueve la secuencia señal de la proteína y la etiqueta de 10 histidinas del extremo amino terminal, lo que dificultó su purificación por cromatografía de

afinidad. En cambio, cuando se prepara un lisado en condiciones desnaturalizantes, la peptidasa no es funcional, no se remueve el péptido líder y por lo tanto es posible purificar la proteína por este método. Como ya se ha reportado por Creasey y colaboradores (2003) se cree que el plegamiento de EscJ, como el de otras proteínas membranales es importante para su interacción con otros componentes del SST3. Debido a esto último, para purificar la proteína EscJ nativa por el método de cromatografía de afinidad será necesario clonar el gen *escJ* en un vector que introduzca la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal o clonarlo en el vector pET19b sin secuencia señal. La utilización de proteína en condiciones desnaturalizantes como inóculo para la obtención de anticuerpos es recomendable, debido a que se cree que esto puede inducir la respuesta inmune.

La proteína renaturalizada que fue obtenida se está empleando para la inmunización de un conejo y la obtención de suero policlonal que será útil para la caracterización de la estructura de SST3 de EPEC y las interacciones que se dan entre los componentes de este sistema. Esto se realizará por diversos métodos como la inmunorréplica de afinidad descrita con anterioridad. Un componente del sistema que por su localización periplásmica podría estar interactuando con la proteína EscJ es la proteína EtgA, la cual también se está caracterizando en nuestro laboratorio. Esta proteína es una transglicosilasa lítica, que podría ser responsable de romper la red de peptidoglicano en el periplasma de la bacteria, con el fin de permitir el anclaje y ensamblaje eficiente del complejo supramolecular en la envoltura celular (Pallen *et. al.*, 2005). Se propone que para llevar a cabo una lisis localizada de la pared celular, es decir, en el lugar exacto en donde se está formando el SST3, dicha transglicosilasa periplásmica que se exporta vía sistema Sec, debe interactuar con algún componente del SST3, y uno de los candidatos es la proteína EscJ.

VI. CONCLUSIONES.

- Utilizando técnicas de biología molecular se clonaron los genes *espA* y *escJ* de *Escherichia coli* enteropatógena en los vectores pUC18, pET19b y pTrc99a.
- Gracias a que el vector pET19b agrega una etiqueta de 10 histidinas en el extremo amino terminal de las proteínas de interés se pudieron purificar las proteínas recombinantes His-EspA y His- EscJ mediante cromatografía de afinidad.
- Se generaron anticuerpos policlonales específicos para la proteína His-EspA, los cuales fueron capaces de reconocer a la proteína silvestre aún en muestras de lisados celulares.
- Con la proteína recombinante His-EscJ que se obtuvo en este trabajo, se generarán anticuerpos policlonales específicos.

VII. REFERENCIAS.

- Akeda Y. y Galan J. 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion system. *Nature* 437(7060):911-915.
- Blocker A, Jouihri N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, Parsot C, Sansonetti P, y Allaoui A. 2001. Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secreton. *Molecular Microbiology* 39(3):652-63.
- Chen H. y Frankel G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews* 29(1): 83-98.
- Clarke S., Haigh R., Freestone P. y Williams P. 2003. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clinical microbiology reviews* 16(3):365-378.
- Cleary J., Lai L., Shaw R., Straatman-Iwanpwska A., Donnenberg M., Frankel G. y Knutton S. 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Adhesion to Intestinal Epithelial Cells: Role of Bundle-Forming Pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150:527-538.
- Cornelis G. 2006. The type III secretion injectisome. *Nature reviews microbiology* 4(11):811-25.
- Creasey E., Dalahay R., Daniell S. y Frankel G. 2003. Yeast two-hybrid survey of interactions between Lee-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 149: 2093-2106.
- Crepin V., Prasannan S., Shaw R., Wilson R., Creasey E., Abe C., Knutton S., Frankel G. y Matthews S. 2005. Structural and Funtional Studies of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III Needle Complex Protein EscJ. *Molecular icrobiology* 55(66):1658-1670.
- Daniell S, Kocsis E, Morris E, Knutton S, Booy F y Frankel G. 2003. 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 49(2):301-8.
- Dean P., Maresca M. y Kenny B. 2005. EPEC's weapons of mass subversion. *Current Opinion Microbiology* 8(1):28-34.
- Delahay R., Knutton S., Shaw R., Hartland E., Pallen M. y Frankel G. 1999. The coiled coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion tranlocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of biological chemistry* 274(50):35969-35974
- Drenckhahn D., Jöns T. y Shmitz F. 1993. Production of Polyclonal Antibodies against Proteins and Peptides. En: Asai D (Ed.) *Antibodies in cell biology*. Academic Press. Estados Unidos.

