



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Purificación de complejos efector-chaperona y su
reconocimiento por la ATPasa del sistema de secreción tipo III
de *Escherichia coli* enteropatógena”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

BIÓL. MIGUEL ÁNGEL DÍAZ GUERRERO

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO**

CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO DE 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 325 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 81847 de CONACYT y el IN224708 de la DGAPA, UNAM, así como un apoyo complementario de la Fundación Miguel Alemán. Para la realización de este trabajo conté con una beca de CONACyT.

Un hombre bien constituido siempre hace bien a nuestros sentidos, está tallado de una madera que es a la vez dura, suave y olorosa. A él le gusta sólo lo que le resulta saludable, su agrado, su placer, cesan cuando se ha rebasado la medida de lo saludable. Saca ventajas de sus contrariedades; lo que no lo mata lo hace más fuerte. Instintivamente forma su síntesis con todo lo que ve, oye, vive; es un principio de selección que deja caer al suelo muchas cosas. Se encuentra siempre en su compañía, se relaciona con libros, con verdaderos hombres y paisajes. Él honra al elegir, al admitir, al confiar. Reacciona con lentitud a toda clase de estímulos, con aquella lentitud que una larga cautela y un orgullo querido le han inculcado, examina el estímulo que se acerca, está lejos de salir a su encuentro. No cree ni en la desgracia ni en la culpa, liquida los asuntos consigo mismo, con los demás, sabe olvidar, es lo bastante fuerte para que todo tenga que ocurrir de la mejor manera para él.

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Bertha González Pedrajo, por confiar en mí desde aquel día que llegue a su laboratorio, incluso en las ocasiones en que me sentí incapaz de llevar a buen término mis estudios. Porque sin importar lo atrasado y desorganizado que éste mi trabajo siempre está dispuesta a dedicarle su tiempo para darle una “última checadita”. Gracias por todo Doc.

Al excelente apoyo técnico de Dra. Norma Espinosa Sánchez, por su invaluable ayuda y buenos consejos durante la realización de este proyecto.

A los revisores de este trabajo: Dr. Diego González Halphen, Dra. Yolanda López Vidal, Dra. Xóchitl Pérez Martínez, Dr. Roberto Coria Hernández y Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, por las aportaciones que contribuyeron a mejorar este trabajo.

A la Dra. Laura Ongay Larios y a toda la Unidad de Biología Molecular del IFC por su apoyo técnico.

Al Ing. Juan Barbosa y a toda la Unidad de Cómputo del IFC por su apoyo técnico.

A mis papás: por el infinito amor que me brindan, por inculcarme muchos de los valores con los que trato de conducir mi vida. Los amo.

A mis entrañables amigos: Ángel, Josué, Raúlito, Mesi, Mariana, Julia, Ely, Erika, Luis Manuel, Claus, Dulce, Gama, Edgar y Esther por estar cerca de mí y dejar una huella invaluable en mi vida.

A Lalo, Amde, Alexia y Paola: por demostrarme cariño y buenos deseos siempre.

A los que siempre se preocupan y ocupan de mí: Susana, Rosa, Blanca, Paty, Lety, Estela, Abel, Javier, Agustín y Pedro por tanto cariño sincero y buenas atenciones que me han mostrado siempre.

A mis mujeres queridas: Margarita, Ángela, Michu, Fany, Caty, Marina, Legnis, Eyle, Cen y Fer.

Al escuadrón de la muerte: Eduardo, Ricardo, Adrián, Martín y Liam, por los buenos consejos y momentos que hemos compartido durante aquellas sesiones de domino en los últimos meses.

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México a través del Instituto de Fisiología Celular, que sin lugar a dudas es uno de los mejores sitios que tiene la UNAM para enseñar.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	1
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena	2
Sistema de secreción tipo III de EPEC	3
La ATPasa del SST3	7
Secreción de proteínas vía SST3	9
Las chaperonas del SST3	10
Las funciones de los efectores del SST3	12
Locus de eliminación enterocítica	17
ANTECEDENTES	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
Clonación de los genes	25
Construcción de plásmidos bicistrónicos	28
Preparación de células competentes con CaCl ₂	29
Transformación de células competentes con DNA plasmídico	30
Sobreproducción y purificación de proteínas recombinantes	30
Cromatografía de afinidad de proteínas fusionadas a histidinas	31
Cromatografía de afinidad de proteínas fusionadas a la glutatión S transferasa (GST)	31
Cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford	32
Ensayo de inmunodetección	32
Identificación de interacciones proteína-proteína	33
Inmunorréplica de afinidad tipo Western (<i>Affinity Blot</i>)	33
Ensayo de copurificación por cromatografía de afinidad (<i>Pull Down</i>) a níquel	34
Ensayo de copurificación por cromatografía de afinidad (<i>Pull Down</i>) a glutatión de chaperonas o complejos efector-chaperona fusionados a histidinas, con GST-EscN	34

RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	65
PERSPECTIVAS	66
LITERATURA CITADA	67

Purificación de complejos efector-chaperona y su reconocimiento por la ATPasa del sistema de secreción tipo III de *Escherichia coli* enteropatógena

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es la principal causa de diarrea infantil en países en vías de desarrollo. Este patógeno utiliza un sistema de secreción tipo III (SST3) para inyectar proteínas efectoras directamente en el citoplasma de la célula hospedera, las que interfieren con diversas vías de señalización generando diarrea. El ensamblaje del SST3 y la secreción de proteínas a través de éste, requieren de una ATPasa específica que participa en el reconocimiento y direccionamiento de los complejos efector-chaperona hacia la base del aparato de secreción. Se ha propuesto que la energía de hidrólisis de ATP generada por esta enzima sirve para disociar al complejo efector-chaperona y que la fuerza motriz se encarga de desplegar al efector para que sea secretado a través del reducido canal formado por el SST3. En este trabajo se evaluó y demostró la interacción del complejo efector-chaperona Tir-HisCesT con la ATPasa EscN mediante ensayos de copurificación tipo *pull down*. Se analizaron en los ensayos de interacción tres mutantes puntuales en el C-terminal de EscN que no restauran la secreción de proteínas en una cepa Δ escN, a pesar de hidrolizar ATP como la enzima silvestre. Las tres mutantes de EscN mantienen la capacidad de interactuar con Tir-HisCesT lo que sugiere que la pérdida de función de éstas no se debe a su incapacidad para interactuar con los complejos efector-chaperona.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas constituyen uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, que afecta principalmente a países en vías de desarrollo en los que se observa una alta mortandad en niños menores de 5 años (Alper, 2003). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, cada año se producen en todo el mundo cerca de 3 millones de muertes asociadas a infecciones gastrointestinales (Paniagua y col. 2007). Si bien diversos grupos de virus, parásitos y bacterias están implicados con el desarrollo de dichas enfermedades, el principal agente etiológico de diarrea en humanos es *Escherichia coli*. Dentro de las diferentes cepas de ésta, la principal patovariedad asociada con diarrea infantil es *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) (Ochoa y col. 2008). En este sentido, se ha reportado que en países como Brasil, México y Sudáfrica, EPEC constituye la principal causa de diarrea infantil, y diversos

estudios clínicos han demostrado que entre el 30 y 40% de los casos son causados por este microorganismo (Chen, 2005).

***Escherichia coli* enteropatógena**

EPEC induce la formación de una lesión histopatológica intestinal conocida como lesión de adherencia y eliminación (lesión A/E), que se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades del epitelio intestinal y la adherencia íntima de la bacteria con el enterocito. Se propone que la patogénesis de EPEC sigue un modelo de tres etapas (Fig. 1). En la etapa más temprana, la bacteria utiliza una fimbria de 7 nm de diámetro y 14 a 20 μ m de longitud, compuesta de pilus tipo IV entrelazados, que se denomina BFP (*Bundle-Forming Pilus*); para formar agregados bacterianos y como mecanismo de adhesión inicial con las células epiteliales. Una vez adherida, en una segunda etapa EPEC comienza la inyección de proteínas de virulencia a través del sistema de secreción tipo III (SST3), directamente hacia el citosol de la célula eucarionte. Estas proteínas efectoras de virulencia alteran diversas vías de señalización causando cambios drásticos en el citoesqueleto de la célula hospedera como son la acumulación y polimerización de actina. Finalmente, en la tercera y última etapa de infección, se establece un contacto íntimo entre la bacteria y el enterocito, lo que promueve que diferentes proteínas del citoesqueleto (principalmente la actina), se recluten al sitio en donde la bacteria hizo contacto y ensamblen una estructura parecida a un pedestal en la que la bacteria permanece firmemente adherida (Fig. 1) (Kaper y Nataro 1998; Kaper y col. 2004; Ochoa y col. 2008).

