



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL
DE SepD EN *Escherichia coli*
ENTEROPATÓGENA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

FABIAN HUESCA ALATORRE



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTOR:
DR. ALEJANDRO HUERTA SAQUERO
2009



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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el laboratorio de los doctores José Luis Puente García y Edmundo Calva Mercado, bajo la asesoría del Dr. Alejandro Huerta Saquero.

Durante el desarrollo del trabajo, recibí un apoyo económico por parte del Dr. José Luis Puente García.

<p>1. Datos del autor Huesca Alatorre Fabian 56 63 04 07 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias 4-5053395</p>
<p>2. Datos del tutor Dr Alejandro Huerta Saquero</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr Bertha González Pedrajo</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 M en C Gustavo Jesus Ortega Lule</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Lic Viviana Escobar Sánchez</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dr Ricardo Oropeza Navarro</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Caracterización funcional de SepD en <i>Escherichia coli</i> enteropatógena 57 p 2009</p>

Índice	Página
Lista de abreviaturas	iv
Resumen	v
Abstract	vi
Introducción	1
1. <i>Escherichia coli</i>	1
2. <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	1
3. Islas de patogenicidad	3
4. Organización de la isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement)	4
5. El sistema de secreción codificado en LEE	5
Antecedentes	7
Justificación	11
Objetivos	11
Materiales y métodos	12
• Cepas y plásmidos	12
• Condiciones de crecimiento de <i>E. coli</i>	16
• Purificación de ADN de plásmido y ADN en geles de agarosa	16
• Electroforesis en gel de agarosa	16
• PCR	16
• Mutación por PCR sobrepuesto	17
• Digestión con enzimas de restricción	18
• Ligación	19
• Secuenciación	19
• Preparación de células electrocompetentes	20
• Transformación	21
• Etiquetado cromosomal	21
• Inducción de la expresión de proteínas	21
• Coexpresión de proteínas	22
• Cinética de expresión proteica	22
• Sonicación	22
• Pulldown y copurificación	23
• Obtención de proteínas secretadas por EPEC	23
• SDS-PAGE	24
• Transferencia a una membrana de nitrocelulosa o PVDF	25

• Inmunodetección (Western blot)	25
• Cuantificación de la actividad de CAT (Cloranfenicol acetil-transferasa)	26
Resultados	28
<i>Construcción de las mutantes de SepD</i>	28
<i>Fenotipo de las proteínas mutantes de SepD de EPEC</i>	29
<i>Interacción de las mutantes de SepD con SepL</i>	30
<i>SepD interactúa consigo misma</i>	31
<i>La cantidad de Tir se ve afectada en un fondo EPEC ΔsepL o ΔsepD</i>	32
<i>La expresión del operón LEE5, se desregula positivamente en EPEC ΔsepL o ΔsepD</i>	34
Discusión y conclusiones	36
Perspectivas	41
Referencias	43
Anexos	46

Lista de abreviaturas

°C: grados centígrados

µl: microlitros

A/E: adherencia y destrucción (attaching and effacing)

aa: aminoácido(s)

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ap: ampicilina

BFP: pili formador de la agregación (bundle forming pilli)

Cm: cloranfenicol

DMEM: Medio Eagle Modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DO: densidad óptica

EAF: factor de adherencia de EPEC (EPEC adherence factor)

EHEC: *Escherichia coli* Enterohemorrágica

EPEC: *Escherichia coli* Enteropatógena

esc: genes de secreción de *E. coli* (*E. coli* secretion genes)

Esp: proteína secretada por *E. coli* (*E. coli* secreted protein)

kDa: kilodaltones

Km: kanamicina

kV: kilovolts

LB: Luria- Bertani

LEE: locus de destrucción del enterocito (locus of enterocyte effacement)

mA: miliampere

ml: mililitros

nm: nanómetros

o/n: toda la noche (overnight)

orf: marco de lectura abierto (open reading frame)

Pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

pg: picogramos

^R: resistente

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

Sep: (Secretion of *E. coli* protein)

Sm: estreptomycin

SOC: medio súper óptimo con represión catabólica (Super Optimal broth with Catabolite repression)

SST3: sistema de secreción tipo tres

TCA: ácido tricloro acético

Tir: receptor translocado de intimina (translocated intimin receptor)

V: volts

Resumen

Escherichia coli entoropatógena (EPEC), es un agente etiológico de importancia médica, ya que en países en desarrollo ocasiona diarrea en bebés. EPEC, junto con *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y *Citrobacter rodentium*, forman la familia de los patógenos A/E, que se caracterizan por el tipo de lesión que generan. La lesión A/E (adherencia y destrucción) que ocasionan en los enterocitos, consiste en la destrucción local de las microvellosidades y la posterior formación de pedestales de actina justo debajo de la bacteria, debido a un reacomodo del citoesqueleto de la célula hospedera.

La capacidad de EPEC para generar esta lesión, se encuentra codificada en la isla de patogenicidad denominada LEE. Esta isla codifica para un sistema de secreción tipo tres (SST3), así como para reguladores, chaperonas y proteínas secretadas; LEE contiene un total de 41 marcos de lectura abiertos, de los cuales, la mayoría se encuentran organizados en 5 operones: LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 y LEE5.

Las proteínas secretadas a través de este sistema, se clasifican en 2 grupos: translocadoras y efectoras (armamento bacteriano). Debido a que las proteínas translocadoras son necesarias para la inyección de las proteínas efectoras dentro de la célula hospedera, se asume que los patógenos han desarrollado mecanismos para asegurar que las proteínas translocadoras sean secretadas primero que las efectoras, para así asegurar que las proteínas efectoras no sean secretadas al medio y se desperdicien. En los patógenos A/E este control en la secreción, está principalmente regulado por dos proteínas, SepL y SepD.

Se han realizado estudios con cepas de EPEC que carecen de alguna de estas proteínas ($\Delta sepL$ y $\Delta sepD$), los cuales mostraron que ambas participan en un switch molecular que controla el orden de secreción de proteínas translocadoras y efectoras, pues la ausencia de SepL o SepD se traduce en un aumento en la secreción de proteínas efectoras y una secreción nula de proteínas translocadoras. Por otro lado, mediante ensayos de interacción proteína-proteína, se determinó que SepL era capaz de interactuar con SepD. El objetivo de este trabajo es esclarecer cómo funciona SepD, ya que aunque se ha caracterizado a SepL, SepD no ha sido estudiada. La importancia de estas dos proteínas radica en su aun misteriosa e interesante función de jerarquizadores del SST3 de los patógenos A/E.

Se construyeron 10 proteínas mutantes de SepD con deleciones sucesivas de 15 aminoácidos, con la finalidad de mapear sitios importantes dentro de la proteína, tales como el sitio de interacción con SepL y el sitio de interacción SepD-SepD, mediante ensayos de interacción proteína-proteína (pull-down, copurificación). De la colección de proteínas mutantes, encontramos que los últimos 16 aminoácidos son dispensables para la función de SepD, pues dicha proteína puede complementar a una cepa mutante $\Delta sepD$. Sin embargo, ninguna de las proteínas mutantes de SepD perdió la interacción con SepL. Usando estos ensayos también se determinó que SepD interactúa consigo misma. Mediante ensayos cualitativos, se observó que en ausencia de SepL o SepD, la cantidad de Tir aumenta considerablemente, así como su expresión, cuantificada mediante fusiones transcripcionales.

Abstract

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) is an etiological agent of significant medical importance, since it causes diarrhea in young children in developing countries. EPEC, EHEC (Enterohemorrhagic *E. coli*) and CR (*Citrobacter rodentium*) belong to the A/E pathogens family, characterized by the lesion they generate. The A/E lesion consists in the local destruction of the enterocyte's microvilli and the subsequent formation of actin pedestals underneath the bacteria, as a result of cytoskeleton modification in the host cell.

The ability of A/E pathogens to produce this characteristic phenotype is encoded in a pathogenicity island named locus of enterocyte effacement (LEE). LEE contains 41 ORFs which encodes a type three secretion system (T3SS), as well as regulators, chaperones and secreted proteins. Most of the genes in LEE are arranged in 5 operons: LEE1, LEE2, LEE3, LEE4, and LEE5.

T3SS secreted proteins can be classified in two groups: translocators and effectors. Given that translocators are necessary for an efficient delivery of effectors into the host's cytoplasm, it is therefore assumed that pathogens have developed mechanisms to ensure that the secretion of translocators precedes that of effectors in order to avoid the latter ones from being wasted. In A/E pathogens this regulation of the secretion is known to be controlled by two proteins, SepL and SepD.

Studies on EPEC strains that lack SepL or SepD have shown that both proteins take part in a molecular "switch" that controls the order in which translocators and effectors proteins are secreted; given that their absence causes a deregulation in the secretion, in which effectors secretion is greatly increased and it is accompanied by a null translocators secretion. Other studies have also shown that SepD and SepL interact.

The purpose of this research was to study the function of SepD. Although SepL has previously been characterized little is known on how SepD works. Both proteins are of great importance given the way they regulate the secretion of effectors and translocators.

Ten mutants of SepD were constructed, each one carrying a successive deletion of 15 amino acids. This was done in order to establish a mapping of important regions within the protein, such as SepL's interaction site or the SepD-SepD interaction site. Through protein-protein interaction assays (pull-down, copurification), it appears that the last 16 amino acids are dispensable for SepD function, since that was the only construct able to complement an EPEC $\Delta sepD$. An unexpected finding was that none of the mutant proteins lost its interaction with SepL. Using the same assays, we established that SepD is capable of interacting with itself. We also found that the total amount of Tir was considerably increased on strains lacking SepL or SepD; and this increase was also found to be present at a transcriptional level.

Introducción

1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es la bacteria gram-negativa más abundante en la flora intestinal. Normalmente coloniza la mucosa del colon y presenta un comportamiento de comensalismo (37). Una estructura genómica básica es compartida entre las cepas comensales y las patógenas, que les confiere los mecanismos requeridos para la supervivencia, competencia, reproducción y colonización del intestino. Al genoma base de las cepas patógenas se adicionan genes nuevos, normalmente organizados en islas o agrupamientos, que suelen estar asociados con la virulencia (17).

Las cepas diarreogénicas de *E. coli* están categorizadas en los siguientes patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Cada uno de estos patotipos tiene características distintivas relacionadas con la epidemiología, patogénesis, manifestación clínica y tratamiento. (23) (Figura 1)

2. *Escherichia coli* Enteropatógena

EPEC es un agente etiológico de importancia médica, ya que en países en desarrollo, ocasiona diarrea en niños pequeños (33,43). EPEC, EHEC y *Citrobacter rodentium* (CR), forman un grupo de patógenos conocidos como la familia A/E, la cual se caracteriza por el tipo de lesión histopatológica que genera en la mucosa del intestino humano (EPEC y EHEC) y en el del ratón (CR), que a grandes rasgos, consiste en la destrucción de las microvellosidades, seguido de la formación de pedestales de actina justo debajo de la bacteria, como resultado del reacomodo del citoesqueleto de la célula hospedera (11).

En 1992, Donnenberg y Kaper propusieron el modelo de la patogénesis de EPEC (33). Este se dividió en 3 etapas (Figura 2). A la primera etapa se le denominó adherencia localizada, la cual se caracteriza por una primera adherencia de colonias bacterianas a la mucosa intestinal mediante pilis denominados BFP, los cuales se encuentran codificados en el plásmido EAF, el cual se sabe que codifica entre otras cosas para reguladores de la expresión de la isla LEE (7). No todos los

serotipos de EPEC presentan esta etapa, ya que algunos no poseen el plásmido EAF, por lo que no son capaces de formar agregados bacterianos. Estos serotipos de EPEC, conforman un grupo llamado EPEC Atípica (4343).

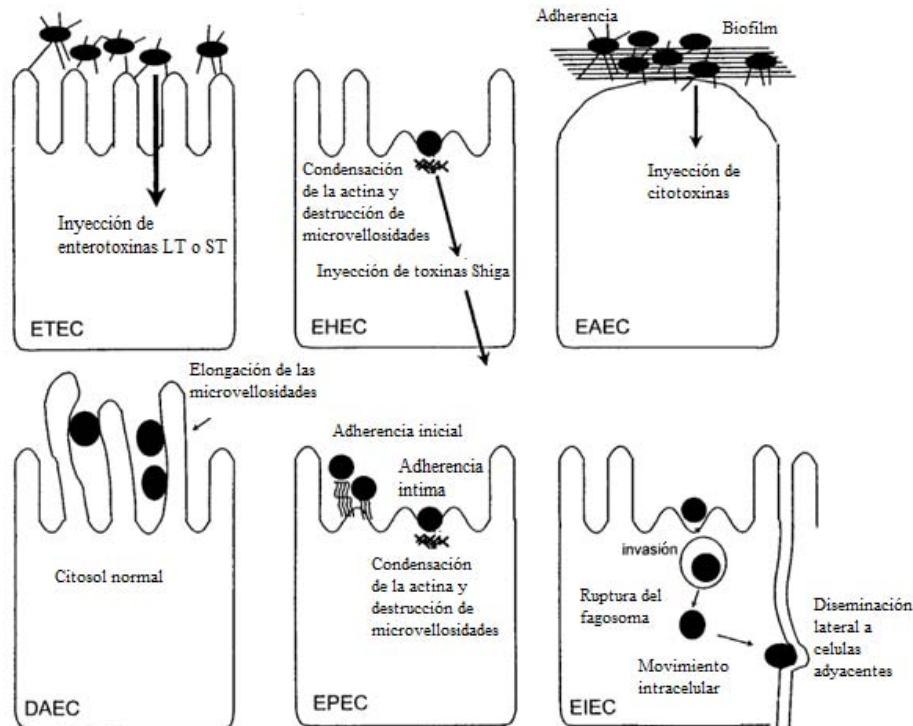


Figura 1. Diferentes tipos de interacciones entre las cepas diarreogénicas de *E. coli* con las células hospederas. (Modificado de 33)

A la segunda etapa se le denominó de transducción de señales. Una vez que la bacteria se adhiere a la célula hospedera, ensambla un sistema de secreción tipo tres (SST3), que se encuentra codificado en la isla de patogenicidad LEE. Con el SST3 la bacteria puede transportar directamente al citoplasma de la célula hospedera, una serie de proteínas (de las cuales hablaré más adelante) que se encargan de modificar y/o afectar el funcionamiento normal de la maquinaria celular. La consecuencia más notable de esto, es la formación de los pedestales de actina debajo de la bacteria (33). Durante esta etapa, una de las proteínas que primero sale por el SST3 cuando está armado completamente, es Tir (32). Esta proteína se inserta en la membrana de la célula hospedera, dejando un dominio extracelular el cual es capaz de interactuar con intimina, mientras que los dominios internos, el extremo amino y el carboxilo, son capaces de interactuar con una variedad de proteínas celulares, entre ellas la actina. (33)

A la tercera y última etapa, se le denominó de adherencia íntima. En ésta, EPEC termina de adherirse a la célula hospedera, esto lo logra mediante la interacción de dos proteínas, Tir e intimina, ambas codificadas en LEE (30).