Elliot S., Wainwright L., McDaniel T., Jarvis K., Deng Y., Lai L., McNamara B., Donnenberg M. y Kaper J. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Molecular Microbiology* 28:1-4.

Eslava C., Molina J., Villaseca J., Hernández U. y Cravioto A. 2001. *Escherichia coli* patógena causante de infección intestinal. En: Flores Herrera O., Riveros Rosas H., Sosa Peinado A., y Vázquez Contreras E. (eds). Mensaje bioquímico XXV :149-167. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. DF, México.

Garmendia J., Frankel G. y Crepin V. 2005. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: Translocation, translocation, translocation. *Infection and immunity* 73(5):2573-2585.

Galan J. y Wolf-Watz H. 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444(7119):567-573.

González-Pedrajo B. y Dreyfus G. 2003. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. En: Flores Herrera O., Riveros Rosas H., Sosa Peinado A., y Vázquez Contreras E. (Eds). Mensaje Bioquímico, Vol XXVII. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. DF, México.

Giron J., Torres A., Freer E. y Kaper J. 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Molecular Microbiology* 44(2):361-379.

Golemis E., 2002. The Biological Context for the Protein Interaction Studies: Physiological Indicators of Protein-Protein Interaction. En: Golemis E (Ed) Protein-Protein Interactions: a molecular cloning manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos

Goosney D. L., Gruenheid S. y Finlay B. B. 2000. Gut feelings: *E. coli* (EPEC) interactions with the host. *Annual Reviews of Cell Developmental Biology* 16:173-189.

Hartland EL, Daniell SJ, Delahay RM, Neves BC, Wallis T, Shaw RK, Hale C, Knutton S, Frankel G. 2000. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. *Molecular Microbiology* 35(6):1483-92.

Hayward R., Leong J., Koronakis V. y Camperllone K. 2006. *Nature Reviews in Microbiology* 4(5):358-370.

He S., Nomura K. y Whittam T. 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Acta biochimica et biophysica* 1694(1-3):181-206.

Hueck C. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:379-433.

Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H y Krogh A. 2003. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 12(8):1652-62.

Kaper J., Nataro J. y Mobley L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature microbiology reviews*. 2:123-140.

Kenny B., Abe A., Stein M. y Finlay B. B. 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infection and Immunity* 65:2606-2612.

Knutton S., Rosenshine I., Pallen M., Nisan I., Neves B., Bain C., Wolf C., Dougan G. y Frankel G. 1998. A novel EspA-associated Surface Organelle of Enteropathogenic *Escherichia coli* Involved in Protein Translocation into Epithelial Cells. *The EMBO Journal*. 17(8):2166-2176.

Kostakioti, M., Newman, C., Thanassi, D. y Stathopoulos, C. 2005. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *Journal of bacteriology* 187(13):4306-4314

Kubori T., Sukhan A., Aizawa S. y Galan J. 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(18):10225-30.

McDaniel T., Jarvis K., Donnengerg M. y Kaper J. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:1664-1668.

Minamino T. y Macnab R. 2000. Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Molecular Microbiology* 35:1052-1064.

Mota L., Sorg I. y Cornelis G. 2005. Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microbiology letters* 252(1):1-10

Nataro J. P. y Kaper J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(1): 142-201.

Ogino T, Ohno R, Sekiya K, Kuwae A, Matsuzawa T, Nonaka T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S y Abe A. Assembly of the type III secretion apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 188(8):2801-2811.