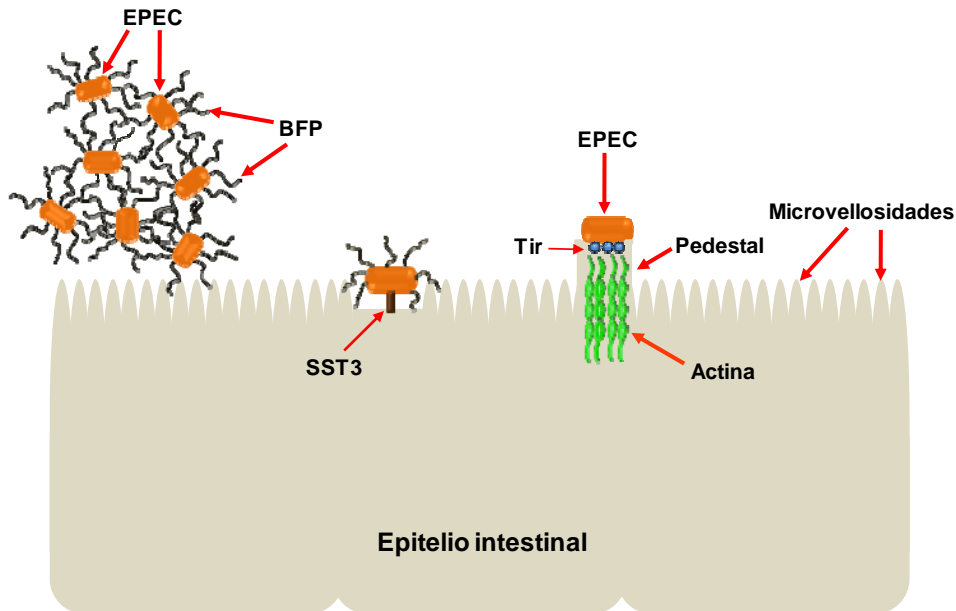


Figura 1. Lesión A/E de EPEC. Esquema de las etapas de formación de la lesión A/E, donde se observa la adhesión inicial a través de la fimbria BFP y la formación de microcolonias; el SST3 y el reclutamiento de actina en la base del pedestal (modificada de Kaper y col., 2004).

Sistema de secreción tipo III de EPEC

Como se mencionó, la capacidad infectiva de EPEC y la formación de la lesión A/E dependen de la secreción de proteínas a través del SST3, al que también se le denomina inyectisoma. A través de éste se introducen diversas proteínas efectoras directamente al citoplasma de la célula eucarionte. El SST3 de EPEC es un complejo macromolecular constituido por al menos 20 proteínas diferentes. La parte basal de esta estructura está conformada por un par de anillos embebidos en las membranas interna y externa de la bacteria conectados entre sí por un eje periplásmico (Fig. 2). El anillo de la membrana interna tiene un diámetro de 18 nm y una altura de 5.2 nm; y está formado por 24 subunidades de la proteína EscJ (Yip y col., 2005). La orientación del extremo N-terminal de EscJ hacia la cara periplásmica de la membrana interna y la falta de dominios transmembranales sugiere que el anillo no forma un poro en la membrana interna, sino que podría estar anclado sobre ésta y extenderse hacia el periplasma. El canal central de esta estructura mide aproximadamente 12 nm en su cara membranal y 37 nm en la

cara periplásmica. Se propone que el sitio donde se posiciona el anillo EscJ podría reclutar a los componentes membranales EscR, EscS, EscU y EscV que forman el aparato de secreción tipo III de EPEC (Yip y col., 2005). Por su parte, el anillo de membrana externa tiene un diámetro de 17 nm y está formado por la proteína EscC, que pertenece a la familia de las secretinas que mediante su oligomerización se insertan y forman poros en la membrana externa (Ogino y col., 2006). A pesar de que no se ha resuelto la estequiometría del anillo EscC, se cree que podría estar formado por entre 12 y 14 subunidades con un canal interno de entre 5 y 10 nm (Yip y Strynadka, 2006).

Sobre el cuerpo basal se polimeriza una estructura extracelular denominada aguja (formada por monómeros de la proteína EscF), que se ensambla helicoidalmente para formar una estructura cilíndrica hueca con un diámetro interno de 2 a 3 nm (Wilson y col., 2001) (Fig. 2).

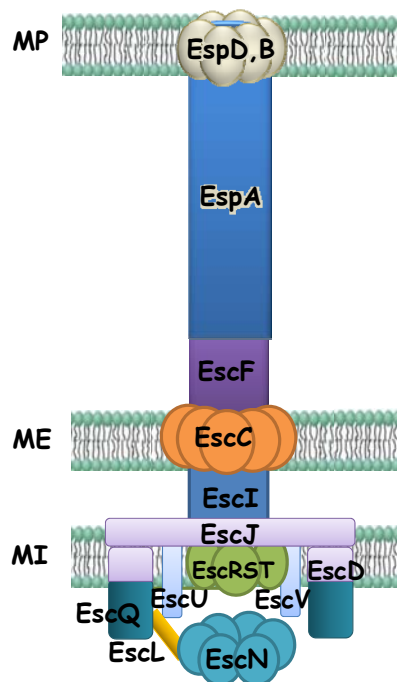


Figura 2. Esquema del SST3 de EPEC en el que MP corresponde a la membrana plasmática de la célula infectada, ME y MI a la membrana externa e interna de la bacteria, respectivamente.

A diferencia de otros patógenos intestinales invasivos como *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella*, EPEC permanece como patógeno extracelular, por lo que su inyectisoma posee un largo filamento (formado por la proteína EspA) de aproximadamente 100 nm de longitud y 2.5 nm de diámetro interno, que se extiende a partir de la parte distal de la aguja (Fig. 2 y Fig. 3) (Sekiya y col. 2001). De esta forma, la aguja y el filamento funcionan como un canal de secreción a través del cual se transportan las proteínas de origen bacteriano hacia el interior de la célula intestinal (Daniell y col., 2001).

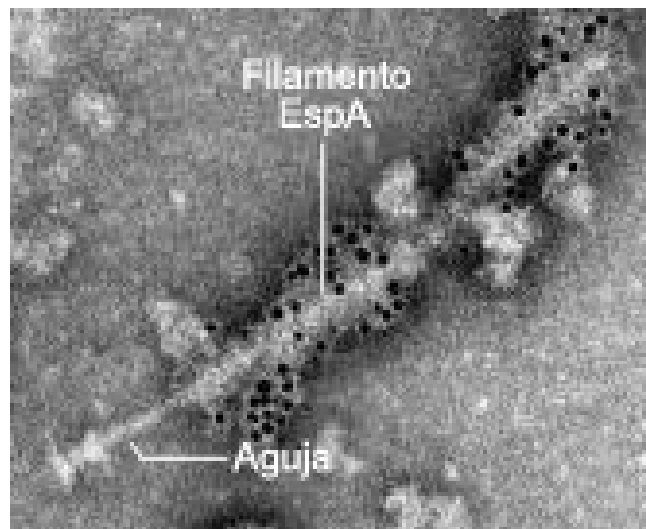


Figura 3. Fotografía de microscopía electrónica del SST3 purificado de EPEC que muestra al complejo basal (anillos y eje), la aguja y el filamento EspA, el cual se inmunodecoró con anticuerpos anti-EspA acoplados a partículas de oro (tomada de Sekiya y col., 2001).

Una vez que EPEC ha hecho contacto con el epitelio intestinal utiliza al SST3 para secretar dos tipos de proteínas. Las primeras que se secretan se denominan translocadoras (EspA, EspB y EspD) y son las encargadas de ensamblar el poro de translocación en la membrana plasmática del hospedero (Fig. 2), a través del cual se introducen las proteínas que se denominan efectoras ya que inducen alteraciones fisiológicas severas en la célula hospedero (Delahay y Frankel, 2002).

De las proteínas que componen el inyectisoma de EPEC, ocho presentan alta similitud de secuencia con componentes basales del flagelo bacteriano, estructura

que también se ensambla a través de un mecanismo de secreción tipo III (Tampakaki y col., 2004) (ver más adelante). A su vez, la arquitectura general de ambos SST3 (el de virulencia y el flagelar) es semejante (Fig. 4), lo que sugiere que ambas estructuras están relacionadas evolutivamente y que comparten un ancestro común (Gophna y col., 2003).