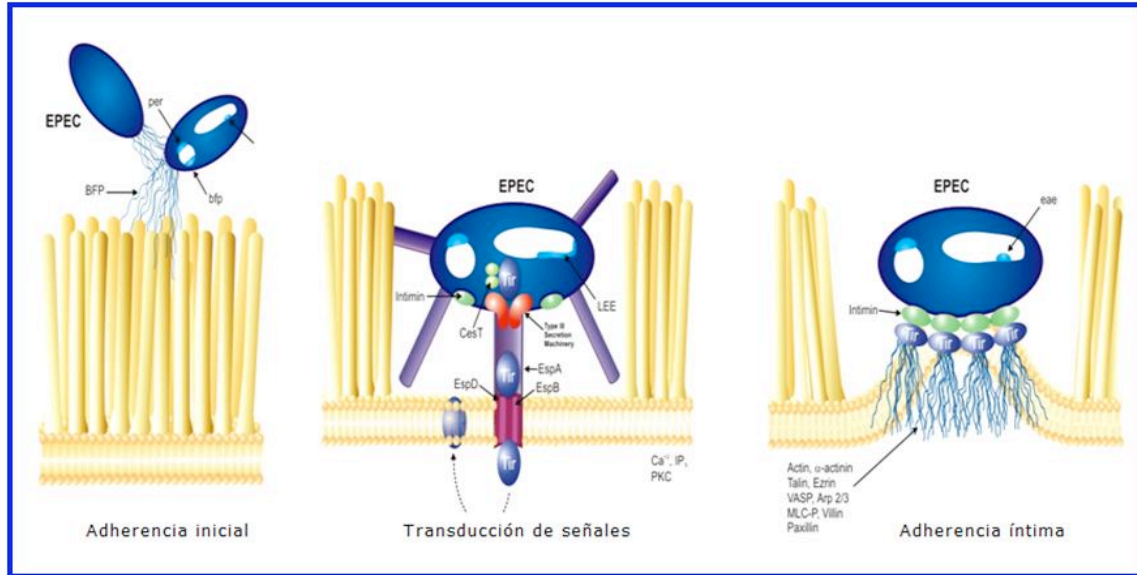


Figura 2. Las tres etapas de la infección ocasionada por EPEC. (18)

3. Las islas de patogenicidad

Aunque se han descrito diferentes compuestos potencialmente tóxicos, que pueden ser producidos por una cepa de *E. coli* comensal (22), la capacidad virulenta en la familia A/E se debe principalmente a la adquisición de la isla de patogenicidad LEE. Este fenómeno de adquisición de material genético por transferencia horizontal es muy común en las bacterias, ya que puede significar herramientas novedosas para explotar un nicho nuevo, nuevas rutas metabólicas que le permitan aprovechar compuestos que anteriormente no podían o resistencia a antibióticos (42).

Se ha demostrado que las estructuras cromosomales como las islas de patogenicidad, contribuyen ampliamente a la evolución de los patógenos bacterianos, pues generan grandes y dinámicos cambios en el genoma bacteriano. Se han propuesto varios mecanismos por los que las islas de patogenicidad son transferidas entre las especies bacterianas, algunos de estos son transferencia por fagos, movilización por transposones o por plásmidos (38).

Las islas de patogenicidad normalmente tienen características que las diferencian del resto del genoma: contienen uno o más genes asociados con virulencia; su proporción de G-C así como el uso de codones difieren del resto del genoma base; normalmente existen secuencias adyacentes de un gen de ARNt y en muchos casos por secuencias repetidas directas; comúnmente poseen factores involucrados en la movilidad genética, como son las integrasas, transposones, genes de fagos y orígenes de replicación (15).

4. Organización de la isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement)

La isla LEE físicamente comparte muchos de los genes y su arreglo entre los patógenos de la familia A/E. En específico, LEE de EPEC, contiene un total de 41 marcos de lectura abiertos, los cuales se organizan principalmente en 5 operones, denominados LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 y LEE5. Otro operón de importancia es el *grlRA*. (Figura 3)

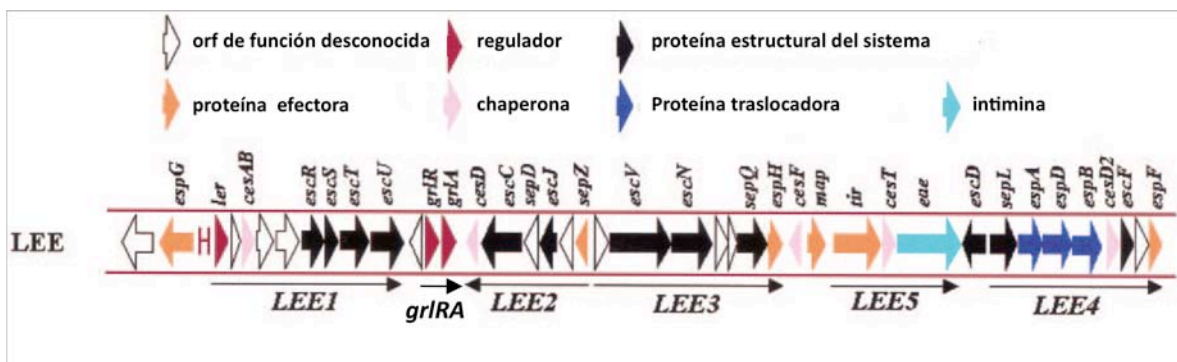


Figura 3. Organización de la isla LEE en EPEC. (Modificado de 17).

La expresión de la isla es controlada por el activador maestro que se encuentra codificado en el operón LEE1 y se denomina Ler (LEE-encoded regulator), por un activador secundario codificado en el operón *grlRA*, denominado GrlA (Global-regulator of LEE activator), por un represor codificado en el mismo operón, denominado GrlR (Global-regulator of LEE repressor) y por el regulador negativo global, HNS. Aunque estos 4 reguladores son los principales, también actúan sobre la expresión de la isla otros reguladores codificados fuera de LEE como PerC, LexA, Fis, etc. Esto da como resultado una compleja red de regulación (31).

5. El sistema de secreción codificado en LEE.

Los sistemas de secreción, son mecanismos que las bacterias han desarrollado para transportar compuestos a través de membranas, ya sean las suyas o las de otro organismo. Hasta este punto, se han descubierto 6 tipos de sistemas de secreción, y aunque su complejidad estructural puede variar, todos utilizan al menos un péptido para construir un camino intermembranal (14).

Además de los reguladores, LEE codifica para proteínas que sirven para ensamblar un SST3, aunque aún no se sabe con certeza el orden y la composición del mismo. Se sabe que en EHEC está compuesto de un anillo de membrana interna formado por EscD, EscL, EscJ EscN (ATPasa), EscQ, EscR, EscS, EscT, EscU, EscV; la parte que conecta el anillo interno con el externo está formado por EscI; el anillo de membrana externa está formado por EscC; por último, EscF forma la parte que da al exterior de la célula (aguja). (1, 35) (Figura 4).

Por último, LEE codifica para algunas de las proteínas que son secretadas a través del SST3, estas se clasifican en dos tipos, dependiendo de su función, translocadoras y efectoras. Las proteínas translocadoras, se van a encargar de formar un filamento (EspA) que se ensambla a partir del extremo distal de la aguja (EscF) y un anillo en la membrana de la célula hospedera (EspB y EspD); éstas no afectan directamente en la subversión de la maquinaria celular del hospedero, más bien se les puede atribuir una función de “puente” entre la bacteria y el citoplasma del hospedero. Por otro lado, las proteínas efectoras se van a encargar de subvertir la maquinaria celular, los mecanismos en los que actúan son muy variados, ya sea dañando y rearreglando el citoesqueleto (Tir, EspH, EspF y EspG), rompiendo uniones estrechas y dañando a las mitocondrias (EspF y Map) o causando citotoxicidad (EspF y Cif) (17). No todas las proteínas efectoras se encuentran codificadas en LEE, muchas de ellas se encuentran en otras regiones del genoma. A éstas se les denominó Nle (Non-LEE encoded effectors), y al igual que las proteínas efectoras codificadas en LEE, el intervalo de acción de las Nle, es muy variado (13, 16, 20, 29)

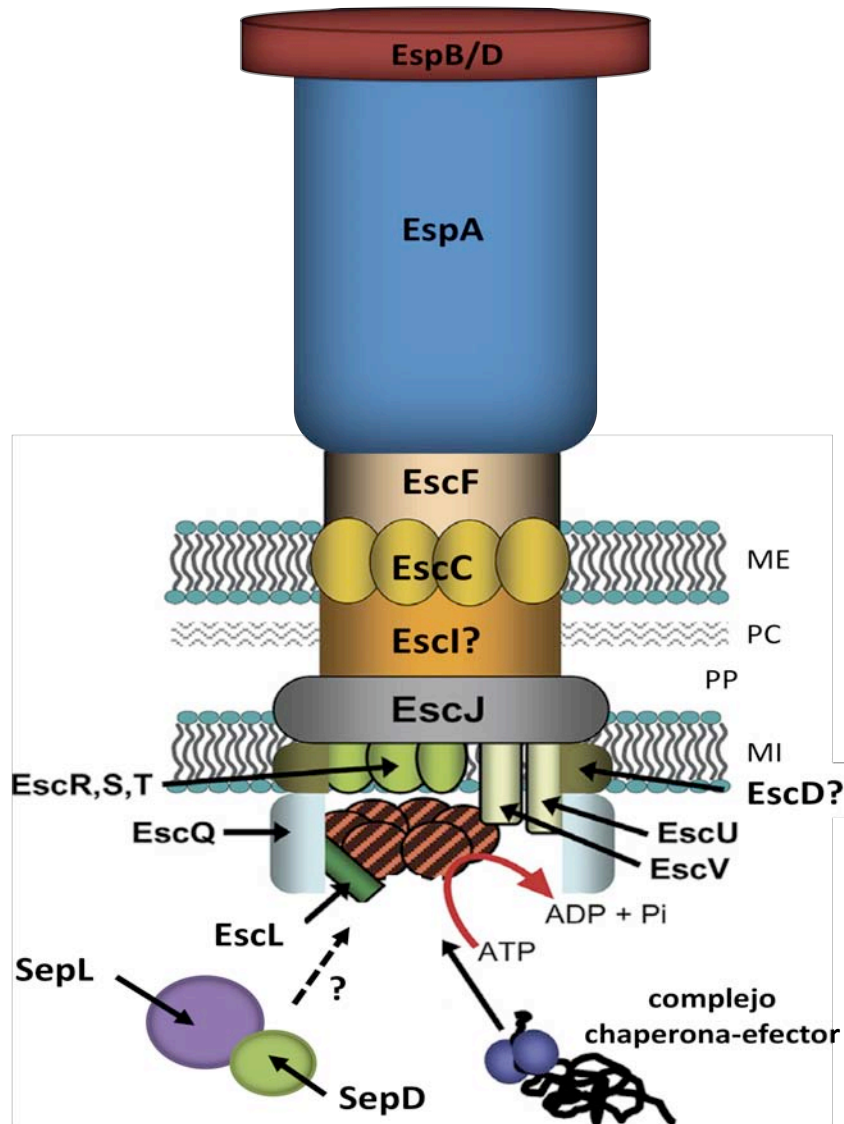


Figura 4. El SST3 de EPEC (Modificado de 1).

ME: membrana externa, PC: pared celular, PP: periplasma, MI: membrana interna

Antecedentes

Las proteínas efectoras son el “armamento” con el que cuenta la bacteria, pero estas sólo son capaces de funcionar cuando se encuentran dentro del citoplasma de la célula eucariótica. Por lo tanto se requiere una secreción eficiente y controlada para evitar el gasto innecesario de recursos. Para solucionar este problema, las bacterias patógenas que utilizan al SST3, han desarrollado un mecanismo de jerarquización en la salida de proteínas, para que primero sean secretadas las proteínas translocadoras, y cuando ya está terminada por completo esta jeringa molecular, entonces es cuando se empiezan a secretar las proteínas efectoras, tras el contacto con la célula eucariótica o la detección de una señal que mimetice este contacto (11, 12, 34). Sin embargo los mecanismos por los cuales se logra esto, no se conocen a profundidad, siendo uno de los más estudiados el de *Yersinia* spp (18).

Los patógenos de la familia A/E no son la excepción a este mecanismo de jerarquización, la primera vez que se notó un cambio del perfil de secreción, de uno tipo silvestre (mayormente translocadoras) a uno tipo mutante (mayormente efectoras), fue durante la caracterización de SepL de EHEC (27). En ésta se observó que una cepa que carecía de SepL presentaba una clara disminución en la cantidad de EspA, EspB y EspD, así como un claro aumento en la cantidad de Tir y NleA. Posteriormente mediante un ensayo de dos híbridos en levadura, se encontró que SepL era capaz de interactuar con SepD (6). Esta interacción fue verificada, por O’Connell *et al.* 2004, quien también reportó una caracterización más detallada de SepL en EHEC, en la cual confirma su papel regulador de la secreción, así como que ésta no es una proteína que sea secretada y que su ausencia ocasione una malformación en el translocón. (34)

Para esclarecer si SepD tenía algún papel en la jerarquización de proteínas secretadas, debido a la interacción que presentaba con SepL, se observó cuál era el fenotipo de una cepa de EPEC $\Delta sepD$, y se encontró un fenotipo muy similar al que presenta una cepa $\Delta sepL$, y este podía regresar a un fenotipo silvestre cuando la cepa era complementada, indicando así, que SepD juega un papel activo en la jerarquización (11, 34).

Mediante análisis de fraccionamiento celular, se encontró que SepL y SepD son proteínas asociadas principalmente a la membrana interna (12, 27, 41), lo cual llevó a proponer que ambas proteínas se unen a la base del SST3, y ya estando allí, sirven de “porteros” para impedir la salida de las proteínas efectoras, hasta que se haya formado el translocón (12). Un escenario probable respecto a la

jerarquización de la salida de proteínas es la competencia por el poro del SST3 entre translocadoras y efectoras, pero este no parece ser el caso, ya que en una cepa EPEC $\Delta espABD$, no se aumenta la secreción de proteínas efectoras (12).

Una duda que existía, era si SepL y SepD realizaban la misma función en los patógenos A/E. Mediante el uso de deleciones no polares en ambos genes de EPEC, EHEC y CR, se observó que SepL y SepD juegan un rol muy similar en la jerarquización de la secreción en las 3 cepas (12).

Actualmente SepD no tiene ningún homólogo fuera de la familia A/E, pero se ha propuesto que tiene características de chaperona (12, 35). Físicamente, el gen *sepD* se encuentra en el lugar que le corresponde a *yscB* en la isla de patogenicidad de *Yersinia* sp. (35), que codifica para la chaperona de YopN (10). SepD es una proteína de 151 aa, con un peso de 17.56 KDa, un punto isoeléctrico de 7 y una vida media estimada menor a diez horas (Expasy Tools – ProtParam). La predicción de su estructura secundaria muestra que está compuesta principalmente de alfa hélices (Figura 5).

SepL pertenece a la familia de proteínas InvE/HrpJ/MxiC (familia aun sin nombre), la cual se caracteriza porque sus miembros son una fusión de YopN y TyeA (2, 35, 41), ambas proteínas se encargan de regular la salida de efectoras en *Y. pestis* (24). La eliminación de los genes que codifican de estas proteínas, lleva a una desregulación de la secreción del SST3, y aunque los fenotipos varían de especie a especie, en todas se presenta un aumento significativo en la secreción de proteínas efectoras. Una de las diferencias que existe entre los miembros de esta familia, es que YopN/MxiC/HrpJ son secretadas a través del SST3 y dentro del citoplasma del hospedero funcionan como proteínas efectoras, no siendo este el caso de SepL/InvE, las cuales siempre se mantienen en el citosol de la bacteria (2, 21,34). SepL es una proteína de 351 aa, con un peso de 39.98 KDa, un punto isoeléctrico de 4.76 y una vida media estimada menor a diez horas (Expasy Tools – ProtParam). Su predicción de estructura secundaria muestra que está compuesta exclusivamente de alfa hélices (Figura 6) al igual que los demás miembros de la familia SepL/InvE/HrpJ/MxiC/YopN-TyeA (2, 4141).