Pallen M. Beatson S. y Bailey C. 2005. Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type III secretion. *BMC Microbiology*.

Pallen M. y Matzke N. 2006. From The Origin of Species to the Origin of Bacterial Flagella. *Nature microbiology reviews* 4:784-790.

Pizzarro-Cerdá J. y Cossart P. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124(4):715-727.

Puente J. y Finlay B. 2001. Pathogenic *Escherichia coli*. En: Groisman E. A. (Ed.) *Principles of Bacterial Pathogenesis*. Academic Press. Estados Unidos.

Remaut H. y Waksman G. 2004. Structural biology of bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Structural Biology* 14:161-170.

Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C y Abe A. 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20):11638-1643.

Shaw R. K., Cleary J., Murphy M. S., Frankel G. and Knutton S. 2005. Interaction of Enteropathogenic *Escherichia coli* with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. *Infection and Immunity* 73: 1243-1251.

Stephenson K. 2005. Sec-dependent protein translocation across biological membranes: evolutionary conservation of an essential protein transport pathway. *Molecular Membrane Biology* 22:17-28

Tampakaki A., Fadouloglou V., Gazi A., Panopoulos N. y Kokkinidis M. 2004. Conserved features of type III secretion. *Cellular microbiology* 6(9):805-816.

Wales A., Woodward M. y Pearson G. 2005. Attaching-effacing bacteria in animals. *Journal of Comparative Pathology* 132: 1-26.

Yamaguchi F., Yu F. e Inouye M. 1988. A single aminoacid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* 53:423-432.

a. Yip C., Finlay B., Strynadka N. 2005. Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nature structural and molecular biology* 12(1):75-81.

b. Yip C., Kimbrough T., Felise H., Vuckovic M., Thomas N., Pfuetzner R., Frey E., Finlay B., Millers S. y Strynodka N. 2005. Structural Characterization of the Molecular Platform for Type III Secretion System Assembly. *Nature* 435(2):702-707.

APÉNDICE A.

1. Medio de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB)

A 950 ml de agua desionizada agregar:

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de Sodio	5 g
Solución de timina-tiamina 10%	10 ml

- Ajustar el volumen de la solución a 1l con agua desionizada y esterilizar en autoclave durante 20 minutos.
- Para hacer placas de LB se agregan 15 g de agar.

Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

EL medio DMEM se adquirió en GIBCO

Componentes	Molaridad mM
Glicina	0.400
L-Hidrocloruro de arginina	0.398
L-Cisteína 2HCl	0.201
L-Glutamina	4.00
L-Hidrocloruro de histidina	0.200
L-Isoleucina	0.802
L-Leucina	0.802
L-Hidrocloruro de lisina	0.798
L-Metionina	0.201
L-Fenilalanina	0.400
L-Serina	0.400
L-Treonina	0.798
L-Triptofano	0.0784
L-Sal dihidratada de tirosina	0.398
L-Valina	0.803
Cloruro de colina	0.0286
D-pantotenato de calcio	0.00839
Ácido fólico	0.00907
i-Inositol	0.0400
Niacinamida	0.0328
Hidrocloruro de piridoxina	0.0196
Riboflavina	0.00106
Hidrocloruro de Tiamina	0.0119
Cloruro de calcio	1.80
Nitrato férrico	0.000248
Sulfato de magnesio	0.814
Cloruro de potasio	5.33
Cloruro de sodio	110.34
Fosfato de sodio monobásico	0.906
D-Glucosa	25.00
Rojo fenol	0.039

- El contenido de un sobre se disolvió en 800 ml de agua desionizada y una vez disueltos los componentes se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, se ajusta el pH a 7.1 con HCl, se afora a un litro y se esteriliza por filtración con un filtro de nitrocelulosa de 0.22 μm .