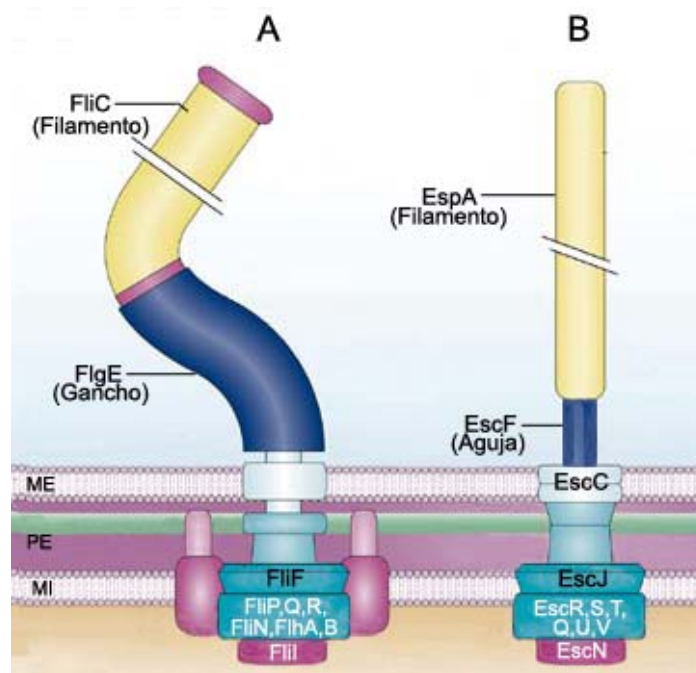


Figura 4. Esquema que muestra la similitud entre el SST3 flagelar de *Salmonella* (A) y el inyectisoma de EPEC (B). El aparato de exportación flagelar está constituido por las proteínas FliF, FliP, FliQ, FliR, FliN, FliA, FliB y FliI, que son ortólogas a EscJ, EscR, EscS, EscT, EscQ, EscV, EscU y EscN, respectivamente (modificado de Cornelis, 2006).

Las proteínas del inyectisoma de EPEC que están ampliamente conservadas entre los diferentes patógenos de animales y plantas y con las del sistema flagelar: EscJ, EscQ, EscR, EscS, EscT, EscU, EscV y EscN (Fig. 4); se localizan embebidas en la membrana interna o asociadas a ésta, formando un núcleo proteico al que por homología con el sistema flagelar se ha denominado aparato de secreción. Se piensa que este aparato secretor participa en el reconocimiento y direccionamiento de las proteínas que serán secretadas (Journet y col., 2005).

La ATPasa del SST3

Entre los elementos más conservados del aparato de secreción en los distintos SST3 se encuentra una ATPasa que aporta la energía necesaria no sólo para que se lleve a cabo el ensamblaje del SST3, sino también para que ocurra la secreción de proteínas a través de éste. Es decir, la ATPasa es un componente esencial del aparato secretor y mutantes en el gen que la codifica evitan la biogénesis del inyectisoma y por lo tanto la patogénesis. Las proteínas que pertenecen a esta familia comparten características importantes como son: hidrolizan ATP, interactúan con componentes del aparato de secreción, reconocen a las proteínas a ser secretadas, a las chaperonas de éstas o al complejo chaperona-proteína, disocian a la chaperona de este complejo e inducen el desplegamiento de las proteínas que serán secretadas para permitir su paso a través del reducido canal del SST3. Las interacciones de la ATPasa con otros componentes del SST3 no dependen de su actividad enzimática, ésta sólo se utiliza para disociar los complejos chaperona-proteína y desplegar a esta última antes de la secreción. Debido a esto, se piensa que la ATPasa dirige a las proteínas al aparato de secreción del SST3 (Gauthier y Finlay, 2003; Thomas y col., 2004, Akeda y Galán, 2005; Lorenz y Büttner, 2009).

Durante el ensamblaje flagelar se secretan diferentes clases de proteínas de forma secuencial en un orden preciso, y éstas se clasifican como sustratos tempranos o tardíos de acuerdo a si son secretadas durante el ensamblaje del cuerpo basal y el gancho o si participan en la polimerización del filamento, respectivamente (Fig. 4) (Macnab 2004). Una diferencia clara (además de la jerarquía en la secreción), entre los sustratos tempranos y los tardíos es que únicamente los tardíos se unen a chaperonas específicas que los dirigen al aparato de secreción, y se ha demostrado que esto ocurre de manera dependiente de la ATPasa flagelar FliI. Se piensa que este direccionamiento mediado por las chaperonas hacia la ATPasa, facilita en gran medida la exportación eficiente de los sustratos tardíos (Thomas y col., 2004). En este sentido, una bacteria

multiflagelada como *E. coli* o *Salmonella*, que posee flagelos en distintas etapas de ensamblaje debe tener la capacidad para distinguir entre sustratos tempranos, como las proteínas del eje y del gancho y los tardíos como las proteínas acopladoras del gancho y la flagelina. A pesar de esto, estudios realizados con FliI de *Salmonella enterica* demostraron que la secreción de ambos tipos de sustratos converge en esta ATPasa (Stafford y col., 2007).

Por mucho tiempo se pensó que el papel principal de la ATPasa de los distintos SST3 era el de convertir la energía química de la hidrólisis de ATP en el trabajo mecánico necesario para la exportación de proteínas. Sin embargo, en un trabajo publicado recientemente se demostró que el complejo formado por la ATPasa FliI con su regulador negativo FliH, tan sólo facilita el direccionamiento de los sustratos hacia la base del aparato secretor, en donde la energía de hidrólisis de ATP serviría para la disociación del complejo FliI-FliH, así como para romper la interacción de éste con componentes del aparato de secretor y con el complejo chaperona-sustrato. Una vez liberado el sustrato, se utilizaría la fuerza protón motriz para desplegarlo y secretarlo a través del SST3 (Minamino y Namba, 2008).

Recientemente se obtuvieron las primeras estructuras cristalográficas de dos ATPasas del SST3, FliI del flagelo de *Salmonella* y EscN del inyector de EPEC. De manera general estas proteínas se pueden dividir en tres dominios: una región N-terminal, la cual se piensa participa en su oligomerización y en su asociación con la membrana interna, un dominio de ATPasa en la parte central que contiene el sitio catalítico de la enzima y una región C-terminal donde se lleva a cabo la interacción con los complejos chaperona-proteína. Se observó que ambas proteínas se pliegan de manera muy similar a la subunidad β del complejo F_0F_1 de la ATP sintasa (Fig. 5) (Imada y col., 2006; Zarivach y col., 2007).

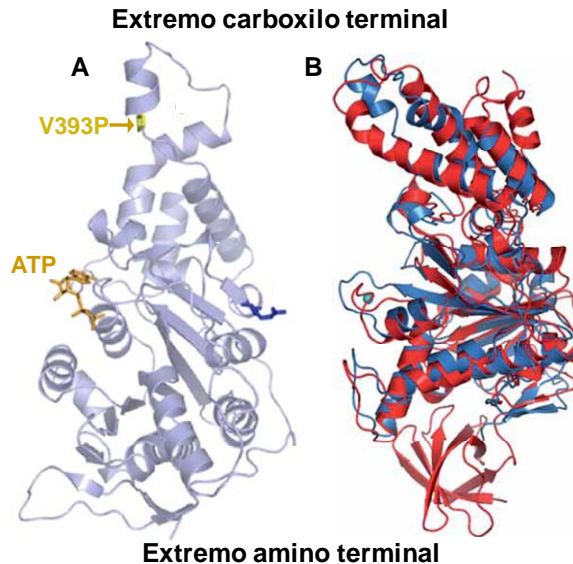


Figura 5. Estructura cristalográfica de EscN. A) Cristal de EscN donde señala la mutación valina 393P. B) Alineamiento estructural del cristal de EscN en color azul con el de la subunidad β de la ATPasa F1 en color rojo (Zarivach y col., 2007).

Secreción de proteínas vía SST3

Las bacterias Gram-negativas secretan una gran cantidad de proteínas al medio, pero sólo una pequeña fracción de éstas salen a través del SST3, por lo que la selección de las proteínas secretadas debe ser muy específica. Existen varias hipótesis sobre cómo reconoce el aparato de secreción tipo III a las proteínas que serán exportadas. Sin embargo, aún existe mucha controversia sobre este importante proceso (Ghosh, 2004). Una de las hipótesis propone que existe una secuencia de reconocimiento en el extremo 5' del RNA mensajero de las proteínas que son secretadas vía SST3, lo que implicaría una secreción co-traduccional (Anderson y col., 1999); otros estudios apoyan la existencia de una señal peptídica ubicada dentro de los primeros 15 residuos del extremo amino terminal (Ramamurthi y Schneewind 2003). Utilizando proteínas del SST3 de *Yersinia* se demostró que mutaciones puntuales en los aminoácidos anfipáticos de esta región inhiben completamente la secreción, lo que sugiere que la señal de secreción es de naturaleza anfipática y está localizada en los primeros residuos de la región amino terminal de la proteína (Ramamurthi y Schneewind 2003). Sin embargo, las

proteínas secretadas por diferentes SST3 no comparten similitud de secuencia debido a que éstas realizan diversas funciones celulares, por lo que es difícil demostrar para todos los casos la presencia de esta “secuencia señal” o de reconocimiento en proteínas secretadas vía SST3 (Abe y col., 2005).

Por otro lado, ya que la mayoría de las proteínas secretadas por el SST3 se unen en el citoplasma bacteriano con proteínas chaperonas que les confieren estabilidad y protección de los complejos proteolíticos, se propone que éstas también participan en el reconocimiento de las proteínas que serán secretadas (Parsot y col. 2003).