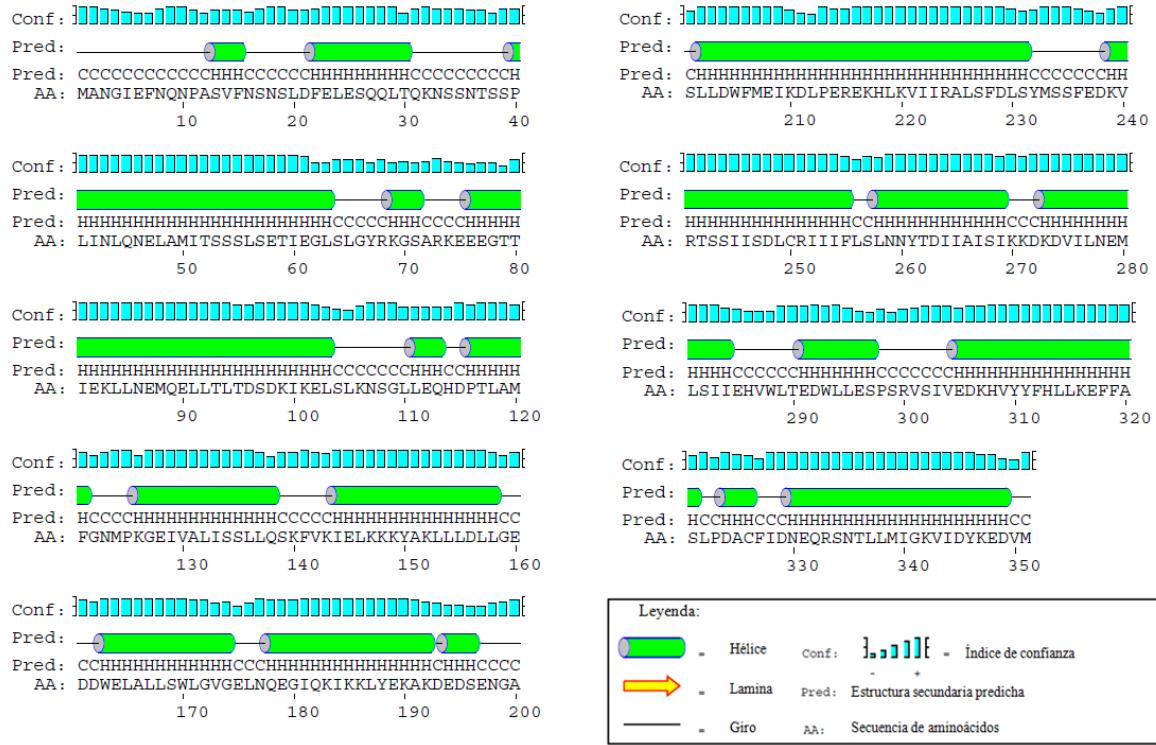


Figura 6. Predicción de estructura de SepL

La predicción se hizo con el software PSIPred de Expsy Tools. El índice de confianza, indica que tan certera es la predicción para un determinado aminoácido.

Justificación

Debido a su importancia médica en países como México, el estudio de EPEC cobra una relevancia especial. Actualmente los mecanismos por los cuales causa diarrea no están completamente entendidos, pero se sabe que su principal mecanismo para generar la infección, es mediante la inyección de proteínas a los enterocitos. La secreción de estas proteínas está finamente controlada por 2 proteínas, SepL y SepD; pero la manera en que llevan a cabo esta tarea, aun es desconocida. Por tal motivo, el estudio de SepD es relevante, pues es una proteína clave para que se dé una infección eficiente por parte de EPEC. Se decidió utilizar la estrategia de hacer deleciones sucesivas de 15 aminoácidos a la proteína, que teóricamente no afectaban su estabilidad, a fin de identificar zonas de importancia dentro de la proteína.

Objetivos

General

Estudiar los mecanismos moleculares que regulan la función del SST3 en EPEC.

Particular

Caracterizar funcionalmente a la proteína SepD de EPEC.

Específicos

Determinar si SepD es capaz de interactuar consigo misma.

Localizar el motivo de unión de SepD a SepL.

Caracterizar el fenotipo de expresión de proteínas translocadoras y efectoras en las mutantes sencillas de *sepD* y *sepL* de EPEC.

Materiales y métodos

- Cepas y plásmidos

Tabla 1. Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
MC4100	F ⁻ , [<i>araD139</i>], $\Delta(\textit{argF-lac})169$, LAM ⁻ , <i>e14-</i> , <i>flhD5301</i> , $\Delta(\textit{fruK-yeiR})725(\textit{fruA25})$, <i>relA1</i> , <i>rpsL150(strR)</i> , <i>rbsR22</i> , $\Delta(\textit{fimB-fimE})632(::\textit{IS1})$, <i>deoC1</i> . Sm ^R	4
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(\textit{mrr-hsdRMS-mcrBC})$ ($\Phi 80\textit{lacZ}\Delta\textit{M15}$ $\Delta\textit{lacX74}$ <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(\textit{ara-leu})7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i> . Sm ^R	5
BL21	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> $\lambda(\text{DE3})$ pLysS. Cm ^R	9
MC4100 $\Delta\textit{lon}$ $\Delta\textit{clpX}$	Derivada de MC4100. Sm ^R / Cm ^R	Ibarra, A. No publicado
EPEC		
E2348/69	Silvestre. Sm ^R	28
SepL-FLAG	Derivada de E2348/69 que codifica a <i>sepL</i> unido a una etiqueta de FLAG. Sm ^R / Km ^R	Huerta, A. no publicado
SepD-FLAG	Derivada de E2348/69 que codifica a <i>sepD</i> unido a una etiqueta de FLAG. Sm ^R / Km ^R	Huerta, A., no publicado
$\Delta\textit{sepL}$	E2348/69 que tiene una deleción no polar de <i>sepL</i> . Sm ^R	11
$\Delta\textit{sepD}$	E2348/69 que tiene una deleción no polar de <i>sepD</i> . Sm ^R	11
$\Delta\textit{sepL}$ SepD-FLAG	Derivada de $\Delta\textit{sepL}$ que codifica a <i>sepD</i> unido a una etiqueta de FLAG. Sm ^R / Km ^R	Este trabajo
$\Delta\textit{sepD}$ SepL-FLAG	Derivada de $\Delta\textit{sepD}$ que codifica a <i>sepL</i> unido a una etiqueta de FLAG. Sm ^R / Km ^R	Este trabajo
<i>Salmonella typhi</i>		
<i>ssrB</i> -FLAG	Cepa silvestre que tiene a <i>ssrB</i> unido a una etiqueta de FLAG. Km ^R	3

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio.

Nombre	Descripción	Referencia
pGEX 4T.1	Plásmido que contiene GST para expresar proteínas de fusión, bajo el control del promotor de lacZ. Ap ^R	25
pGEX SepL	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepL. Ap ^R	Este trabajo
pGEX SepD	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepD. Ap ^R	Este trabajo
pGEX SepD15	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepD con una deleción del aa 2 al 15. Ap ^R	Este trabajo
pGEX SepD30	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepD con una deleción del aa 16 al 30. Ap ^R	Este trabajo
pGEX SepD45	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepD con una deleción del aa 31 al 45. Ap ^R	Este trabajo
pGEX SepD60	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepD con una deleción del aa 46 al 60. Ap ^R	Este trabajo
pGEX SepD75	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepD con una deleción del aa 61 al 75. Ap ^R	Este trabajo
pGEX SepD90	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepD con una deleción del aa 76 al 90. Ap ^R	Este trabajo
pGEX SepD105	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepD con una deleción del aa 91 al 105. Ap ^R	Este trabajo
pGEX SepD120	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepD con una deleción del aa 106 al 120. Ap ^R	Este trabajo
pGEX SepD135	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepD con una deleción del aa 121 al 135. Ap ^R	Este trabajo
pGEX SepD150	Derivado de pGEX 4T.1 que expresa GST-SepD con una deleción del aa 136 al 151. Ap ^R	Este trabajo
pBAD SepD	Derivado de pBAD que contiene a <i>sepD</i> fusionado a un epítope de Myc y a otro de histidinas, ambos en el carboxilo terminal. Plásmido inducible con L-+-arabinosa. Ap ^R	Ares, Miguel. No publicado
pTOPO SepL	Derivado de pCR2.1-TOPO que contiene a <i>sepL</i> fusionado a dos epítopes de HA en el carboxilo terminal, la expresión se encuentra bajo el control del promotor de lacZ. Km ^R /Ap ^R	Ares, Miguel. No publicado

pTOPO SepD	Derivado de pCR2.1-TOPO que contiene a <i>sepD</i> fusionado a dos epítopes de HA en el carboxilo terminal, la expresión se encuentra bajo el control del promotor de lacZ. Km ^R /Ap ^R	Ares, Miguel. No publicado
pTIR394	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional de <i>p-tir-CAT</i> a partir de los nucleótidos -394 a +138 Ap ^R	36
pKD46	Plásmido que contiene a la Red recombinasa bajo el control del promotor de <i>araB</i> . Ap ^R	8
pSUB11	Contiene una etiqueta de FLAG y un casete de resistencia a Km. Km ^R	40
pSUBSepL	Derivado de pSUB11, contiene a <i>sepL</i> . Km ^R .	Este trabajo
pSUBSepD	Derivado de pSUB11, contiene a <i>sepD</i> . Km ^R .	Este trabajo

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Sitio de restricción	Referencia
SepLTOPO2	GCGGCTCGAGCATAACATCCTCCT TATAATC	XhoI	Ares, Miguel. No publicado
SepDTOPO2	GCGGCTCGAGCACAATTCGTCCT ATATCAG	XhoI	Ares, Miguel. No publicado
DFor*	AGCGCCCAATACGCAAACCG	-	Ares, Miguel. No publicado
DRev*	TGCGCCGCTACAGGGCGCGT	-	Ares, Miguel. No publicado
BamSepLF	CCGGGATCCATGGCTAATGGTATT GA	BamHI	Este trabajo
BamSepDF	CCGGGATCCATGAACAATAATAAT GGC	BamHI	Este trabajo
BamSepD15	CCGGGATCCATGACGGCCCTTGA TTTTGTA	BamHI	Este trabajo
SepD1F	TGACTGGCTACTCACTTTTTATATC TACCA	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD2F	ACCAACGCATGGAACTACTGGGT TCTATA	-	Ares, Miguel. No publicado

SepD3F	GCACGATTTTCAGATTCCAACAGA TACATT	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD4F	TGATTTTCGTGTTAGTAAAGAATAT AAACA	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD5F	TATCCTGGCCAAGTGGTATCTTTG CCAAAT	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD6F	GTCTAATAAGGCCAAACATGTCAAA AGCAAT	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD7F	TAATCATCGCCTCGACAAGCAATT TGATAA	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD8F	CGCCTCGTTGACAATGATGCCGC CAACACA	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD1R	AAAAAGTGAGTAGCCAGTCACAAT CATTCT	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD2R	AGTAGTTTCCATGCGTTGGTGAAC CGTTGA	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD3R	TTGGAATCTGAAAATCGTGCAAGA AAGCAT	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD4R	CTTTACTAACACGAAAATCACCAC TAAGCT	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD5R	GATACCACTTGGCCAGGATATTGC AGAGTC	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD6R	ACATGTTTGCCTTATTAGACAGGA AAATAC	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD7R	GCTTGTGCGAGGCGATGATTATTAT CTTTAT	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD8R	GCATCATTGTCAACGAGGCGAGA GTATGTT	-	Ares, Miguel. No publicado
SepD9R	GCGGCTCGAGATCTGATGAAGAT GATTG	XhoI	Este Trabajo
SepLFLAGF	AATGATTGGTAAAGTGATAGATTA TAAGGAGGATGTTATGGACTACAA AGACCATGACGGT	-	Este trabajo
SepDFLAGF	GCCGCCAACACACTTGTTTTCTGA TATAGGACGAATTGTGGACTACAA AGACCATGACGGT	-	Este trabajo
SepLPS2	ATCTTTCTTAGCATGACAAAACTA TAAAAAAAACAATACATATGAATA TCCTCCTTAGTTC	-	Este trabajo

SepDPS2b	AAATAGTGCTGTAAAAATAAAAAA CTTATTTTTTTTCGCCATATGAATAT CCTCCTTAGTTC	-	Este trabajo
----------	--	---	--------------

*Estos oligonucleótidos sirven para amplificar a SepD.

†El subrayado indica el sitio de restricción.

- Condiciones de crecimiento de *E. coli*

Las cepas se incubaron a 37°C en agitación a 250 rpm en medio de cultivo LB o DMEM. Los medios se suplementaron según el caso, con ampicilina (200µg/ml), kanamicina (30µg/ml), cloranfenicol (15µg/ml), estreptomina (100µg/ml) o IPTG (0.5mM).

- Purificación de ADN de plásmido y ADN en geles de agarosa

Para purificar ADN de plásmido o las bandas de ADN de geles, se utilizaron los kits QIAprep Spin Miniprep Kit y QIAquick Gel Extraction Kit, respectivamente, ambos de Qiagen. En ambos casos, se siguió el instructivo al pie de la letra.

- Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de ADN se separaron en geles de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1X a 110V de 25 a 35 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 µg/ml) de 6 a 10 minutos y posteriormente se observaron sobre luz ultravioleta.

- PCR

Para amplificar o verificar la presencia de los genes, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con las cantidades indicadas en la tabla 4 por cada 100µl de reacción. Los ciclos y las temperaturas usadas fueron las siguientes, un ciclo de 5 minutos a 94°C; treinta ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 52°C y un minuto a 72°C; por último un ciclo de 3 minutos a 72°C. Para muestras donde se quiso gran fidelidad en la replicación del ADN, se utilizó Platinum Taq polimerasa (Invitrogen)

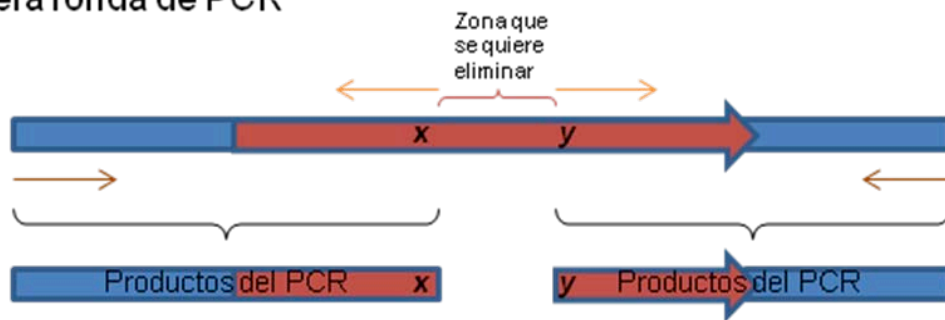
Tabla 4. Mezcla para PCR.