2. Soluciones madre.

	Concentración	Almacenamiento	Esterilización
Ampicilina	50mg/ml en agua	-20°C	Filtración
Cloranfenicol	25mg/ml en agua	-20°C	Filtración
Estreptomicina	10 mg/ml. en agua	-20°C	Filtración
Tetraciclina	25 mg/ml en etanol	-20°C	Filtración y almacenaje en recipientes no translúcidos
Bromuro de etidio	10mg/ml en TAE	Temperatura ambiente	
Cloruro de calcio	100mM/en agua	4°C	En autoclave 20 minutos
IPTG	100mM/en agua	-20°C	Filtración
Azul de Coomassie	0.2%/en metanol	Temperatura ambiente	

3. Amortiguadores

TAE (Tris-acetate-EDTA)

Tris 40 mM

EDTA 1 mM

Ácido acético glacial 1.2%

- Almacenar a temperatura ambiente.

BB (Binding Buffer)

Fosfato de sodio 20 mM

Cloruro de Sodio 500 mM

- Almacenar a 4°C.

PBS (Phosphate-buffered saline)

Cloruro de Sodio 137 mM

Cloruro de Potasio 2.7 mM

Fosfato dibásico de sodio hidratado 10 mM

Fosfato de potasio monobásico hidratado 2 mM

- Ajustar el pH a 7.4 y esterilizar en autoclave por 20 minutos. Almacenar a 4°C.

Amortiguador de unión (AU) 6M urea

CaCl₂ 2mM

Tris pH 8 20mM

NaCl 0.5M

Urea 6M

- Almacenar a 4°C

Amortiguador de lavado(AL) 6M de urea 30 y 60mM de imidazol

CaCl₂ 2mM
Tris pH 8 20mM
NaCl 0.5M
Urea 6M
Imidazol 30 ó 60mM

- Almacenar a 4°C

Amortiguador de elución (AE)

CaCl₂ 0.1M
Tris pH 8 1M
NaCl 0.5M
Glicerol 20%
Imidazol 100-500mM

- Almacenar a 4°C

Amortiguador de diálisis

Tris pH 8 50mM
DTT 0.2mM
Glicerol 10%

- Almacenar a 4°C

Amortiguador de transferencia

Tris 20 mM
Glicina 150 mM
Metanol 20%

- Almacenar a 4°C.

TBS 1X(Tris-buffered saline)

Tris 20 mM
Cloruro de sodio 150 mM

- Ajustar el pH a 7.4 y esterilizar en autoclave por 20 minutos. Almacenar a 4°C.

TBS-Tween (TBS-T)

Tris 20 mM
Cloruro de sodio 150 mM
Tween-20 0.3%

- Almacenar a 4°C.

Solución bloqueadora

TBS 10X 10%

Tween-20 0.3%
Lecha descremada 25%

- Preparar en el momento. Puede guardarse a 4°C durante una semana.

Amortiguador de corrida 4X

Tris-HCL pH 6.8 0.5 M
SDS 8%
Azul de Bromofenol 0.4%
Glicerol 40%

- Almacenar a 37°C.

Amortiguador de carga SDS 4X

Tris-HCL pH 8 200 mM
SDS 8%

- Almacenar a temperatura ambiente.

Solución para desteñir.

Metanol 5%
Ácido acético 7%

- Almacenar a temperatura ambiente.

Solución de secado.

Metanol 10%
Glicerol 4%

- Almacenar a temperatura ambiente.

APÉNDICE B.

1. Preparación de geles de agarosa.

- Ensamblar la cámara de electroforesis
- Preparar un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X, vaciarlo, colocar el peine y esperar a que polimerice.
- Las muestras se corren a 100 volts en amortiguador TAE 1X

2. Preparación de plásmidos con el Kit QIAaprep de Qiagen.

- Hacer una pastilla de células con un precultivo (4 ml de medio LB incubando toda la noche a 37°C en agitación con antibióticos para los cuales sea resistente la cepa) centrifugando 2 minutos a 13000 rpm sucesivamente.
- Resuspender la pastilla en 250µl de amortiguador P1.
- Agregar 250 µl de amortiguador P2 y mezclar suavemente.
- Agregar 350 µl de amortiguador N3 e invertir el tubo una vez.
- Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm
- Agregar el sobrenadante a una columna QIAprep.
- Centrifugar por 1 minuto y desechar el sobrenadante.
- Lavar la columna con 500µl de amortiguador PB y centrifugar por 1 minuto. Desechar el sobrenadante.
- Lavar la columna con 750 µl de amortiguador PE y centrifugar durante 1 minuto.
- Deschar el sobrenadante y centrifugar 1 minuto adicional para eliminar los restos de amortiguador.
- Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml. Para eluir el DNA agregar 50 µl de amortiguador EB al centro de la columna, incubar un minuto y después centrifugar 1 minuto.