Las chaperonas del SST3

Las chaperonas realizan funciones muy importantes dentro de la bacteria, como prevenir la proteólisis de sus sustratos e impedir que ocurran interacciones intramoleculares o intermoleculares prematuras. A pesar de que las chaperonas de los distintos SST3 no exhiben alta similitud de secuencia, comparten características comunes como son: su localización citoplásmica, tamaño pequeño, punto isoeléctrico ácido y alta propensión a formar hélices α en su extremo carboxilo terminal. A su vez dos características importantes son que para realizar su función no requieren de la hidrólisis de ATP y presentan residuos hidrofóbicos expuestos en la superficie para la unión de sus sustratos (Parsot y col. 2003; Lilic y col., 2006).

Aunque existe controversia acerca de la clasificación de las chaperonas del SST3 generalmente éstas se clasifican en tres grupos de acuerdo a su función. La clase I agrupa a chaperonas que unen efectores, ésta a su vez se subdivide en dos, la clase IA agrupa a las chaperonas que unen un solo sustrato. Este es el grupo al que pertenecen la mayoría de las chaperonas del SST3, mientras que las chaperonas de la clase IB pueden unir a dos o más sustratos diferentes, por lo que reciben el nombre de chaperonas “promiscuas”. La clase II está formada por

chaperonas de las proteínas translocadoras que participan en la formación del poro de translocación. En el tercer grupo o clase III se engloban las chaperonas del SST3 flagelar (Parsot y col. 2003).

Una característica de todos los SST3 es que la secreción de efectores por éstos es un proceso estrictamente regulado que sólo se activa en respuesta a estímulos ambientales. *In vivo*, la secreción de proteínas está bloqueada antes del contacto de la bacteria con la célula eucarionte; mientras que *in vitro* la secreción está regulada por los niveles de Ca^{2+} , entre otros factores presentes en el medio de cultivo (Hamad y Nilles 2007). En EPEC la secreción de proteínas *in vitro* ocurre cuando las bacterias son crecidas en medio DMEM, el cual se piensa asemeja las condiciones ambientales que EPEC encontraría en el tracto gastrointestinal (Kenny y col., 1997a). Existen dos propuestas acerca del modo en que sucede la secreción de proteínas, una es que exista un juego presintetizado de proteínas en el citoplasma en espera de que el sistema se active después del contacto entre la bacteria y la célula hospedera, y la otra opción plantea que las proteínas son sintetizadas en el momento en el que el sistema se activa (Parsot y col. 2003). De cualquier forma, la secreción de efectores por el SST3 es un proceso altamente eficiente y rápido. Se ha demostrado que la translocación de SipA, proteína A de invasión de *Salmonella*, se lleva a cabo diez segundos después de que ésta hace contacto con la célula eucarionte (Schlumberger y col., 2005). Adicionalmente en el mismo trabajo se comprobó mediante fluorescencia la translocación de un juego presintetizado de 3000 moléculas de SipA desde el citoplasma bacteriano hasta el citosol de la célula hospedera a los pocos minutos de la infección. Estos resultados apoyan la idea de que únicamente un transporte postraducciona l puede explicar la fase inicial rápida de secreción de proteínas vía SST3 y por consiguiente se requiere de un juego presintetizado de efectores, el cual debe ser almacenado y estar disponible para ser transportado rápidamente. Es en este punto donde las chaperonas juegan un papel primordial, ya que la secreción de efectores depende de su interacción con proteínas chaperonas específicas del

SST3. En ausencia de éstas, los efectores en la mayoría de los casos, se degradan rápidamente (Schlumberger y col., 2005).

En numerosos trabajos se ha demostrado que la cantidad de proteína sustrato se reduce en ausencia de su chaperona. En EPEC, la eliminación del gen que codifica para CesT, chaperona del efector Tir (*Translocated intimin receptor*); que se inserta en la membrana plasmática eucarionte y funciona como receptor para una adhesina de membrana externa de EPEC que se denomina intimina (ver más adelante), reduce significativamente los niveles citoplásmicos de Tir y por consiguiente de proteína secretada, causando la pérdida de la capacidad de infección de la bacteria (Gauthier y Finlay, 2003). Por otro lado, la eliminación de *cesF*, que codifica para la proteína CesF, chaperona del efector EspF, también reduce los niveles intracitoplásmicos de EspF pero a diferencia de la mutante $\Delta cesT$ la ausencia de CesF no afecta significativamente los niveles de EspF secretada al medio y no altera la capacidad de infección de EPEC (Elliot y col., 2002).

Las chaperonas son proteínas que desempeñan múltiples funciones, además de estabilizar a los efectores y prevenir interacciones prematuras, se piensa que participan al menos en la etapa inicial de la conducción de los efectores hacia el aparato de exportación (Gauthier y Finlay, 2003). En muchos casos se demostró que en este direccionamiento también participan las ATPasas de los sistemas de SST3 (Thomas y col., 2005; Stafford y col., 2007).

Las funciones de los efectores del SST3

Además de la formación de la lesión A/E y el pedestal, la infección de EPEC produce otras alteraciones características como son: inhibición del potencial de membrana mitocondrial, así como del transporte de nutrientes y agua a través del epitelio intestinal, el rompimiento de las uniones estrechas entre los enterocitos, una débil respuesta inflamatoria y una rápida generación de diarrea acuosa (Dean

y Kenny 2009). Para desencadenar estas alteraciones EPEC inyecta una gran variedad de efectores, sin embargo, el único indispensable para la formación del pedestal es Tir. Durante mucho tiempo se pensó que Tir era una proteína eucariota que incluso se denominó Hp90. Posteriormente se demostró que esta proteína es en realidad un efector bacteriano que se transloca e inserta en la membrana plasmática del hospedero donde funciona como un receptor de la intimina, por lo que se renombró como Tir, y este descubrimiento revolucionó por completo el concepto de interacción bacteria-hospedero. Hasta el momento este es el único caso reportado en donde una bacteria transloca su propio receptor a la célula que infecta (Kenny y col., 1997b). Después de insertarse en la membrana plasmática Tir se fosforila en la tirosina 474 de su extremo carboxilo terminal por tirosín cinasas del hospedero de la familia Tec y Abl (Bommarius y col., 2007). La fosforilación de este residuo es esencial para el reclutamiento de la proteína adaptadora Nck (proteína modular que participa en múltiples eventos durante la transducción de señales). Nck unida a Tir activa a la proteína N-WASP, y se piensa que la activación de ésta ocasiona que cambie su conformación permitiendo que interactúe con el complejo de nucleación de actina Arp2/3 (que se encarga de modular la polimerización de actina en el citoesqueleto de la célula eucarionte) lo que da lugar a la formación de una estructura con forma de pedestal debajo del sitio donde EPEC estableció la adherencia íntima con el enterocito (Frankel y Phillips, 2008) (Fig. 6).

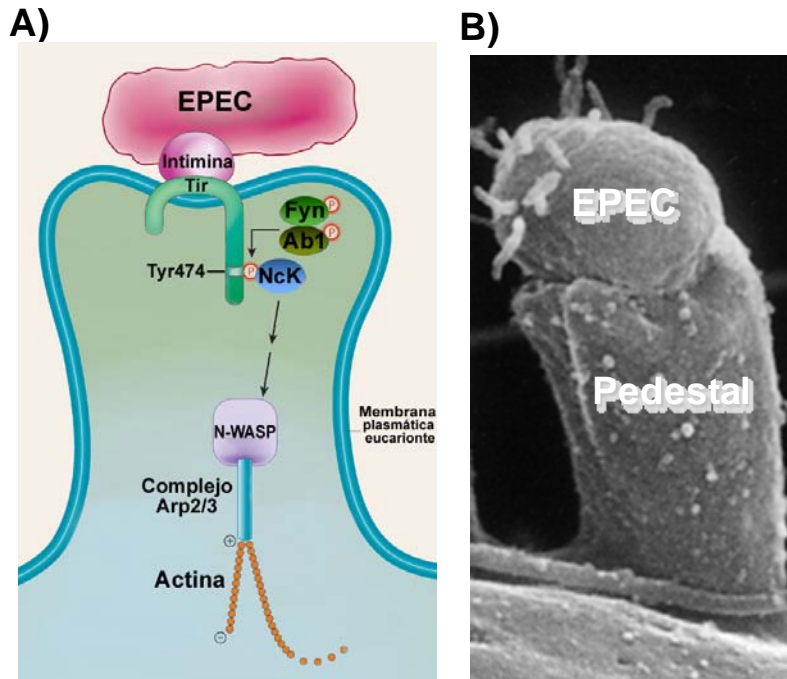


Figura 6. Adherencia íntima y formación de pedestal por EPEC. A) Esquema de la formación del pedestal donde se muestra el reclutamiento de diferentes proteínas del hospedero después que Tir es fosforilado (Tomada de Bhavsar y col., 2007). B) Fotografía de microscopía electrónica donde se observa a EPEC firmemente unida al pedestal (Tomada de Knutton y col., 1998).