Reactivo	Cantidad (μ l)
Agua MiliQ	74
Amortiguador 10X (Invitrogene)	10
MgCl ₂	3
Muestra (10 pg-1 μ g)	2
Oligonucleótido 1 (300 ng/ μ l)	2
Oligonucleótido 2 (300 ng/ μ l)	2
dNTPs (10 mM)	2
DMSO (5 %)	5
Taq polimerasa (5 U/ μ l) (Invitrogene)	0.5

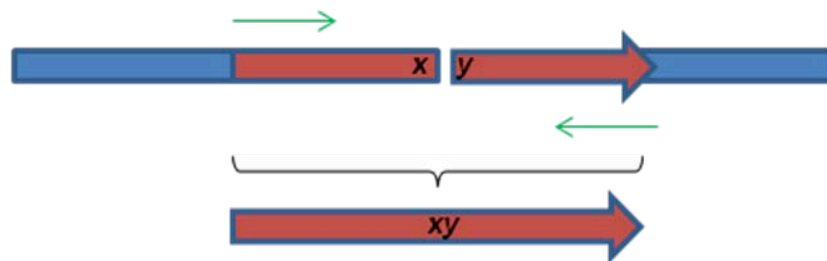
- Mutación por PCR sobrepuesto

Consistió en dos rondas de PCR, en la primera, el gen se amplificó utilizando el oligonucleótido donde empieza o termina la deleción contra un oligonucleótido externo. En la segunda ronda, se utilizaron los productos de la primera ya purificados como molde, mezclando los que terminan en el inicio de la deleción con los que empiezan en el final de la deleción. Esta mezcla de productos se amplificó utilizando oligonucleótidos que pegaban en el extremo 5' y en el extremo 3' del gen. (Figura 7)

Primera ronda de PCR



Segunda ronda de PCR



Leyenda:

= gen

= región intergénica

= oligonucleótido que se pega al principio o al final de delección

= oligonucleótido que se pega en la región intergénica

= oligonucleótido que se pega en el extremo 5' o 3' del gen

x, y = par de bases

Figura7. Esquema sobre la técnica de mutación por PCR sobrepuesto.

- Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas utilizadas en este trabajo, fueron BamHI y XhoI (Invitrogene). Para cada digestión se utilizaron las cantidades indicadas en la tabla 5. La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas. La endonucleasa se inactivó incubando a 80°C por 10 minutos. Posteriormente se agregó 1µl de la otra endonucleasa y se incubó a 37°C por 2 horas.

Tabla 5. Mezcla para una digestión.

Reactivo	Cantidad (μl)
Agua MiliQ	8
Buffer 1 10X (Invitrogene)	2
Muestra (0.1-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	10
Endonucleasa (10 U/ μl)	1

- Ligación

Los insertos y los vectores, previamente digeridos con las endonucleasas BamHI y XhoI, se ligaron utilizando las cantidades indicadas en la tabla 6. Esta mezcla se incubó toda la noche a 16 °C. La cantidad de muestra varió en algunas reacciones dependiendo de su concentración, manteniendo una relación inserto:vector de 5:1.

Tabla 6. Mezcla para ligación.

Reactivo	Cantidad (μl)
Agua MiliQ	~3
Amortiguador 5X (Invitrogene)	4
Muestra	~10
Vector	2
T4 ADN ligasa (1 U/ μl) (Invitrogene)	1

- Secuenciación

Para la secuenciación, se utilizaron las cantidades y los oligonucleótidos indicados en las tablas 7 y 8, respectivamente. La secuenciación se lleva a cabo en la unidad de secuenciación del IBt, la cual utilizó el método de *Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing*.

Para el caso de *sepL* se tuvieron que hacer 3 secuenciaciones en diferentes puntos debido a su tamaño, para secuenciar la parte 5' se utilizó el oligonucleótido GSTint5', para secuenciar la parte media del gen, se utilizó el oligonucleótido BamSepLF, para la parte 3' se utilizó el oligonucleótido SepLTOPO2.

Para el caso de SepD y todas las construcciones se utilizó únicamente el oligonucleótido GSTint5'.

Tabla 7. Mezcla para secuenciar.

Reactivo	Cantidad (μ l)
Agua MiliQ	10
Muestra (33-50ng/ μ l)	5
Oligonucleótido (10pmol/ μ l)	1

Tabla 8. Oligonucleótidos de secuenciación.

Nombre	Descripción	Referencia
GSTint5'	Hibrida 97 pb arriba del polylinker del vector pGEX.	Donado por García-Angulo, V.
BamSepLF	Descrito en la Tabla 3.	Este Trabajo
SepLTOPO2	Descrito en la Tabla 3.	Ares, Miguel. No publicado

- Preparación de células electrocompetentes

De la cepa a transformar se inocularon 5 ml de LB y antibiótico, este se incubó o/n. De este cultivo se tomó 1 ml y se inoculó un matraz de 100ml de LB que se creció hasta llegar ~0.6 DO a 600nm. El cultivo se centrifugó a 8000rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se retiró. La pastilla se lavó tres veces con 50ml de agua MiliQ. La pastilla se resuspendió en 20ml de glicerol al 10% y se centrifugó de nuevo. Por último, la pastilla se resuspendió en 2ml de glicerol al 10%, de esto se hicieron alícuotas en tubos con 80 μ l y almacenados a -75°C.

- Transformación

A una alícuota de células electrocompetentes, se agregaron 5µl de una ligación, esta mezcla se transfirió a una celda de electroporación de 0.2 cm (Biorad) y posteriormente se le dio un pulso eléctrico de 2.5 kV. En este estudio se utilizó el programa Ec2 de la máquina Micropulser de Biorad. Después del pulso, las células se resuspendieron en 1ml de SOC y se dejaron recuperar por una hora a 37 °C a 250 rpm. Los tubos se centrifugaron a 13,000rpm por un minuto, casi todo el sobrenadante se descartó, cuidando dejar ~50 µl en el cual se resuspendió la pastilla que se formó. Ya resuspendida, se plaqueó en una caja de LB con el antibiótico de selección y se incubó o/n a 37°C.

- Etiquetado cromosomal

Esta es una modificación a la técnica de mutagénesis descrita por Datsenko y Wanner, 2000. Consistió en una ronda de PCR, en la cual, se amplificó el epítipo de FLAG más un gen de resistencia a kanamicina, utilizando oligonucleótidos que contienen una región homóloga al gen de interés.

La cepa de interés se transformó con el pKD46, recuperó y creció a 30°C. Para hacer células electrocompetentes de esta cepa, se indujeron primero con L-+-arabinosa y durante todo el tiempo se crecieron a 30°C. Posteriormente estas se transformaron con el producto del PCR y se recuperaron a 30°C por tres horas. Después se plaquearon en cajas de LB con Km y se incubaron o/n. De las colonias obtenidas, se replaquearon en cajas de LB con Ap o con Km. Se seleccionaron aquellas colonias que resultaron resistentes a Km pero sensibles a Ap. La presencia del inserto se comprobó mediante PCR.

- Inducción de la expresión de proteínas

Para cada cepa se inoculó un tubo de ensayo con 5 ml de LB y antibiótico, el cual se incubó o/n a 37 °C. De este, se inoculó 1:100, 20, 50 o 100ml de medio LB o DMEM, según fuese el caso. Se dejó crecer a ~0.6 DO a 600nm y se le agregó IPTG (concentración final 0.2 mM). En este trabajo, las inducciones en LB fueron por cuatro horas a 30°C; mientras que para DMEM, fueron hasta que las células alcanzaron ~1 DO a 600nm. Los cultivos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 1.5 ml de PSB

1X frío por cada 25 ml de cultivo. Estas muestras se sonicaron y analizaron por SDS-PAGE, para comprobar que hubo una inducción exitosa.

- Coexpresión de proteínas

Las cepas de EPEC etiquetadas cromosomalmente en SepD o SepL con FLAG, se transformaron con un plásmido que codifica para una proteína de fusión, ya sea de SepD o sus mutantes unidas a GST. Las cepas se sembraron en 5 ml de LB y antibiótico, el cual se incubó o/n a 37 °C. De este, se inocularon 25 ml de DMEM, el cual se dejó que alcanzara una DO de ~0.6 a 600 nm; el cultivo se indujo con IPTG 0.2 mM y se dejó crecer durante dos horas más. Este se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 4 ml de PSB 1X frío. Estas muestras se sonicaron y utilizaron para ensayos de copurificación.

- Cinética de expresión proteica

Para cada cepa se utilizó, se inoculó un tubo de ensayo con 5 ml de LB y antibiótico, el cual se incubó o/n a 37 °C. De este, se inocularon por triplicado 50 ml de medio DMEM ajustando a una DO inicial de 0.07 a 600 nm. Las muestras se tomaron cada hora a partir de la primera hora durante diez horas. La primera toma de muestra fue de 50 ml, la segunda de 25 ml, tercera y cuarta de 12 ml, quinta y sexta de 6ml, séptima, octava, novena y decima fueron de 3 ml. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 500 µl de PSB 1X frío. Estas se sonicaron, separaron por SDS-PAGE y analizaron por Wester blot utilizando los anticuerpos primarios α-GST, α-Tir, α-EspA y α-DnaK, en las concentraciones indicadas en la tabla 13.

- Sonicación

Los cultivos celulares se resuspendieron en PBS 1X (volumen variable entre 500 µl y 1.2ml), incubaron en hielo y sometieron a pulsos de sonido en el soniprep150 (MSE) con el siguiente programa: 9.9s de sonicación por 9s de descanso, con una amplitud de 35 %. El tiempo total de sonicación fue variable, 3, 5 o 10 min, esto dependió de la concentración de la muestra. Las muestras sonicadas se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se recuperó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se tuvo mucho cuidado de no resuspender la pastilla. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

- Pulldown y copurificación.

A 50µl de resina Glutathione Sepharosa 4B (Amersham Biosciences) se agregó 800 µl del extracto que contenía la proteína unida a GST (proteína “trampa”). Esta mezcla se incubó en agitación a 4 °C por dos horas, se centrifugó a 6000 rpm por un minuto y el sobrenadante se removió. A la resina se agregó 1.5ml de PBS/NaOH 0.1M frío, esta mezcla se centrifugó con las condiciones anteriores. Este paso de lavado se repitió 6 veces, con la finalidad de remover interacciones inespecíficas. A la resina “limpia”, se agregó 1ml del extracto que contenía a la proteína con la que se quiso ver la interacción (proteína “blanco”), se incubó en agitación a 4°C por 2 horas. Como paso final, la resina se lavó con las mismas condiciones antes mencionadas. Las muestras ya limpias se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo primario α-FLAG, con la concentración indicada en la tabla 13.

Para la copurificación se utilizó el extracto obtenido en la coexpresión, por lo que la proteína “trampa” y “blanco” ya se encontraban juntas, lo cual eliminó uno de los dos pasos generales de lavado presentes en la técnica de pulldown, pero todos los demás pasos y cantidades, se mantuvieron iguales.

- Obtención de proteínas secretadas por EPEC

De las cepas de EPEC utilizadas en este estudio, se inocularon tubos de ensayo con 5 ml de LB y antibiótico, estas se incubaron para crecer o/n. Con estos se inocularon medio DMEM manteniendo una proporción de 1:100 (inóculo:medio). Se dejó crecer hasta que estuvieran entre 0.8 y 1 DO a 600nm. Se tomaron dos alícuotas de 1.5ml cada una por cepa, que se centrifugaron a 12000rpm durante 5 minutos. Se recuperaron 1300µl del sobrenadante y a cada alícuota se le agregó 140µl de TCA y se dejaron o/n a 4°C. Las alícuotas se centrifugaron a 14,000rpm por 30 minutos, el sobrenadante se retiró y la pastilla se resuspendió en 3µl de NaOH 11M y 10µl de amortiguador de carga (tabla 9). Las muestras se analizaron por SDS-PAGE.

- SDS-PAGE

Las muestras de proteína obtenidas en los distintos ensayos, se separaron en un gel desnaturizante de acrilamida. Para prepararlo, se utilizaron las cantidades indicadas en las tablas 10 y 11. Antes de cargar las muestras en el gel, se les agregó amortiguador de carga (tabla 9), y se calentaron a 94°C por diez minutos. El gel se corrió en amortiguador Tris-Glicina-SDS al 5% a 17 mA por alrededor de tres horas para un gel separador de 10 ml, o por alrededor de seis horas para un gel separador de 20 ml; o a 20mA por alrededor de 2 horas para un gel separador de 10 ml, o por alrededor de cinco horas para un gel separador de 10 ml. De ser el caso, el gel se tiñó con azul de Coomassie.

Tabla 9. Amortiguador de carga

Reactivo	Cantidad
Glicerol (100 %)	5 ml
SDS (20 %)	2 ml
β -mercapto (1 M)	1 ml
Tris HCl 1 M pH 6.8	2.5 ml
Azul de bromofenol	0.02 g

Tabla 10. Cantidades para un gel separador

Reactivo	12%	15%
Agua MiliQ	7ml	5ml
Acrilamida 30%	8ml	10ml
Bis-acrilamida 0.8%		
Amortiguador Tris pH 8.8	5ml	5ml
PSA 10%	100 μ l	100 μ l
TEMED	14 μ l	14 μ l

Tabla 11. Cantidades para un gel concentrador

Reactivo	Cantidad
Agua MiliQ	6ml
Acrilamida 30% Bis-acrilamida 0.8%	1.5ml
Buffer Tris pH 8.8	2.5ml
PSA 10%	50µl
TEMED	10µl

- Transferencia a una membrana de nitrocelulosa o PVDF

Los SDS-PAGE, se incubaron por 5 minutos en amortiguador de transferencia (tabla 12). En una cámara de transferencia semiseca (trans-blot sd de BioRad), se puso en el siguiente orden el “sándwich” de transferencia: 3 papeles filtro, membrana (nitrocelulosa o PVDF), gel de acrilamida y 3 papeles filtro. La transferencia fue por 45 minutos a 15 V.

Tabla 12. Amortiguador de transferencia

Reactivo	Cantidad
Tris (100 %)	5.82 g
Glicina (100 %)	2.93 g
SDS (20 %)	1.72 ml
Metanol (20%)	200 ml
Agua MiliQ	789. 53 ml

- Inmunodetección (western blot)

La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó con PSB 1X-Tween 0,1% con leche svelty al 5% o/n. La leche se retiró y la membrana se trató con PBS 1X-Tween 0.1% para remover los restos de leche que pudieron haber quedado. La membrana se expuso al anticuerpo primario por un periodo de 2-4 horas en agitación (Tabla 13). Posteriormente el anticuerpo se retiró, la membrana se lavó con PBS 1X-Tween (0.1%) durante 10 minutos por 3 veces. Se agregó el

anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y se incubó en agitación 1 hora. El anticuerpo se retiró y la membrana se lavó de la misma manera que con el anticuerpo primario. Ya limpia, se le agregó luminol y reactivo oxidante (Western Lightning PerkinElmer) en una proporción 1:1. En un cuarto oscuro, se reveló la membrana utilizando película Kodak X-omat, el tiempo de exposición fue variable dependiendo de la intensidad de la señal.