3. Purificación de DNA utilizando el Kit de extracción en gel QIAquick de Qiagen

- Cortar el fragmento de DNA de un gel de agarosa con una navaja nueva.
- Pesar el fragmento a un tubo de microcentrífuga. Añadir 3 volúmenes de amortiguador QG por cada volumen de gel (100mg-100µl).
- Incubar a 50°C durante 10 minutos. Para disolver el gel, mezclar con vortex cada 2-3 minutos durante la incubación. El color de la mezcla debe ser amarillo.
- Agregar un volumen de isopropanol a la muestra y mezclar.
- Colocar una columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 2ml.
- Agregar la muestra a la columna y centrifugar un minuto para que el DNA se adhiera a la columna.
- Desechar el sobrenadante y volver a colocar la columna en el mismo tubo.
- Para eliminar los restos de agarosa de la columna agregar 500 µl de amortiguador QG y centrifugar durante 1 minuto a 13,000 rpm.
- Lavar la columna con 750 µl de amortiguador PE y centrifugar durante 1 minuto.
- Desechar el sobrenadante y centrifugar a 13,000 rpm la columna por un minuto adicional.
- Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml.

- Para eluir el DNA agregar 50µl de amortiguador EB al centro de la columna, incubar durante un minuto y centrifugar durante 1 minuto.

4. Preparación de geles de poliacrilamida 15%

- Ensamblar la cámara de electroforesis.
- Preparar gel separador, vaciarlo en la cámara y esperar a que solidifique (aproximadamente 40 minutos).
- Preparar el gel concentrador, vaciarlo en la cámara, colocar el peine y esperar a que se solidifique (aproximadamente 40 minutos).
- Las muestras se corren a 90 voltz en amortiguador SDS 1X.

Gel separador

Acrilamida 30%	15 ml
Amortiguador inferior	7.5 ml
Persulfato de amonio 10%	300 µl
TEMED	12 µl
Agua	7.2 ml

Gel concentrador

Acrilamida 30%	3 ml
Amortiguador superior	5 ml
Persulfato de amonio 10%	200 µl
TEMED	20 µl
Agua	11.8 ml

5. Preparación de células competentes con CaCl₂.

- Preparar un cultivo a partir de una colonia aislada de la cepa deseada en 2ml de medio LB a 37°C con agitación durante 16 horas.
- Inocular 30ml de medio LB con 3ml del precultivo. Incubar a 37°C con agitación hasta que se alcance una DO₅₅₀ entre 0.3 y 0.5.
- Centrifugar a 7649.2 x g durante 5' a 4°C.
- Desechar el sobrenadante y agregar 30ml de CaCl₂ 0.1M frío. Incubar 40' en hielo a 4°C.
- Centrifugar como antes se describió.
- Resuspender con cuidado en 2ml de CaCl₂ 0.1M.

6. Transformación de *E. coli*.

- Agregar toda una reacción de ligación (15, 20, o 30 µl según el caso) a 200µl de células competentes.
- Incubar con el DNA 2.5 horas en hielo a 4°C.
- Dar un choque térmico a 42°C 2' e incubar en hielo durante 3'.
- Recuperar las células con 800µl de medio LB durante una hora a 37°C con agitación.
- Platear en placas de LB sólido con ampicilina para poder seleccionar las células transformantes.

Cuando se transformó DNA plasmídico se agregaron 5 μ l a las células competentes y no hubo necesidad de recuperarlas, se platearon de inmediato.