En ensayos de infección de monocapas de células de epitelio intestinal humano con EPEC se demostró que la integridad de la función de barrera de éstas disminuyó, lo que ocasionó el incremento del flujo de agua a través del epitelio. Este fenómeno se asocia con la alteración en la localización de la ocludina, proteína integral de membrana indispensable en la formación de las uniones estrechas. En contraste, la cepa de EPEC $\Delta espF$ no altera la localización de la ocludina y por lo tanto tampoco afecta la integridad de las uniones estrechas (McNamara y col., 2001; Viswanathan y col., 2004). Los efectores son proteínas multifuncionales que interactúan con un gran número de proteínas del hospedero y afectan diferentes compartimentos celulares. Un ejemplo de la multifuncionalidad de los efectores de EPEC está claramente representada por Tir, EspF y Map (*Mitochondrial associated protein*) (Dean y Kenny 2009). EspF, además de dañar las uniones estrechas, se dirige, al igual que Map, hacia la mitocondria, afectando el potencial de membrana e induciendo la muerte celular por apoptosis (Fig. 7). El

transporte a través de las membranas mitocondriales se lleva a cabo ya que EspF y Map poseen una señal de direccionamiento en su región N-terminal similar a la que utilizan las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo (Nougayrède y Donnenberg, 2004; Papatheodorou y col. 2006).

Por otra parte, estudios con el efector EspG revelaron que éste fragmenta los microtúbulos (MT) del citoesqueleto, en el sitio donde la bacteria hizo contacto con la célula infectada. En ensayos de infección con la cepa de EPEC $\Delta espG$ se demostró que ésta no altera la red de MT incluso después de 6 horas de infección (Tomson y col., 2005). Los efectores menos caracterizados son EspZ y EspH, esto puede deberse a que la eliminación de los genes que los codifican, no tiene efecto en la secreción de proteínas vía SST3 o en la capacidad de infección de EPEC. A pesar de esto, mediante microscopía de fluorescencia se detectó a EspZ en la base del pedestal después de 5 horas de infección, lo que podría significar que el reclutamiento de este efector se da hasta que el pedestal está completamente ensamblado y serviría para evadir la respuesta inmune (Kanack y col., 2005). Por otro lado, se demostró que EspH se asocia a la membrana del hospedero y al parecer está implicado en la regulación de la longitud del pedestal, ya que la sobreexpresión de EspH promueve la elongación de esta estructura (Tu y col., 2003).

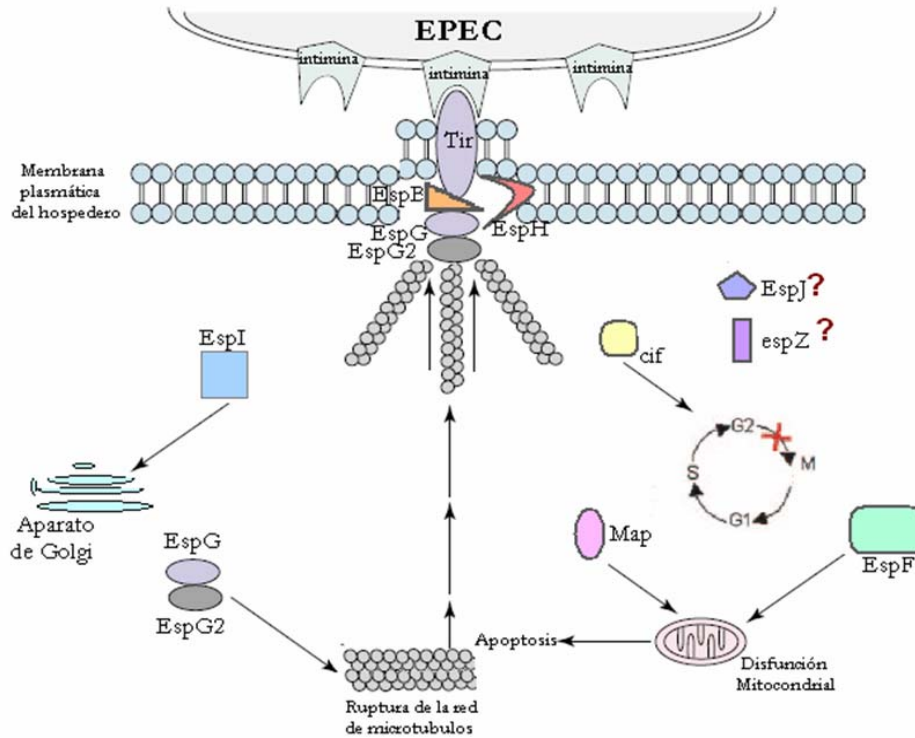


Figura 7. Representación esquemática de las alteraciones ocasionadas al enterocito por los efectores translocados por EPEC (modificado de Garmendia y col., 2005).

Los genes que codifican para los siete principales efectores que secreta EPEC vía SST3, están agrupados en una isla de patogenicidad denominada locus de eliminación enterocítica (LEE) que se describirá más adelante (Elliot y col., 1998). No obstante, en *Citrobacter rodentium* y *Escherichia coli* enterohemorrágica, que al igual que EPEC poseen una isla LEE, se han identificado efectores que no están codificadas dentro de esta isla y que sin embargo también son secretados por el SST3. Esta clase de efectores se han agrupado en una familia denominada Nle (*Non LEE encoded proteins*) (Roe y col., 2007). Recientemente se publicó el genoma completo de EPEC E2348/69 y mediante análisis bioinformáticos se observó que EPEC posee al menos 21 genes (además de los siete que están codificados en LEE), que codifican para efectores, los cuales se encuentran distribuidos en el cromosoma en seis islas de patogenicidad (PP2, PP4 y PP6, IE2, IE5 e IE6) (Iguchi y col., 2009).

ANTECEDENTES

En 2003 se demostró la interacción, mediante cromatografía de afinidad (ensayos *pull down*), entre la chaperona CesT, el efector Tir y la ATPasa EscN (Gauthier y Finlay, 2003). Estos autores demostraron que CesT además de estabilizar a Tir en el citoplasma de EPEC, recluta a este efector hacia el aparato de secreción y que este direccionamiento depende de la ATPasa EscN, la cual se piensa que está situada en la base del SST3. Adicionalmente, en un trabajo posterior se demostró que CesT además de unir a Tir, interactúa con otros efectores como EspH, EspZ, NleA, NleH y NleF (estos tres últimos están codificados fuera del LEE). Esto sugiere que CesT podría funcionar como una chaperona general encargada de dirigir a diversos efectores hacia el aparato secretor (Thomas y col., 2005).

En 2004 se demostró que la fusión de los primeros 35 aminoácidos del efector SptP (los cuales se piensa contienen la señal de secreción) a la fosfatasa alcalina, propiciaron la secreción de esta proteína al medio. Sin embargo, ésta no ocurrió a través de ninguno de los dos SST3 de virulencia que *Salmonella* posee, si no que la secreción se realizó a través del SST3 flagelar (Lee y Galán, 2004). Esto sugiere que dentro de los primeros 35 aminoácidos de los efectores existe una señal de secreción ancestral que por sí misma es capaz de secretar a las proteínas a través del SST3 flagelar. Resultados similares se obtuvieron con los efectores SptP y SopE, cuando a éstos se les eliminó el dominio de unión a su chaperona (CBD por sus siglas en inglés) SicP e InvB, respectivamente, la secreción se llevó a cabo por el sistema flagelar. No obstante, en presencia del CBD los complejos efector-chaperona no son reconocidos por el aparato de exportación flagelar, lo que indica que una función importante de las chaperonas específicas del SST3 es conferir especificidad de secreción a los efectores (Lee y Galán, 2004). En un trabajo posterior se reemplazaron dos regiones del CBD de SopE (aminoácidos 30-42 y 44-54) por residuos de alanina y se observó que estas mutantes se secretan tanto por el SST3 flagelar como por el de virulencia, lo que indica que la unión de la chaperona al CBD de los efectores no dicta la especificidad de secreción. No obstante, al analizar la translocación de estas

mutantes en ensayos de infección, se encontró que éstas no se translocan debido a que no interactúan con la chaperona InvB. Esto indica que la unión del CBD de SopE con InvB participa de algún modo en el reconocimiento de las proteínas que son translocadas al interior de células eucariontes (Ehrbar y col., 2006).

En 2004 se realizó la caracterización funcional de la ATPasa InvC del SST3 de *Salmonella enterica*. Mediante mutagénesis se identificaron residuos que son importantes para el funcionamiento de esta enzima. Uno de éstos es la leucina 376 localizada en el C-terminal de InvC. Al cambiar este aminoácido por prolina (InvC^{L376P}) e introducir a esta proteína mutante en la cepa $\Delta invC$ no se restaura la secreción de translocadores y efectores, a pesar de que esta enzima hidroliza ATP y oligomeriza como la proteína silvestre (Akeda y Galán 2004). En un trabajo posterior se demostró que InvC silvestre, pero no InvC^{L376P}, es capaz de interactuar con la chaperona SicP y con el complejo efector-chaperona, SptP-SicP, pero no reconoce al efector SptP solo. Esto sugiere que InvC interactúa con el complejo efector-chaperona a través de su región carboxilo terminal. Por otro lado se demostró que la hidrólisis de ATP por InvC no es necesaria para el reconocimiento de los complejos o la chaperona, pero sí lo es para la disociación del complejo SptP-SicP y para el desplegamiento del efector para que pueda ser secretado a través del estrecho canal del SST3 (Akeda y Galán, 2005).