Tabla 13. Concentración de los anticuerpos

Nombre	Concentración
<i>Anticuerpo primario</i>	
α -DnaK (sigma)	1:10,000
α -EspA ("casero")	1:10,000
α -FLAG (sigma)	1:1,000 o 1:2,000
α -GST (sigma)	1:40,000
α -Tir ("casero")	1:10,000
<i>Anticuerpo Secundario</i>	
α -Conejo (sigma)	1:10,000
α -Ratón (sigma)	1:10,000

- Cuantificación de la actividad de CAT (Cloranfenicol acetil-transferasa)

Para cada cepa que se utilizó, se inoculó un tubo de ensayo con 5 ml de LB y antibiótico, el cual se incubó o/n a 37 °C. De este, se inoculó por triplicado 40 ml de medio DMEM ajustando a una DO inicial de 0.07 a 600 nm. Cada muestra se tomó por triplicado, una por cada matraz. Estas se tomaron cada hora a partir de la primera hora. En la primera, se tomaron 16 ml, segunda hora fueron 8 ml, en la tercer hora fueron 2 ml, cuarta y quinta horas fueron 1 ml, sexta, séptima y octava fueron 600 ml. Todas las muestras se centrifugaron a 13,000rpm por 2 minutos, el sobrenadante se descartó, la pastilla se resuspendió en 1ml de PBS y se volvió a centrifugar a 13,000rpm por 2 minutos con el objetivo de quitar los restos de medio que pudieron haber quedado. La pastilla "limpia" se resuspendió en 500µl de TDTT y se sonicó. Para medir la concentración de proteínas del extracto, se cargaron 10µl por pozo por duplicado de cada cepa, en una placa de 96 pozos, luego se les agregó 200µl de BCA (Protein Assay Agent, reactivo A mas reactivo B) a cada pozo y la placa se incubó a 37°C por 30 minutos. Para medir la actividad de CAT, se cargaron 5µl por pozo por duplicado por cada

cepa. Posteriormente se les agregó 200µl de la mezcla de CAT (Tabla 14), e inmediatamente se midió la actividad el lector CERES 900C, con el programa CATODOS del software KC3, el cual midió la absorbancia de los posos a ~412 nm cada 5 segundos durante 5 minutos, el software ajustó los datos utilizando una curva estándar de actividad previamente establecida. La placa de proteínas se cuantificó en el mismo lector con el programa PROTODOS el cual midió la absorbancia de los posos a ~562 nm a punto, el software ajustó los datos utilizando una curva estándar de concentración previamente establecida.

Tabla 14. Mezcla CAT

Reactivo	Cantidad
Agua MiliQ	22ml
DNTB (1 mM)	10mg
Cloranfenicol (0.1 mM)	500µL
Acetil Coenzima A (0.1 mM)	500µL

Resultados

Construcción de las mutantes de SepD

Teniendo en cuenta el antecedente de que SepD interactúa con SepL (11, 12,34), se realizaron 10 deleciones de 15 codones cada una a lo largo de *sepD* mediante PCR sobrepuestos, con lo cual se crearon las proteínas mutantes SepD15, SepD30, SepD45, SepD60, SepD75, SepD90, SepD105, SepD120, SepD135 y SepD150 (Figura 8), con las cuales se intentó mapear el sitio de interacción. Estas se denominaron así por el aminoácido donde termina la deleción, con la excepción de SepD150, donde la deleción acaba en el 151, pero por comodidad se le nombró 150.

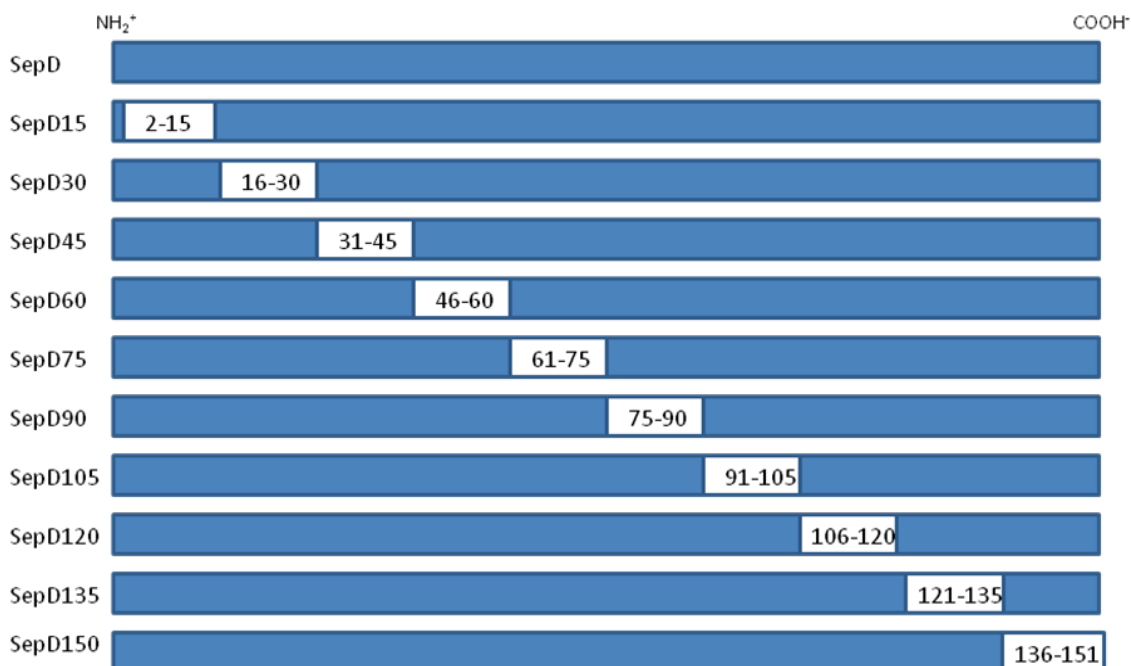


Figura 8. Esquema de las mutantes de SepD.

La proteína silvestre está representada como un rectángulo completo, en las proteínas mutantes el rectángulo está interrumpido por un recuadro blanco indicando donde se encuentra la deleción. Los números dentro de éste, indican los aminoácidos eliminados. El nombre de la proteína se encuentra en el extremo izquierdo.

Fenotipo de las proteínas mutantes de SepD de EPEC.

EPEC $\Delta sepD$ se complementó con los plásmidos que codifican para *sepD* silvestre y las mutantes. A estas cepas se les realizó un perfil de secreción (Figura 9), en el que se puede apreciar que las cepas $\Delta sepD$ complementadas con las proteínas silvestres (Figura 9, carriles 6, 7 y 8) restauran a niveles silvestres la secreción de proteínas (secreción de EspABD y poca secreción de efectoras). Para el caso de las mutantes, se puede apreciar que sólo SepD150 es capaz de complementar a niveles silvestres (Figura 9, Carril 18), lo cual nos sugiere que el carboxilo terminal, no juega un papel importante en la función de SepD. También se puede notar que SepD30, restaura parcialmente la secreción de proteínas translocadoras, pero aun así, se presenta secreción de efectoras (Figura 9, Carril 10), a este fenotipo lo denominamos mixto. Un perfil de secreción parecido se puede observar en una cepa de CR $\Delta orf16$ (11), proteína todavía sin función conocida y que también se está presente en EPEC y EHEC. Un perfil parecido a la cepa EPEC $\Delta sepD$ complementada con SepD30, se puede observar en una cepa complementada con SepD15, aunque la cantidad de translocadoras es significativamente menor (Figura 9, Carril 9). Estos resultados sugieren los primeros 29 aminoácidos son dispensable para la función de la proteína.

Algo constante con las proteínas mutantes de SepD, con excepción de SepD150, fue su baja expresión en comparación con la proteína silvestre (Figura Anexo-1A), por lo que existía la posibilidad de que su incapacidad de complementar se debiera a una falta en la cantidad de proteína, en especial para el caso de SepD30, la cual como ya mencionamos tiene un perfil de secreción mixto y una baja expresión (Figura Anexo-1A, carril 3). Para solucionar este problema, a las cepas de EPEC $\Delta sepD$ complementadas con proteínas mutantes, se les agregó 0.2mM de IPTG desde el inicio de su crecimiento. La cantidad de proteína de las mutantes aumentó considerablemente, incluso a niveles mayores que los silvestres (Figura Anexo-1B), pero aun así, el perfil de secreción no cambió para ninguna de ellas (datos no mostrados), con lo que se descartó la posibilidad de que las proteínas mutantes no fueran capaces de complementar debido a su baja expresión.

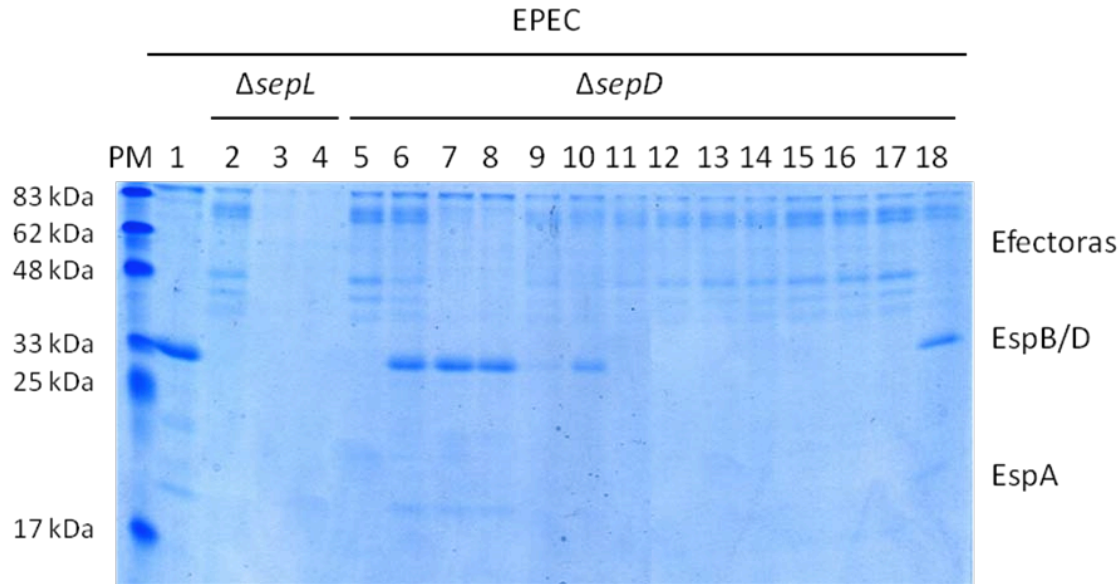


Figura 9. Perfil de secreción de EPEC.

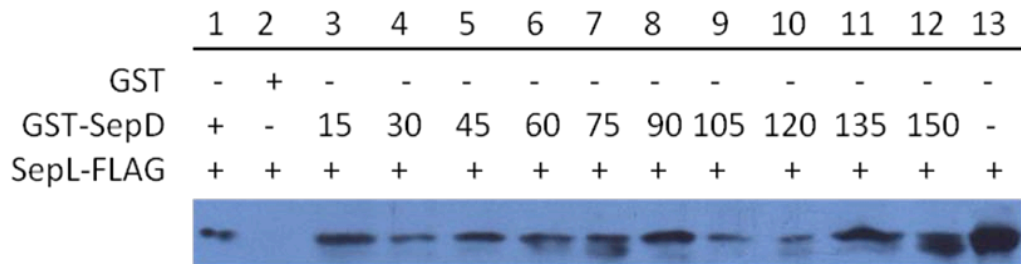
El perfil de secreción de proteínas en un gel al 15 %. La cepa silvestre se encuentra en el carril 1, los perfiles típicos de EPEC $\Delta sepL$ y $\Delta sepD$, se encuentran en los carriles 2 y 5 respectivamente. En ninguno de los casos se pudo complementar una $\Delta sepL$ (carriles 3 y 4), para el caso de $\Delta sepD$, se logró restaurar a niveles silvestres la secreción de las proteínas (carriles 6-8), no siendo este el caso para la mayoría de las deleciones (carriles 9-18). Carriles: **PM**: peso molecular, **1**: EPEC WT, **2**: $\Delta sepL$, **3**: $\Delta sepL$ + GST-SepL, **4**: $\Delta sepL$ + SepL – HA, **5**: $\Delta sepD$, **6**: $\Delta sepD$ + SepD-Myc-His, **7**: $\Delta sepD$ + GST-SepD, **8**: $\Delta sepD$ + SepD-HA, **9**: $\Delta sepD$ + SepD15, **10**: $\Delta sepD$ + SepD30, **11**: $\Delta sepD$ + SepD45, **12**: $\Delta sepD$ + SepD60, **13**: $\Delta sepD$ + SepD 75, **14**: $\Delta sepD$ + SepD90, **15**: $\Delta sepD$ + SepD105, **16**: $\Delta sepD$ + SepD120, **17**: $\Delta sepD$ + SepD135, **18**: $\Delta sepD$ + SepD150.

Interacción de las mutantes de SepD con SepL

Dado el modelo que habíamos planteado de cómo SepL y SepD funcionaban, la falta de complementación de la mayoría de las proteínas mutantes nos sugirió que iban a ser incapaces de interactuar con SepL. Esto no resultó ser así, ya que mediante ensayos de pulldown se observó que todas las proteínas mutantes fueron capaces de mantener su interacción con SepL (Figura 10A). Para descartar que esto se debiera a una interacción inespecífica de SepD con la etiqueta de FLAG adicionada a SepL, se realizaron pulldown usando a GST-SepD como trampa y a SsrB-FLAG de *S. typhi* como blanco, con el cual se pudo descartar la interacción inespecífica (Figura Anexo-2). Por otro lado, ensayos de coexpresión/copurificación se realizaron como otra manera de comprobar lo que habíamos observado en el pulldown. En estos el resultado fue similar, pues todas

las mutantes de SepD mantienen la capacidad de interactuar con SepL (Figura 10B).

A)



B)

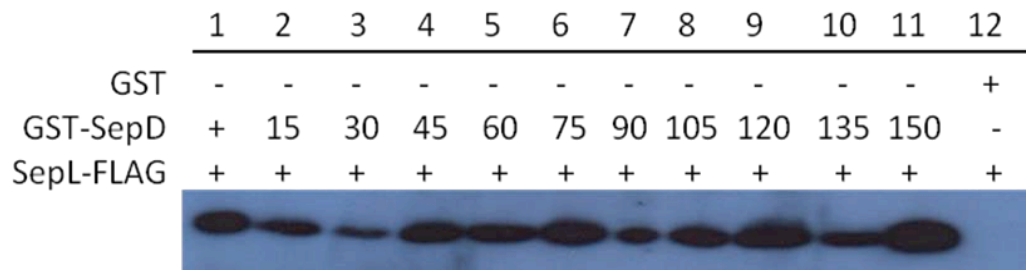


Figura 10. Interacción de SepD silvestre y proteínas mutantes con SepL.

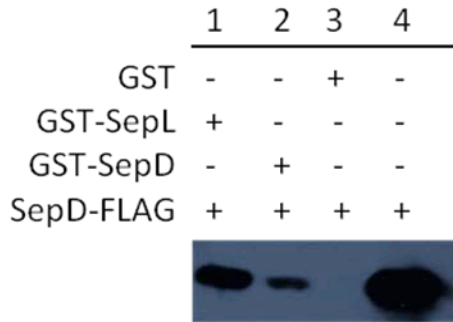
Ambas figuras son Western blot α -FLAG. A) Interacción probada mediante pull-down, en el carril 13 sólo se cargó el extracto que contenía a SepL-FLAG, B) Interacción probada mediante coexpresión/copurificación. El número en el carril de GST-SepD indica la proteína mutante. + indica presencia, - indica ausencia.

SepD interactúa consigo misma

Basándonos en el antecedente de que SepD podría interactuar consigo misma (12), se probó si tal interacción existía. Para esto, lo primero que se hizo, fue un ensayo de pull-down utilizando a GST-SepD como trampa y a SepD-FLAG como blanco. Como se puede observar en la figura 11A (carril 2), GST-SepD, es capaz de interactuar consigo misma. Posteriormente se intentó mapear su sitio de interacción. Para esto se decidió realizar un ensayo de coexpresión/copurificación, utilizando a las proteínas mutantes unidas a GST como trampa y a SepD-FLAG como blanco. De igual manera que con SepL, las proteínas mutantes de SepD no

perdieron su capacidad de interacción (Figura 11B, carriles 2-11). Ambos experimentos confirman que la interacción SepD-SepD existe.