JUSTIFICACIÓN

Las interacciones proteína-proteína tienen un papel central en la mayoría de los procesos biológicos bacterianos, incluyendo la patogénesis. Si bien diversas interacciones proteicas han sido descritas en el proceso de ensamblaje del SST3, aún no se ha determinado el tipo de interacciones que permiten el reconocimiento de las proteínas efectoras por los componentes del sistema secretor. Debido a esto, los esfuerzos del laboratorio están enfocados en identificar el mecanismo de reclutamiento y reconocimiento de las proteínas efectoras y los complejos efector-chaperona por los componentes basales del aparato de secreción tipo III de EPEC.

HIPÓTESIS

Las proteínas chaperonas participan en el reconocimiento de los efectores por el aparato de secreción, por lo que los diferentes complejos chaperona-efector interactuarán con la ATPasa EscN u otros componentes del aparato secretor.

OBJETIVO GENERAL

Evaluación de interacciones proteína-proteína de los complejos efector-chaperona Tir-HisCesT y EspF-HisCesF, así como de las chaperonas His-CesT y His-CesF, con la ATPasa EscN y mutantes no funcionales de esta enzima del SST3 de *Escherichia coli* enteropatógena.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Purificación de complejos efector-chaperona mediante cromatografía de afinidad a níquel.
2. Evaluación de interacciones proteína-proteína entre la ATPasa EscN y las -chaperonas solas o en complejo con su efector utilizando las técnicas de co-purificación (*pull down*) y ensayos de inmunoréplica de afinidad (*affinity blotting*).
3. Determinación de la interacción de mutantes puntuales no funcionales de la ATPasa EscN con la chaperona sola o en complejo con su efector.

MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se enlistan y describen las cepas y vectores utilizados así como las construcciones generadas en este trabajo.

Tabla1. Descripción de las cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
EPEC E2348/69	Cepa silvestre, serotipo 0127:H6. Tiene resistencia a estreptomicina (Str ^r)	Levine y col., 1978
Top 10	Cepa mutante en recombinación que permite clonar DNA metilado y purificar DNA plasmídico de alta calidad	Catálogo de Invitrogen, 2004
XL1-Blue	Cepa mutante en endonucleasas (<i>endA</i> ⁻) y recombinación (<i>recA</i> ⁻) lo que favorece la estabilidad y purificación de DNA plasmídico exógeno. Tiene resistencia a tetraciclina (Tet ^r)	Catálogo de Stratagene, 2004
BL21(DE3) pLysS	Cepa para expresión a partir del promotor T7; posee el gen de la RNA polimerasa T7 en el cromosoma, bajo el control del promotor lacUV5 (lisógena λDE3). Carece de las proteasas OmpT y Lon. Provee la lisozima T7 para reducir los niveles de expresión basal. Tiene resistencia a cloranfenicol (Cam ^r)	Studier y col., 1990
<i>Salmonella</i>		
JR501	Cepa mutante en los sistemas de recombinación y restricción modificación (<i>hsd</i> ^r , <i>r</i> ⁻ <i>m</i> ⁺). Utilizada para obtener DNA plasmídico compatible con cepas de <i>Salmonella</i> . Tiene Str ^r	Ryu, y col., 1990
SJW1368	Cepa incapaz de ensamblar flagelo; mutante en <i>flhCD</i> , regulador maestro flagelar, que controla la expresión de los genes flagelares	Ohnishi y col., 1994

Vector		
pCR blunt II-TOPO	Vector de clonación que tiene la topoisomerasa I de <i>Vaccinia</i> , la cual inserta el producto de PCR sin necesidad de utilizar la enzima DNA ligasa. Tiene resistencia a kanamicina (Kan ^r)	Catálogo de Invitrogen, 2004
pET19b	Vector de expresión que tiene al promotor del fago T7 río arriba del sitio de multiclonación. Genera proteínas recombinantes en fase con una etiqueta de 10 histidinas fusionada al amino terminal. Tiene resistencia a ampicilina (Amp ^r)	Manual de Novagen Merck Bioscience, 2004
pTrc99A	Vector diseñado para sobre expresar genes. Utiliza el sitio de unión a ribosoma de <i>lacZ</i> , el promotor híbrido <i>trc</i> , y el sitio de multiclonación del vector pUC18 río abajo del promotor. Tiene Amp ^r	Amman y col., 1988
pTrc99A-FF4	Vector generado a partir de pTrc99A por la sustitución del sitio <i>NcoI</i> del sitio de multiclonación por el de <i>NdeI</i> , y la eliminación del único sitio <i>NdeI</i> nativo del vector. Tiene Amp ^r	Ohnishi y col., 1997
pGEX-4T-2	Vector de expresión que genera proteínas recombinantes con la etiqueta GST en el extremo N-terminal. Contiene el promotor híbrido <i>tac</i> inducible por IPTG y el gen <i>lacI^q</i> . Tiene Amp ^r	Catálogo de Amersham Biosciencias, 2002
Construcción		
pMEcF	<i>cesF</i> clonado en pET19b	Romo, C., M.
pMTcF	<i>cesF</i> clonado en pTrc99A-FF4	Este trabajo
pMEsF	<i>espF</i> clonado en pET19b	Este trabajo
pMTsF	<i>espF</i> clonado en pTrc99A-FF4	Este trabajo
pMTBlSf-hcF	Construcción bicistrónica que tiene clonados a los genes <i>espF</i> y <i>cesF</i> (<i>CesF</i> se produce con etiqueta de histidinas en el N-terminal); generada a partir pMTsF	Este trabajo
pMTBlcF-hsF	Construcción bicistrónica que tiene clonados a los genes <i>cesF</i> y <i>espF</i> (<i>EspF</i> se produce con una etiqueta de histidinas en el N-terminal); generada a partir de pMTcF	Este trabajo
pMTcT	<i>cesT</i> clonado en pTrc99A-FF4	Este trabajo
pMEcT	<i>cesT</i> clonado en pET19b	Este trabajo

pMRtir	<i>tir</i> clonado en pCR BluntII TOPO	Este trabajo
pMEtir	<i>tir</i> subclonado en pET19b	Este trabajo
pMTtir	<i>tir</i> subclonado en pTrc99A-FF4	Este trabajo
pMTBItir-hcT	Construcción bicistrónica que tiene clonados a los genes <i>tir</i> y <i>cesT</i> (<i>CesT</i> se produce con una etiqueta de histidinas en el N-terminal); generada a partir de pMTtir	Este trabajo
pMTBIcT-htir	Construcción bicistrónica que tiene clonados a los genes <i>cesT</i> y <i>tir</i> (<i>Tir</i> se produce con una etiqueta de histidinas en el N-terminal); generada a partir de pMTcT	Este trabajo
pMTBIcB-hcAB	Construcción bicistrónica que tiene clonados a los genes <i>espB</i> y <i>cesAB</i> (<i>CesAB</i> se produce con una etiqueta de histidinas en el N-terminal); generada a partir de pMTsB.	Gaytan, E. M.
pAEeN	<i>escN</i> clonado en pET19b	Andrade, T., A.
pATHeNV393P	<i>escN</i> (con etiqueta de histidinas en el N-terminal clonado en pTrc99A) con sustitución de la valina 393 por prolina	Andrade, T. A.
pATHeNE401A	<i>escN</i> (con etiqueta de histidinas en el N-terminal clonado en pTrc99A) con sustitución del glutamato 401 por alanina	Andrade, T., A.
pATHeNY402A	<i>escN</i> (con etiqueta de histidinas en el N-terminal clonado en pTrc99A) con sustitución de la tirosina 402 por alanina	Andrade, T., A.
pAGeN	<i>escN</i> clonado en pGEX-4T-2	Andrade T., A.
pAGeNV393P	<i>escN</i> V393P suclonado en pGEX-4T-2	Este trabajo
pMGeNE401A	<i>escN</i> E401A suclonado en pGEX-4T-2	Este trabajo
pMGeNY402A	<i>escN</i> Y401A suclonado en pGEX-4T-2	Este trabajo

Clonación de los genes

Los genes citados en la tabla 2 se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de DNA cromosomal purificado de EPEC silvestre. Para los genes *espF* y *cesT* se utilizó la enzima Taq polimerasa a diferencia de *tir* que se amplificó con la DNA polimerasa termoresistente de alta fidelidad *Pfu*. Los productos de las amplificaciones, previa digestión y purificación mediante extracción de gel de agarosa (Qiaquick gel extraction, Qiagen) se clonaron en distintos vectores.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos sintetizados para amplificar los genes *espF*, *tir* y *cesT*. En negritas y subrayado se señalan los sitios de restricción. En el caso de *espF* el oligonucleótido F contiene el sitio *NdeI*, a diferencia de los oligonucleótidos de *tir* y *cesT* en donde este sitio se sustituyó por *AseI*. Los oligonucleótidos R en los tres casos contienen el sitio *BamHI*.

Gene	Oligonucleótido F	Oligonucleótido R
<i>espF</i>	AGAGGCATAA <u>CATATG</u> CTTAATGG	GTTTTAAATT <u>GGATCC</u> TTACCCTT
<i>tir</i>	AAGGATAT <u>ATTAAT</u> GCCTATTGGT	TTCACAG <u>GGATCC</u> TTAAACGAAAC
<i>cesT</i>	AAGAGAAAT <u>ATTAAT</u> GTCATCAAG	TACTAATAAAG <u>GGATCC</u> TTATCTTC

Para las reacciones de ligación se utilizó la enzima T4 DNA ligasa, de New England Biolabs. La reacción de ligación entre el vector y los productos de PCR, se realizó por 16 h a 16° C. Se transformaron células competentes de *E. coli* Top10 con las reacciones de ligación. Las células transformantes se seleccionaron por su resistencia al antibiótico respectivo y se obtuvo el DNA plasmídico de 4 ml de cultivo de una colonia aislada utilizando el paquete comercial QIAprep spin miniprep, de Qiagen, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA purificado y digerido con las enzimas correspondientes se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y expuestos a luz UV.

El producto amplificado de *tir* se clonó en el vector PCR-Blunt II-Topo, de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó este vector porque contiene a la topoisomerasa I (del virus *Vaccinia*) unida covalentemente en sitios específicos del vector. Esta enzima es capaz de insertar productos de PCR, con

extremos romos, directamente en el vector sin necesidad de utilizar DNA ligasa, lo que incrementa la eficiencia de ligación. Se transformaron células Top10 (ver más adelante), con la reacción de ligación. Se seleccionó una transformante por su resistencia a kanamicina y se purificó el DNA plasmídico para digerirlo con *EcoRI* y comprobar la inserción de *tir*, ya que el vector posee dos sitios de corte para esta enzima flanqueando el sitio de inserción del producto de PCR (Fig. 9).

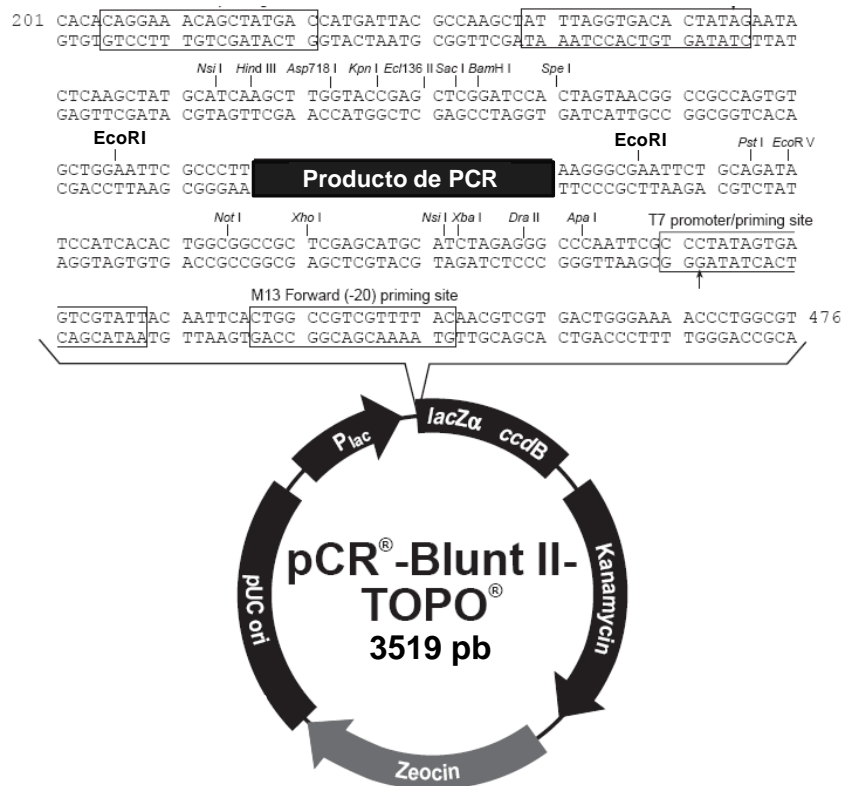


Figura 9. Mapa del vector PCR-Blunt II-TOPO. Se muestran los sitios de corte de la enzima *EcoRI* que flanquean el sitio de inserción del producto de PCR.

Para sobreexpresar a los genes se subclonaron en los sitios *NdeI* y *BamHI* de los vectores de expresión pTrc99AFF4 (Fig. 10) y pET19b (Fig. 11). Se utilizó el vector pTrc99AFF4 para sobreproducir a las proteínas sin etiqueta, debido a que este vector tiene al fuerte promotor *trc* río arriba del sitio de multiclona- ción donde se insertaron los genes (Fig. 10).

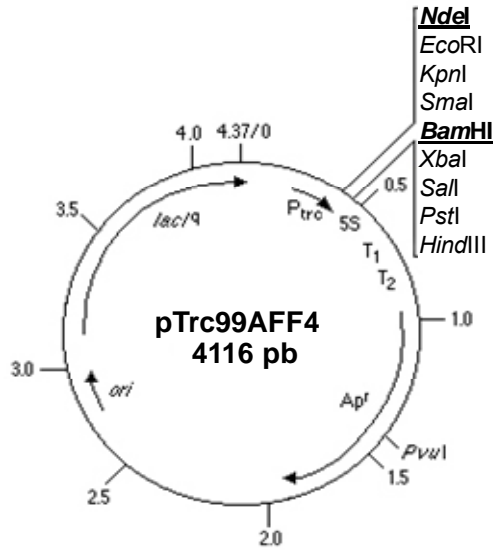


Figura 10. Mapa del vector pTrc99AFF4 con los sitios en donde los genes fueron subclonados en negritas y subrayados.

El vector pET19b se utilizó para fusionar una etiqueta de 10 histidinas en el extremo amino terminal de las proteínas recombinantes, lo que permite la purificación de éstas mediante cromatografía de afinidad a níquel. (Fig. 11B).

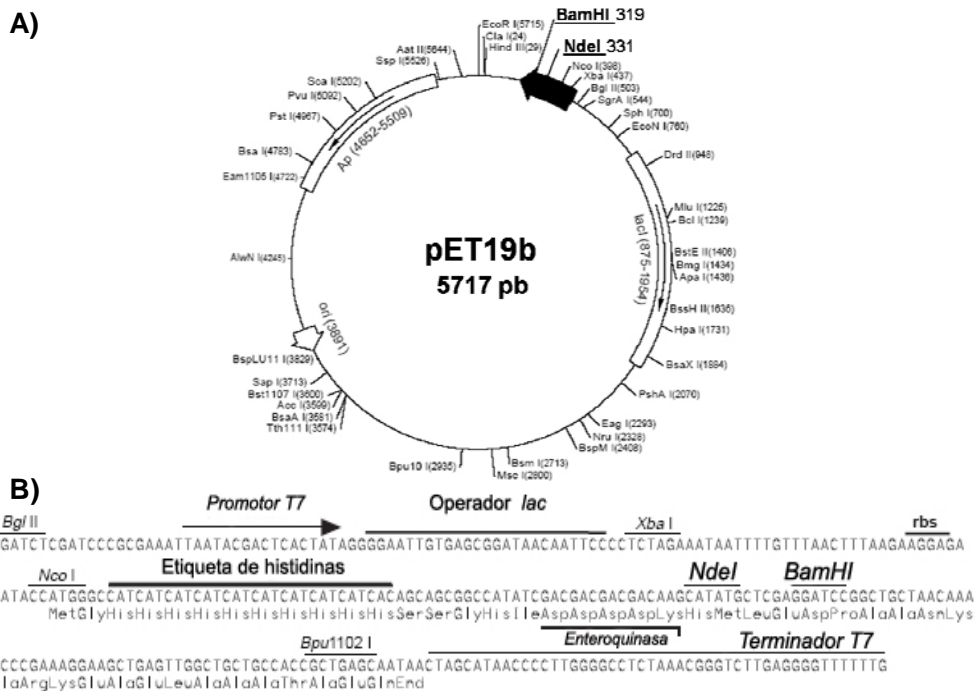


Figura 11. Mapa del vector de expresión pET19b (A) Los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* están subrayados y en negritas. (B) Región promotora con la etiqueta de 10 histidinas y los sitios de clonación en negritas y subrayados.