A)



B)

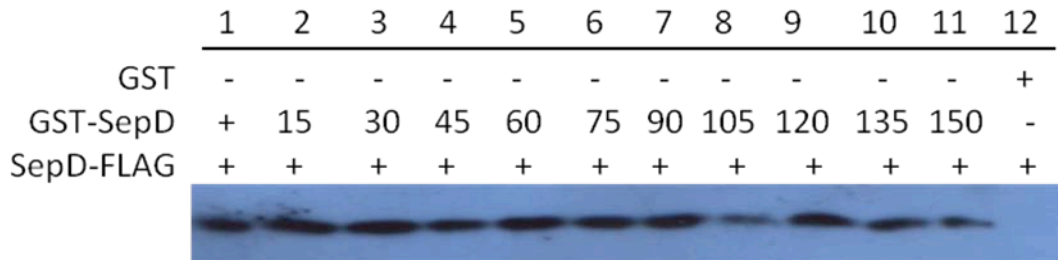


Figura 11. Interacción de SepD consigo misma

Ambas figuras son Western blot α -FLAG. A) Interacción probada mediante pull-down, en el carril 4 sólo se cargo el extracto que contenía a SepD-FLAG, B) Interacción probada mediante coexpresión/copurificación. El número en el carril de GST-SepD indica la mutante de SepD. + indica presencia, - indica ausencia.

La cantidad de Tir se ve afectada en un fondo EPEC Δ sepL o Δ sepD

Como parte de este trabajo, se quería ver cómo se comportaban SepL o SepD cuando la otra no estaba presente, ya que existe la posibilidad de que SepD sea la chaperona de SepL (12,35). Para esto, se realizó unacínética de expresión proteica en diferentes fondos de EPEC. La cantidad de SepL en una EPEC Δ sepD (Figura 12B), no se vio afectada, sin embargo, la cantidad de SepD en un fondo Δ sepL se incrementó de manera clara (Figura 12A), lo cual sugiere que SepD no estaría

funcionando como chaperona de SepL, y que SepL de alguna manera regula la expresión de SepD

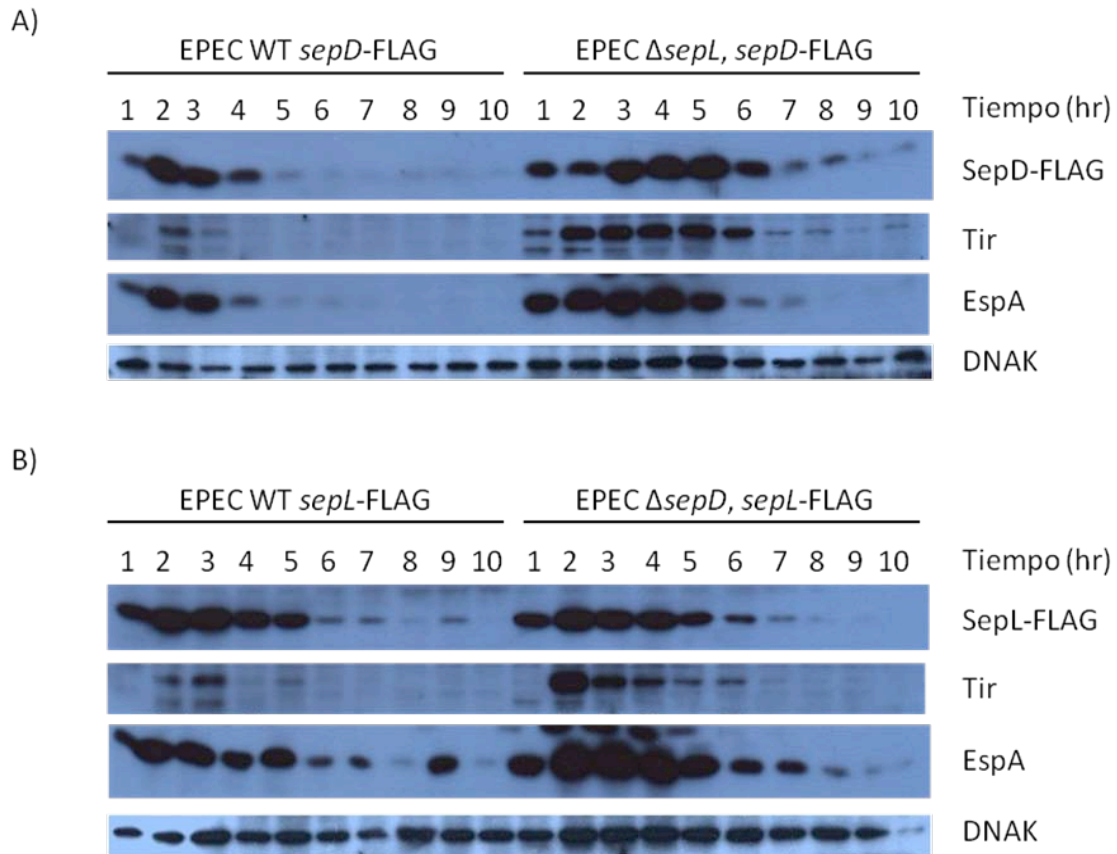


Figura 12. Expresión proteica de SepL, SepD, Tir y EspA en diferentes fondos de EPEC. Las figuras son Western blot, el anticuerpo primario usado en cada uno, corresponde al nombre que se encuentra a la derecha, Aunque la medida que aparece es tiempo, todas las cepas presentaron un crecimiento similar, la gráfica que muestra esto, es la figura Anexo-3.

Aunque existen reportes de que la expresión de Tir y EspA no se afectaba en un fondo EPEC Δ *sepL* o Δ *sepD* (12, 27,34), éstos siempre se tomaban en un solo punto de crecimiento, por lo que decidimos monitorear a Tir y LEE4 a lo largo de la curva de crecimiento de EPEC. La cantidad de Tir tanto en un fondo Δ *sepL* como en el fondo Δ *sepD*, aumenta significativamente (Figura 12A y 11B, respectivamente), ya que hay que considerar, que la cantidad de Tir extracelular también es significativamente mayor (34). Aparentemente la cantidad de EspA también aumenta, lo que puede deberse a que en una cepa Δ *sepL* o Δ *sepD*, dejan de secretarse proteínas translocadoras (12), lo cual puede llevar a su acumulación

interna, pero aun así no se descarta que estuviera sucediendo algo más, como la desregulación del operón LEE2

La expresión del operón LEE5, se desregula positivamente en EPEC $\Delta sepL$ o $\Delta sepD$

Al observar que la cantidad de Tir aumentó considerablemente en EPEC $\Delta sepL$ o $\Delta sepD$, surgió la pregunta si esto se debe a un aumento en la expresión de Tir (*LEE5*), lo cual parecía poco probable dado que los antecedentes mostraban que este no era el caso (12, 24, 37), o si se debía a regulación postranscripcional (estabilidad del mensajero, mejor traducción o estabilidad de la proteína). Para abordar esta cuestión, se realizó una cinética de expresión del operón *LEE5*. A los diferentes fondos de EPEC usados en la cinética de expresión proteica, se les transformó con un plásmido que lleva una fusión transcripcional de la región reguladora de *LEE5* unida al gen reportero *cat* (36). Se observó que existe un aumento más o menos del doble de la expresión de *LEE5* (Figura 13), tanto en un fondo $\Delta sepL$ como en uno $\Delta sepD$, lo cual contradice directamente los reportes antes mencionados (12, 27,34), siendo siempre el aumento mayor en un fondo $\Delta sepL$ que en uno $\Delta sepD$, lo cual es consistente con lo que se observó en el ensayo de cinética de expresión proteica, donde vemos como en un fondo $\Delta sepL$ se observa una cantidad significativamente mayor de Tir (Figura 12A).

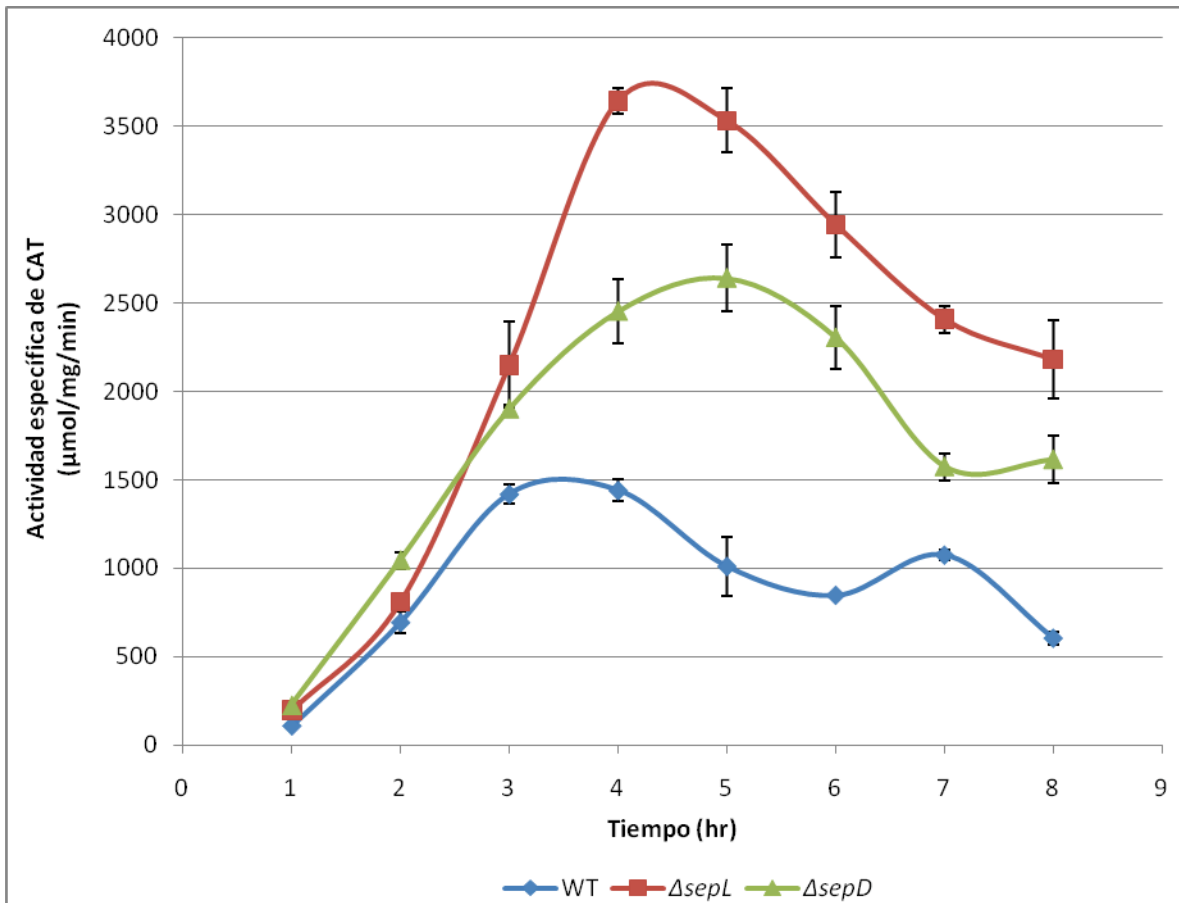


Figura 13. Expresión de la fusión transcripcional *LEE5-cat* en diferentes fondos de EPEC. Aunque la medida que aparece es tiempo, todas las cepas presentaron un crecimiento similar (Figura Anexo-3).

Discusión y conclusiones

El rol que juegan tanto SepL como SepD en la jerarquización de las proteínas secretadas en los patógenos A/E, es crítico e indiscutible (11, 12, 16, 17, 27, 29, 34,41), pero hasta este momento los mecanismos por los cuales consiguen esto, siguen siendo desconocidos. En este estudio, se intentó elucidar algunos de los posibles mecanismos mediante los cuales SepD lleva a cabo su función en EPEC.

La estrategia que se siguió para intentar mapear el sitio de interacción de SepD con SepL, dio como resultado algo ambiguo, ya que con excepción de SepD150, ninguna de las proteínas mutantes fue capaz de restaurar el perfil de secreción de proteínas silvestre (Figura 9). De igual manera, ninguna perdió su capacidad de interactuar con SepL (Figura 10). Existen dos posibles explicaciones para esto. La primera es que el sitio de interacción entre SepD y SepL, sea mayor a 15 aminoácidos, por lo cual ninguna de las deleciones lo abarcaría por completo, y los aminoácidos que quedaran fueran suficientes para seguir manteniendo la interacción. La otra posible explicación, es que SepD tiene más de un sitio de unión con SepL, y que estos se encuentren entre sí a una distancia mayor de 15 aminoácidos, por lo cual ninguna de las deleciones utilizadas en este estudio, sería capaz de remover a los dos sitios y uno solo fuera más que suficiente para mantener la interacción.

Para el caso de las mutantes SepD15 y SepD30, lo que probablemente esté pasando, es que GST les impide llevar por completo su función, y por eso no sean capaces de restaurar la secreción a niveles silvestres, pero aun así presentan cierta secreción de translocadoras. Si esto es cierto, indicaría que el extremo amino, no es esencial en el papel que juega SepD.

Por otro lado, la incapacidad de las deleciones para complementar, nos indica, que si bien la interacción entre SepL y SepD puede ser importante para que lleven a cabo su función, existen otros aspectos a considerar, que parecen tener una mayor importancia. Si se ve afectada la estructura nativa de SepD puede ser posible que ésta ya no pueda llevar a cabo su función. Aunque teóricamente (predicción de estabilidad) ninguna de las deleciones es inestable (Expasy Tools – ProtParam), experimentalmente existe una notable disminución en la cantidad de las proteínas mutantes en comparación con la silvestre, con excepción de SepD150 (Figura Anexo-1A). Esto lo atribuimos a un problema de conformación en las mutantes que las lleva a una mayor degradación.

El posible plegamiento anómalo de las mutantes de SepD puede ocasionar que aunque sean capaces de interactuar con SepL, generen cambios conformacionales en ésta, alterando su correcto funcionamiento, basándonos en la hipótesis de que SepD podría ser una especie de chaperona. Otra opción es que ya no es capaz de localizar correctamente a SepL en la membrana, por lo cual, ésta ya no puede llevar cabo su función. Apoyando esta hipótesis existen resultados que muestran que en ausencia de SepD, SepL pierde su distribución normal dentro de la célula (41) y mediante la predicción de dominios (PredictProt), encontramos que SepL presenta un dominio transmembranal putativo en el extremo amino terminal, lo cual también podría explicar porque la fusión GST-SepL no fue capaz de complementar una cepa de EPEC $\Delta sepL$.

Ambas hipótesis anteriores involucran a SepL de alguna manera, pero tampoco se puede descartar la posibilidad de que esta incapacidad para complementar de las deleciones, se deba a que al perder su conformación, pierdan la interacción con alguna otra proteína de LEE o relacionada con el SST3. Un posible candidato puede ser Orf16 (proteína designada igual tanto en EPEC como en EHEC), ya que una cepa de *C. rodentium* $\Delta orf16$, presenta un perfil de secreción similar a una $\Delta sepL$ o $\Delta sepD$ (11); y en el caso específico de este trabajo, a la SepD30. Otros posibles candidatos son las proteínas efectoras, dado que se observó que probablemente interactúen con SepD (datos no mostrados).

Un resultado positivo que se obtuvo, es la interacción que presenta SepD consigo misma, ya que ésta se observó tanto en ensayos de pulldown como en ensayos de coexpresión-copurificación (Figura 11). Lo que no se sabe es cuál es el estado de oligomerización funcional de SepD, para lo cual se requiere hacer ensayos de estados de oligomerización. Nosotros suponemos que la forma funcional de SepD es la de homodímero, basándonos en que en los patógenos A/E hasta el momento no existe ningún homólogo ya sea de YscB como de SycN, ambas chaperonas de YopN de *Yersinia* (10), por lo que SepD podría estar jugando el papel de ambas proteínas.

Al intentar mapear el sitio de interacción SepD-SepD, se obtuvo que ninguna deleción perdió la interacción (Figura 11B). Las explicaciones de este resultado son las mismas que para el caso SepL-SepD

Con la idea de que el papel de SepD puede ser el de chaperona de SepL, se hicieron ensayos de expresión proteica en fondos EPEC $\Delta sepL$ o $\Delta sepD$, en los

cuales además de incluir a SepL y a SepD, se incluyeron también a Tir y EspA como representantes de proteínas efectoras y translocadoras, respectivamente. Se observó que la cantidad de SepD en ausencia de SepL, tiene un notable aumento, mientras que la cantidad de SepL en ausencia de SepD, aparentemente no se altera (Figuras 12A y 12B, respectivamente). Este resultado va en contra de la hipótesis de que SepD pudiera ser la chaperona de SepL, pues parece ser que SepD requiere de SepL para su regulación. Pensamos que este aumento en la cantidad de proteína se debe a un aumento de la transcripción, lo que se discutirá más adelante.

Para el caso de EspA se puede observar un ligero incremento, pero este puede ser explicado debido a que en EPEC $\Delta sepL$ o $\Delta sepD$, la secreción de las translocadoras se abate completamente, por lo cual sería lógico pensar que se acumula intracelularmente. Algo que nos llamó mucho la atención fue el notable incremento que se presentaba en Tir en ambos fondos, ya que hay que tener en cuenta que a diferencia de EspA, la cantidad de Tir extracelular en estas cepas es significativamente mayor en comparación con una cepa silvestre (34)(Figura 12).

Se determinó que este aumento en la cantidad de Tir, se debe, por lo menos en parte, a un incremento en la transcripción de LEE5 (operón donde se encuentra *tir*) (Figura 13), dato que contradice directamente los resultados de Deng *et al*, 2005, en los cuales se concluyó que la transcripción de *tir* no se afectaba en los fondos EPEC $\Delta sepL$ o $\Delta sepD$. Las diferencias observadas entre este trabajo y el de Deng posiblemente se deban a que ellos utilizaron muestras de un cultivo de EPEC crecido en estático y con 5% de CO₂, en el cual podrían estar actuando otros reguladores como PerC (31), mientras que nuestros cultivos se crecieron en agitación. Otra situación que podría estar pasando, es que en estático las cepas crecen más lento, y dado que Deng no muestra D.O. sino tiempo, probablemente se podría encontrar en estadios tempranos de crecimiento (<1 DO), donde la diferencia de expresión no es tan marcada (Figura 13, antes de las 4 horas). Algo importante a notar, es que, el incremento en la expresión de Tir empieza a ser más claro después de las 3 horas (>0.8 D.O), pero la cantidad de Tir intracelular ya es notablemente mayor desde las 2 horas, lo cual nos podría indicar que haya también aumento en la traducción de Tir, o un retraso en su secreción.

Espero a este punto que se estén preguntando, el por qué de mi insistencia en Tir, la respuesta es muy sencilla. Existen antecedentes que muestran que hay un orden en la secreción de las proteínas efectoras, donde Tir es la primera en ser secretada y una vez que se encuentra afuera de la bacteria, se empiezan a

secretar las demás efectoras (32), también se ha observado que en una cepa de EPEC $\Delta sepD\Delta tir$, la secreción de las efectoras, se abate completamente (39). Unido a esto, recientemente se observó que el extremo carboxilo de SepL (homólogo a TyeA de *Yersinia*), interactúa con Tir (41), lo cual sugiere que Tir es un elemento de vital importancia para la jerarquización del SST3. En donde SepL estaría secuestrando a Tir, impidiendo así su salida, y por lo tanto la de las demás proteínas efectoras. Ya armado el translocón, habría una señal que permitiría a Tir liberarse de SepL, para poder ser secretada y así permitir la salida de las demás efectoras. Existen antecedentes que apoyan esta desregulación positiva, ya que se ha observado que en un fondo $\Delta sepD$, la transcripción de *nleI* y *nleH*, sufre un aumento de más o menos dos veces (16,29), lo cual es algo parecido a lo que se observa aquí para el caso de Tir. Con esto surge la pregunta de si este aumento es algo generalizado para las proteínas que tienen que ver con el SST3, cosa que parecería poco probable, dado que hay antecedentes que muestran que este no es el caso (12, 34, García-Angulo, comunicación personal); además, no tendría sentido aumentar la cantidad de las proteínas estructurales del SST3. Entonces, asumiendo que este fenómeno no es generalizado, surge la pregunta de si todos los efectores codificados dentro y fuera del LEE se ven afectados a nivel transcripcional en las mutantes $\Delta sepD$ y $\Delta sepL$.

En *S. flexneri*, MxiC (el homólogo de SepL), regula en parte la jerarquización debido a que impide la salida de la proteína efectora OspD1, la cual al encontrarse en el citoplasma funciona como anti-activador de MxiE, un regulador positivo para las proteínas efectoras de la familia IpaH y a VirA, pero no así para las proteínas translocadoras IpaB, IpaC e IpaD (2). Haciendo una búsqueda en el psi-BLAST, encontramos que MxiE tiene homología a una proteína reguladora putativa de EHEC y EPEC (ZP_02772682 y NP_289431.1, respectivamente) (Figura Anexo-4). Por su parte, OspD1, presenta homología a EspL de EHEC y EPEC (NP_311882 y YP_002330702.1, respectivamente) (Figura Anexo-5). Estos datos podrían dar una posible explicación al aumento en la transcripción observado, ya que en ausencia de SepL que atrape a Tir, EspL sería secretado permitiendo que el regulador putativo activara únicamente la transcripción de las efectoras. Una contradicción a este posible modelo de regulación, es que en *C. rodentium* no se encontraron homólogos a MxiE ni OspD1, lo cual complicaría la aplicación del modelo en ese organismo.

Lo que aporta este trabajo, aun no es suficiente para poder entender los mecanismos por los cuales SepL y SepD (posiblemente también Orf16) llevan a cabo su función en la jerarquización de proteínas. Pero con la información

existente hasta el momento, parecería ser que el rol principal en el control de la secreción de efectoras lo estaría jugando SepL al atrapar a Tir, y SepD jugaría más bien un rol secundario apoyando a la función de SepL de alguna manera o podría estar realizando un papel parecido al de SepL pero para el caso de las proteínas translocadoras.

Perspectivas

Este trabajo plantea nuevas perspectivas, por lo que para ir delimitando y esclareciendo algunas de éstas, considero que sería necesario probar como es la transcripción de los demás operones de LEE (incluyendo *grlRA* y *map*) en un fondo $\Delta sepL$ y $\Delta sepD$. En todos los casos, en particular LEE5 ya que en éste el aumento en la transcripción es claro, sería necesario probar si complementando a estas cepas mutantes, los niveles transcripcionales se restauran a niveles silvestres. Con los antecedentes antes mostrados, pienso que sería de utilidad hacer dobles y triples mutantes en los genes homólogos a MxiE y OspD1, ambos en fondos $\Delta sepL$ y $\Delta sepD$, con la finalidad de esclarecer su papel.

La estrategia de hacer deleciones consecutivas a lo largo de toda la proteína, no resultó como se esperaba. Por lo que deleciones en zonas hidrofóbicas, hidrofílicas o en zonas con estructura secundaria predicha, podrían resultar más ilustrativas sobre el funcionamiento de la proteína.

Otra manera de abordar la “disección” de SepD, sería haciendo mutaciones puntuales a lo largo de SepD. Esto probablemente también resulte infructuoso, si en efecto SepD tiene más de 2 sitios o sitios muy grandes de unión a SepL, pero yo no recomiendo hacer recortes más grandes, pues los recortes de 15 aminoácidos, vuelven inestable a la proteína.

Tomando como idea que SepD probablemente le dé localización a SepL, se podría hacer un fraccionamiento celular en donde se delimiten las fracciones de periplasma, citoplasma, membrana interna y membrana externa, similar al que hizo Deng (12), esperando que SepL pierda su localización silvestre en un fondo $\Delta sepD$, pero no así SepD en un fondo $\Delta sepL$.

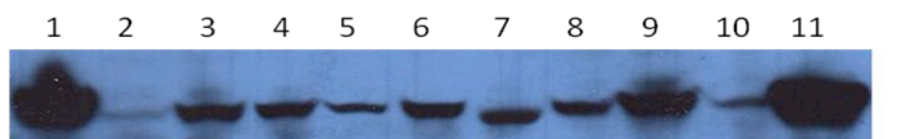
Probar interacciones entre SepD o SepL con otras proteínas del SST3 creo que también podría resultar en algo positivo. En específico se me ocurren Orf16 y CesAB, la primera dado que su fenotipo es similar al de una $\Delta sepL$ o $\Delta sepD$, y arriesgadamente se me ocurre que ésta podría interactuar con SepL; la segunda se basa en que si las proteínas efectoras tienen un orden de salida, y sería lógico pensar que las translocadoras también lo tienen, considerando que el filamento EspA es necesario para poder llegar a la membrana de la célula hospedera, para

la posterior formación de la puerta (EspBD). La pregunta aquí sería ¿por qué CesAB y no EspA?, la respuesta se encuentra en que en una cepa EPEC $\Delta espA$, aun se secretan EspB y EspD; por lo que cabe la posibilidad de que en ausencia de EspA, la chaperona siga manteniendo su función ya que su interacción con EspB no se afectaría.

Seria novedoso transformar a una cepa EPEC WT con un plásmido inducible que contenga a Tir. La idea de esto, es que si la jerarquización se basa únicamente en que SepL secuestre a Tir, cosa poco probable, si existiera un exceso de Tir donde SepL ya no fuera capaz de secuestrarlo, entonces en dicha cepa se observaría un fenotipo similar al encontrado en una $\Delta sepL$ o $\Delta sepD$.

Anexo

A)



B)

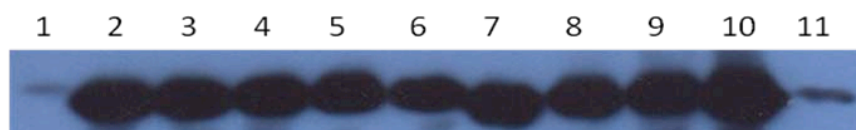


Figura Anexo-1. Expresión de SepD y sus mutantes.

Ambas figuras son Western blot α -GST. A) Expresión de las fusiones de SepD y las mutantes en un fondo EPEC crecidas en DMEM. B) Expresión de SepD y las mutantes en un fondo EPEC donde está inducida la expresión de LEE (DMEM), a los carriles del 2-10 se les agregó 0.2mM de IPTG desde el inicio del crecimiento, los carriles 1 y 11, se ven más tenues en comparación con A) dado que el tiempo de exposición de B) fue menor. Los carriles son 1: GST-SepD, 2: GST-SepD15, 3: GST-SepD30, 4: GST-SepD45, 5: GST-SepD60, 6: GST-SepD75, 7: GST-SepD90, 8: GST-SepD105, 9: GST-SepD120, 10: GST-SepD135, 11: GST-SepD150.

	1	2	3
GST	-	+	-
GST-SepD	+	-	-
SsrB-FLAG	+	+	+

Figura Anexo-2. GST-SepD no interactúa inespecíficamente con la etiqueta de FLAG

Western blot α -FLAG. En el carril 3 sólo se cargó el extracto que contenía a SsrB-FLAG. Este ensayo se realizó de igual manera los ensayos de pulldown de las mutantes de SepD vs SepL-FLAG. + significa presencia, - ausencia.

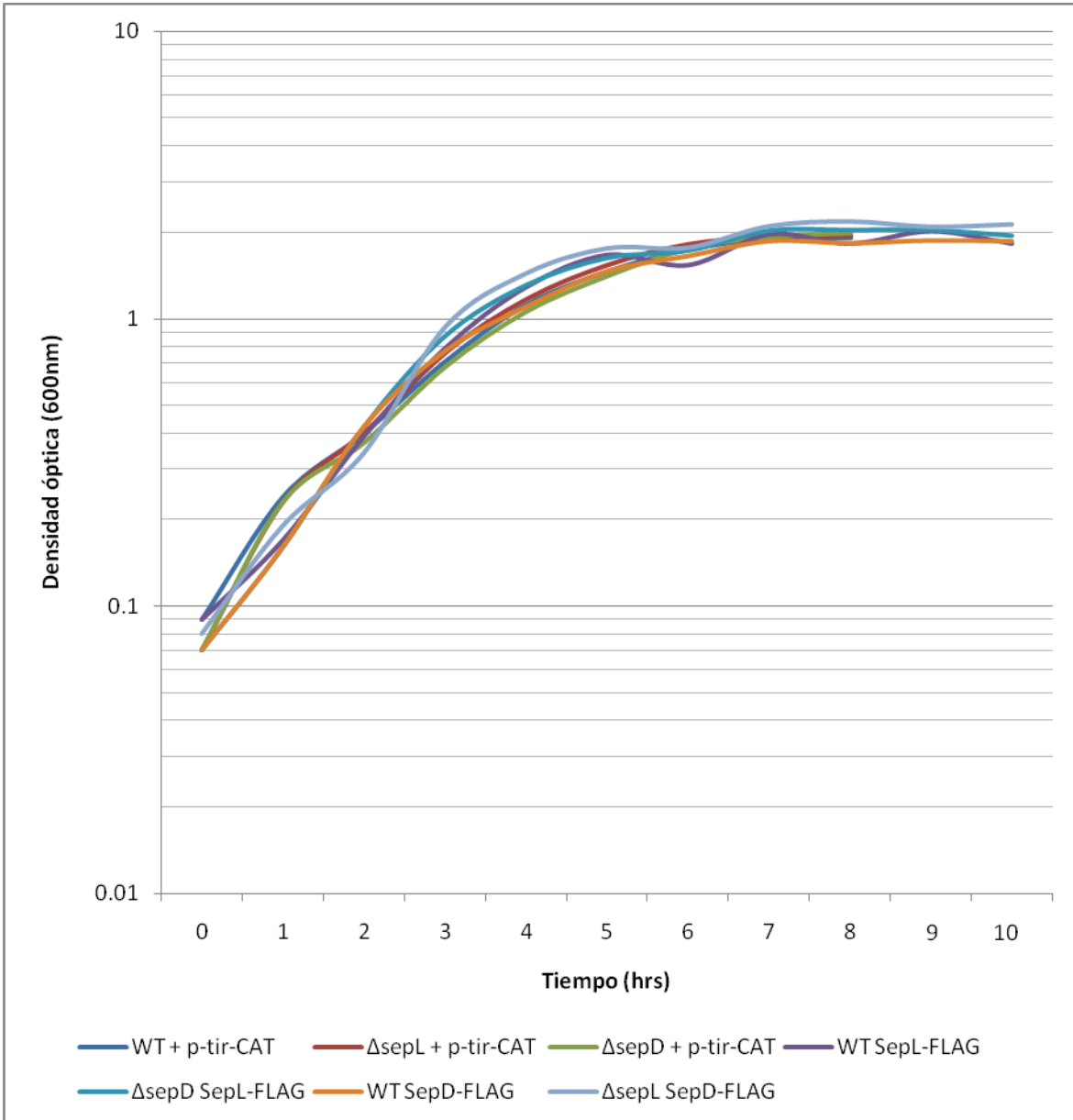


Figura Anexo-3. Comparación del crecimiento de las cepas utilizadas para los ensayos de expresión de SepL y SepD y expresión de las fusiones transcripcionales *tir-cat*.

```

EHEC      MIEEGLLLPMNVLLQGQKLTLLDPEMWFRLGNENKDVTLVITIGNNHQKLMVVEDILLI 60
EPEC      MIEEGLLLPMNVLLQGQKLTLLDPEMWFRLGNENKDVTLVITIGNNHQKLMVVEDILLI 60
MxiE      -----MEGFFV 7
                                         : : : :

EHEC      DRSQIEVTAGKVIYHPLRIDILSKLLAFIDESTGSSVEREHHELFADALPFASEVVLFS-- 118
EPEC      DRSQIEVTAGKVIYHPLRIDILSKLLAFIDESTGSSVEREHHELFADALPFASEVVLFS-- 118
MxiE      RNQNIKFSDNVNYHYRFNINSCAKFLAFWDYFSGALVEHSHAECIHFYHENDLRDSCNT 67
          ..*:.. .  :: :.*:  :*:*** *  :*:.. *  .  :  .  : :  .

EHEC      KVASEAWFLATYLSSDNINEILFQHLRKTECYKLVRYLLS--QSLIQTSLYDLGELYGVS 176
EPEC      KVASEAWFLATYLSSDNINEILFQHLRKTECYKLVRYLLS--QSLIHTSLYDLGELYGVS 176
MxiE      ESMLDKLMLRFIFSSDQNVSNALAMIRMTESYHLVLYLLRTIEKEKEVRIKSLTEHYGVS 127
          :  :  :*  :***:  .  :  :*  **.*:**  ***  :.  ..  :  .*  *  ****

EHEC      YSHFRRLCSYALGGKVKTELCGWRVARAVLEIIEGNSDMTTIAHKYGYSSSSSHFSAEVKS 236
EPEC      YSHFRRLCSYALGGKVKTELCGWRVARAVLEIIEGNSDMTTIAHKYGYSSSSSHFSAEVKS 236
MxiE      EAYFRSLCRKALGAKVKEQLNTWRLVNGLLDVFLHNQTITSAAMNNGYRSTSHFSNEIKT 187
          ::*  **  ***.***  :*  **:.....*:::  *.  **:  *  :  **  *:****  *:*:

EHEC      RLGKTPRELCKKL----- 249
EPEC      RLGKTPRELCKKL----- 249
MxiE      RLGFSARELSNITFLVKKINEKI 210
          ***  :.***.:

```

Figura Anexo-4. Alineamiento de MxiE con sus homólogos en EHEC y EPEC. A la izquierda se encuentra el nombre de la proteína, para el caso de EHEC y EPEC en vez de utilizar el número de la proteína, se usó su procedencia. El programa utilizado para hacer esto, fue el ClustalW2 con los valores que tiene por omisión.

```

EHEC      MPIINKSASNYVEYISKMNPPYLSKKRDASINLNGKVSDCNGEIIWCRHIASYWSEFFCS 60
EPEC      MPIINKSASNYVEYISKMNPPYLSKKRDASINLNGKVSDCNGEIIWCRHIASYWSEFFCS 60
OspD1     -----

EHEC      NSGKIDYETFSSPQLLSKAIVIQENKGTNNIKGDVYFVENESWGSVIYNLFLQLEKENKS 120
EPEC      NSGKIDYETFSSPQLLSKAIVIQENKGTNNIKGDVYFVENESWGSVIYNLFLQLEKENKS 120
OspD1     -----

EHEC      HTSLEVHSPGHAMALGIKIKNDKENKFVINFYDPNQTATHKRVFFCTNNICDIINLTAYD 180
EPEC      HTSLEVHSPGHAMALGIKIKNDKENKFVINFYDPNQTATHKRVFFCTNNICDIINLTAYD 180
OspD1     ---MSINN-----YGLHPANNKMMHLIIGSNTANENKGMK-----NNIINVTN----- 40
          :...      *:: *:*: :::* .*: . *      *** :: *

EHEC      FLSEQCLKCYGLKEDTSLFVDKTKSMDNNMNVFIKKLPDNLQGVVINFAMGAGLREIIK 240
EPEC      FLSEQCLKCYGLKEDTSLFVDKTKSMDNNMNVFIKKLPDNLQGVVINFAMGAGLREIIK 240
OspD1     -----TAISHAINEEKSGG----- 55
          ::* ::: **...

EHEC      KVYNDTRFTDLTKSQ-MKILCESKNVNMVPGLLLLALQNGHDNVIDEYGTLIKKSNLNKEE 299
EPEC      KVYNDTRFTDLTKSQ-MKILCESKNVNMVPGLLLLALQNGHDNVIDEYGTLIKKSNLNKEE 299
OspD1     --YSGVSRFKLAKIQNISIPTKNNKEYNRHNLFSLIWHGNADAARKYSESLAAEIPKEE 113
          *... * .:* * * :.* ::: * .*: : :*: :. :*. : ::: ***

EHEC      LIHILSARTLDGTIPGLYQALQNGHAQAIKSYGNLVLDTINKNIDLEYLLSAFKYEAHSS 359
EPEC      LIHILSARTLDGTIPGLYQALQNGHAQAIKSYGNLVLDTIDKNIDLEYLLSAFKYEAHSS 359
OspD1     KLEVLAAARNMAG----- 125
          :.:**.*. *

EHEC      NKYTPGLFSAFQNGHADAIAKAYCVLGNMNLKRGEIIRMLEARNYDGAPELLLAYQNGDI 419
EPEC      NKYTPGLFSAFQNGHADAIAKAYCDVLGNMNLTRGEIIRMLEARNYDGAPELLLAYQNGDI 419
OspD1     ---ESALFIALQEGHSAAIQAYGDFIKTFLSPKETIKLLDVRDMEGLPGLFLAAGKGMNI 182
          ..** *:::**: **:* . . :.* * *::*.*: :* **:* ** :*:

EHEC      NTIQSFFDSLIMLDISKDFIEELLTAKHYDFTGLSLAISHRHDHVVKLYGKLFKKLDTSP 479
EPEC      NTIQSFFDSLIMLDISKDFIEELLTAKHYDFTGLSLAISHRHDHVVKLYGKLFKKLDTSP 479
OspD1     EAMMAYIN-----ICHHSG----- 196
          ::: ::::      *.*: .

EHEC      YKMSIILALAI DCERNNANI IIDSEYKSNKAVKEYVEILKEFNICPEKVAEYLSEFSGKH 539
EPEC      YKMSIILALAI DCERNNANI IIDSEYKSNKAVKEYVEILKEFNICPEKVAEYLSEFSGKH 539
OspD1     ----IKLTEIADRLNNE-----QDMFNII SDKIQELF----- 225
          * * : * .**      . *** .:*: * :

EHEC      FLDVYNYYSN 549
EPEC      FLDVYNYYSN 549
OspD1     -----

```

Figura Anexo-5. Alineamiento de OspD1 con sus homólogos en EHEC y EPEC.

A la izquierda se encuentra el nombre de la proteína, para el caso de EHEC y EPEC en vez de utilizar el número de la proteína, se usó su procedencia. El programa utilizado para hacer esto, fue el ClustalW2 con los valores que tiene por omisión.

Referencias

1. Andrade, A., Pardo, J., Espinosa, N., Pérez-Hernández, G. y González-Pedrajo, B. (2007). Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **468**: 121–127.
2. Botteaux, A., Sory, M., Biskri, L., Parsot, C. y Allaoui, A. (2009). MxiC is Secreted by and Controls the Substrate Specificity of the *Shigella Flexneri* Type III Secretion Apparatus. *Molecular Microbiology*. **71**(2): 449–460.
3. Bustamante, V., Martínez, L., Santana, F., Knodler, L., Steele-Mortimer, O. y Puente, J. (2008). HilD-mediated Transcriptional Cross-talk Between SPI-1 and SPI-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**: 14591-14596.
4. Casadaban, M. (1976). Transposition and Fusion of the *lac* Genes to Selected Promoters in *Escherichia coli* Using Bacteriophage lambda and Mu. *Journal of Molecular Biology*. **104**: 541-555.
5. Casadaban, M. y Cohen S. (1980). Analysis of Gene Control Signals by DNA Fusion and Cloning in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. **138**(2): 179-207.
6. Creasey, E., Delahay, R., Daniell, S. y Frankel, G. (2003). Yeast Two-Hybrid System Survey of Interactions between LEE-Encoded Proteins of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*. **149**: 2093–2106.
7. Daniel, A., Singh, A., Crowther, L., Fernandes, P., Schreiber, W. y Donnenberg, M. (2006). Interaction and Localization Studies of Enteropathogenic *Escherichia coli* Type IV Bundle-Forming Pilus Outer Membrane Components. *Microbiology*. **152**: 2405–2420.
8. Datsenko, K. y Wanner, B. (2000). One-step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia coli* K-12 Using PCR Products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**(12): 6640-6645.
9. Davanloo, P., Rosenberg, A., Dunn, J. y Studier, F. (1984). Cloning and Expression of the Gene for Bacteriophage T7 RNA Polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **81**(7): 2035-2039.
10. Day, J y Plano, G. (2002). A Complex Composed of SycN and YscB Functions as a Specific Chaperone for YopN in *Yersinia Pestis*. *Molecular Microbiology*. **30**(4): 777-788.
11. Deng, W. *et al.* (2004). Dissecting Virulence: Systematic and Functional Analyses of a Pathogenicity Island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**(10): 3597–3602.
12. Deng, W. *et al.* (2005). Regulation of Type III Secretion Hierarchy of Translocators and Effectors in Attaching and Effacing Bacterial Pathogens. *Infection and Immunity*. **73**(4): 2135–2146.
13. Echtenkamp, F. *et al.* (2008). Characterization of the NleF effector protein from attaching and effacing bacterial pathogens. *FEMS Microbiology Letters*. **281**: 98–107.
14. Filloux, A., Hachani, A. y Bleves. S. (2008). The Bacterial Type VI Secretion Machine: Yet Another Player for Protein Transport Across Membranes. *Microbiology*. **154**: 1570–1583.
15. Gal-Mor, O. y Finlay, B. (2006). Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology*. **8**(11): 1707–1719.
16. García-Angulo, V., Deng, W., Thomas, N., Finlay, B. y Puente, J. (2008). Regulation of Expression and Secretion of NleH, a New Non-Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Effector in *Citrobacter rodentium*. *Journal of Bacteriology*. **190**: 2388-2399.
17. Garmendia, J., Frankel, G. y Crepin, V. (2005). Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Infection and Immunity*. **73**(5): 2573–2585.

18. Gómez, Diana. (2004). Estudio de la interacción del activador transcripcional PerA con el dominio carboxilo terminal de la subunidad α de la RNAP en *Escherichia coli* enteropatógena. Tesis de licenciatura. UAEM.
19. Goss, J., Sorg, J., Ramamurthi, K., Ton-That, H. y Schneewind, O. (2004). The Secretion Signal of YopN, a Regulatory Protein of the Yersinia enterocolitica Type III Secretion Pathway. *Journal of Bacteriology*. **186**(18): 6320–6324.
20. Gruenheid, S. *et al.* (2004). Identification and characterization of NleA, a non-LEE encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*. **51** (5): 1233–1249.
21. Hamad, M. y Nilles, M. (2007). Roles of YopN, LcrG and LcrV in Controlling Yops Secretion by *Yersinia pestis*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **603**: 225-234.
22. Hayashi. T. Breaking the Barrier between Commensalism and Pathogenicity. *Science*. **313**: 772-773.
23. Huang, D., Mohanty, A., DuPont, H., Okhuysen, P. y Chiang, T. (2006). A Review of an Emerging Enteric Pathogen: Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. **55**: 1303–1311.
24. Joseph, S. y Plano, G. (2007). Identification of TyeA Residues Required to Interact with YopN and to Regulate Yop Secretion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **603**: 235-245.
25. Kaelin, W., *et al.* (1992). Expression and Cloning of a cDNA Encoding a Retinoblastoma-binding Protein with E2F-like Properties. *Cell*. **70**(2): 351-364.
26. Kaper, J., Nataro, P. y Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. **2**:123–140
27. Kresse, A. *et al.* (2000). Characterization of SepL of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **182**(22): 6490–6498.
28. Levine, M., Bergquist, E., Nalin, D., Waterman, D., Hornick, R., Young, C. y Sotman, S. (1978). *Escherichia coli* Strains that Cause Diarrhea but do not Produce Heat-labile or Heat-stable Enterotoxins and are Non-invasive. *Lancet*. **i**: 1119–1122.
29. Li, M., Rosenshine, I., Bing Yu, H., Nadler, C., Mills, E., Leong Hew, C. y Yin Leung, K. (2006) Identification and Characterization of NleI, a New Non-LEE-encoded Effector of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Microbes and Infection*. **8**: 2890-2898
30. Luo, Y., *et al.* (2000). Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature*. **405**: 1073-1077.
31. Mellies, J., Barron, A. y Carmona, A. (2007). Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Gene Regulation. *Infection and Immunity*. **75**(9):4199–4210.
32. Mills, E., Baruch, K., Charpentier, X., Kobi, S. y Rosenshine, I. (2008). Real-Time Analysis of Effector Translocation by the Type III Secretion System of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Host Microbe*. **3**(2):104-113.
33. Nataro, P. y Kaper, J. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. **11**(1): 142–201.
34. O'Connell, C. *et al.* (2004). SepL, a Protein Required for Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III Translocation, Interacts with Secretion Component SepD. *Molecular Microbiology*. **52**(6): 1613–1625.
35. 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*. **5**: 9.
36. Sánchez-San Martín, C., Bustamante, V., Calva, E. y Puente, J. (2001). Transcriptional Regulation of the orf19 Gene and the *tir-cesT-eae* operon of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **183**(9): 2823-33.
37. Savage, D. (2001). Microbial Biota of the Human Intestine: A Tribute to Some Pioneering Scientists. *Current Issues Intestine Microbiology*. **2**(1): 1-15.

38. Schubert, S. *et al.* (2009) Role of Intraspecies Recombination in the Spread of Pathogenicity Islands within the *Escherichia coli* Species. *PLoS Pathogens*. **5**(1): e1000257.
39. Thomas, N., Deng, W., Baker, N., Puente, J. y Finlay, B. (2007). Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. **282**(40): 29634-29645.
40. Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. y Bossi, L. (2001). Epitope Tagging of Chromosomal Genes in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **26**: 15264–15269.
41. Wang, D., Roe, A., McAteer, S., Shipston, M. y Gally, D. (2008). Hierarchical Type III Secretion of Translocators and Effectors from *Escherichia coli* O157:H7 Requires the Carboxy Terminus of SepL that Binds to Tir. *Molecular Microbiology*. **69**(6): 1499–1512.
42. Wexler, H. (2007). Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clinical Microbiology Reviews*. **20**(4): 593–621.
43. Whittam, T. y McGraw, E. (1996). Clonal Analysis of EPEC Serogroups. *Revista de Microbiologia*. **27**(1): 7-16.