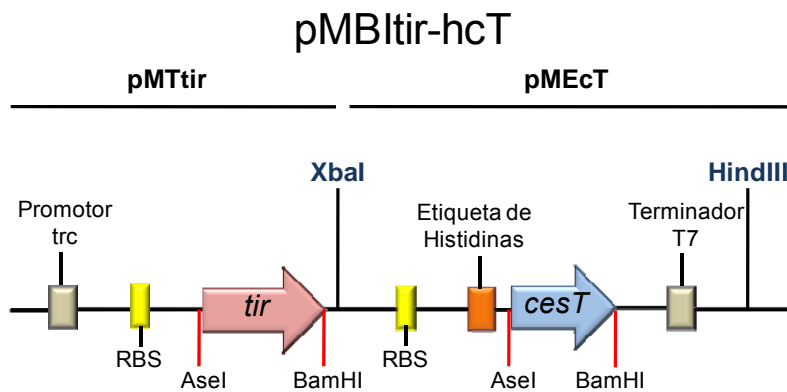
Los productos de la amplificación de los genes *cesT* y *espF* se ligaron, previa digestión y purificación, directamente en los sitios *NdeI* y *BamHI* de pTrc99AFF4 y pET19b. Las reacciones de ligación en los diferentes vectores se usaron para transformar células competentes Top10. Se seleccionó una transformante de cada ligación por su resistencia a ampicilina. Se purificó el DNA plasmídico. Para el caso de las construcciones generadas a partir de pET19b la presencia de los genes se verificó mediante restricción con las enzimas *NcoI* y *BamHI*. Las construcciones obtenidas de pTrc99AFF4 se identificaron al comparar su patrón de migración en gel de agarosa al 1% con el del vector vacío después de digerirlos con *BamHI*.

Una vez que se comprobó la presencia de los genes, estas construcciones se utilizaron para transformar células competentes NovaBlue y obtener DNA plasmídico de alta calidad que se envió a secuenciar a la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, para verificar que los genes no presenten mutaciones.

Construcción de plásmidos bicistrónicos

Se construyeron plásmidos bicistrónicos a partir de los plásmidos pMTtir y pMTsF. A estas construcciones se les insertó el gen *cesT* o *cesF* respectivamente, junto con la secuencia que codifica para la etiqueta de histidinas además de un sitio de unión a ribosoma río arriba del codón de inicio. Los plásmidos pMTtir y pMEcT se digirieron con las enzimas *XbaI* y *HindIII*. Los productos de la digestión se ligaron y el producto de la ligación (Fig. 12), se utilizó para transformar células competentes Top10. La inserción de *cesT* se determinó mediante PCR de colonia. Se aislaron 15 colonias transformantes con un palillo estéril y se sembraron en una placa de LB con ampicilina, las bacterias restantes en el palillo se resuspendieron en 50 μ l de agua estéril y se hirvieron por 10 minutos; se tomaron 2 μ l de las muestras hervidas y se mezclaron con 8 μ l de la reacción de PCR para amplificar a *cesT*.

Una vez concluidos los ciclos de amplificación las muestras se corrieron en un gel de agarosa.



La estrategia utilizada para la construcción del plásmido bicistrónico que tiene a los genes *espF* y *cesF* etiquetado con histidinas en el extremo 5', ambos bajo el control del promotor *trc*, fue similar a la descrita para la construcción pMTBItir-hcT con la única diferencia de que el gen *cesF* se insertó en los sitios *XbaI* y *PstI* de pMTsF. Para verificar la presencia de ambos genes, se purificó DNA plasmídico y se analizó por restricción con las enzimas *NdeI* y *BamHI*.

Preparación de células competentes con CaCl_2

De una colonia de bacterias se inició un precultivo de 2 ml de LB con el antibiótico respectivo y se creció a 37° C con agitación por 12h. Al día siguiente se inocularon 30 ml de LB fresco con antibiótico con una dilución 1:100 del precultivo, y las células se incubaron a 37° C con agitación hasta alcanzar una DO a 650 nm de 0.3 a 0.5. Las células se cosecharon por centrifugación a 7600 x g por 5 min a 4° C. La pastilla se resuspendió cuidadosamente en 30 ml de CaCl_2 100 mM frío. Las células se incubaron en hielo por 40 min y se centrifugaron como se mencionó anteriormente. Finalmente la pastilla se resuspendió en 3 ml de CaCl_2 100 mM frío.

Transformación de células competentes con DNA plasmídico

Las células competentes (100 μ l) se incubaron con el DNA plasmídico (2 μ l) 1 h en hielo. Enseguida se les aplicó un choque de calor de 42° C por 90 s y se regresaron al hielo por 3 min. Las células se plaquearon en agar LB, adicionado con el antibiótico respectivo. Cuando las células se transformaron con reacciones de ligación, antes de plaquear, éstas se recuperan incubando en LB con 20 mM de glucosa y sin antibiótico a 37° C con agitación moderada por 1 h, esto con la finalidad de incrementar la eficiencia de transformación.

Sobreproducción y purificación de proteínas recombinantes

A partir de una colonia aislada de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (BDP) o *Salmonella* SJW1368 que contenga la construcción de interés, se preparó un precultivo de 5 ml de medio LB con ampicilina y se creció 12 h a 37° C con agitación. Al día siguiente se inoculó LB fresco (200 ml) con 100 μ g/ml de ampicilina con una dilución 1:100 del precultivo. Las células se incubaron a 30° C con agitación hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0.6 a 0.8. La sobreproducción de proteína recombinante se indujo con β -D isopropil-tiogalactopiranosido (IPTG), cuya concentración final de 0.1 mM y el tiempo de inducción varió según la construcción utilizada. Se realizó un perfil de inducción tomando muestras del cultivo antes de inducir y cada hora después de añadir el IPTG.

Al tiempo que se produjo la mayor cantidad de proteína recombinante soluble, las células se cosecharon por centrifugación a 10000 x g por 10 min a 4° C. La pastilla se resuspendió en amortiguador TNI (Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M e imidazol 10 mM) cuando se utilizó agarosa acoplada a Ni²⁺, o en amortiguador salino de fosfatos (PBS) cuando se utilizó una matriz de Sefarosa acoplada a glutatión. Las células se fraccionaron por sonicación y las bacterias no lisadas, los restos celulares y los componentes insolubles se removieron por centrifugación a 27000

x g por 20 min a 4° C. El sobrenadante se recuperó y se ultracentrifugó a 116600 x g por 1h a 4° C.

Cromatografía de afinidad de proteínas fusionadas a histidinas

Las proteínas recombinantes se purificaron del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad en una resina de agarosa acoplada a níquel (Ni-NTA, Qiagen). Se empacó una columna con 2 ml de resina y se equilibró con 10 ml de amortiguador TNI. Se cargó el sobrenadante con la proteína recombinante, la cual se inmovilizó en la columna por medio de interacciones iónicas entre los anillos imidazol de las histidinas y el ión Ni^{2+} que está unido a la resina. Para remover las proteínas unidas inespecíficamente, la resina se lavó con 60 ml de TNI con 60 mM de imidazol y 20 ml de 80 mM. La proteína recombinante se eluyó de la columna incrementando gradualmente la concentración de imidazol desde 100 hasta 600 mM. Se colectaron 2 ml de cada una de las fracciones.

Cromatografía de afinidad de proteínas fusionadas a la glutatión S transferasa (GST)

El proceso de inducción y fraccionamiento celular fue el mismo que se utilizó para purificar a las proteínas etiquetadas con histidinas, con excepción de los genes *escN* silvestre y mutantes puntuales clonados en pGEX4T-2, en los cuales la concentración de IPTG fue de 0.05 mM, la temperatura se redujo a 25° C y el tiempo de inducción se extendió a 8 h. La fracción soluble del lisado celular se incubó con 340 μl de resina Glutatión Sefarosa 4B de la marca Amersham y 1 mM del inhibidor de proteasas fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), en un tubo Falcon de 50 ml en agitación por 2 h a 4° C y se centrifugó a 755 x g durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante se desechó. La resina se lavó seis veces con 40 ml de PBS y 1 mM de PMSF, se centrifugó como antes y se cambió el amortiguador entre los lavados. La proteína fusionada a GST se eluyó de la resina, con amortiguador de

50 mM Tris pH 8.0 y 10 mM glutatión reducido, en cuatro fracciones de 1 ml cada una.

Cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford

Este método colorimétrico se basa en la especificidad de unión del colorante azul de Coomassie G-250 a las proteínas y en el subsiguiente viraje del color del reactivo al unirse a éstas, la reacción provoca un cambio en la absorbancia del colorante a 595 nm.

Se preparó 1 ml de albúmina sérica bovina (BSA) como proteína estándar a una concentración de 10 mg/ml. Después ésta se diluyó a 100, 200, 300, 400 y 500 µg/ml en un volumen final de 100 µl para hacer una curva patrón. Se tomaron 20 µl de las fracciones de proteína recombinante purificadas, así como de cada una de las diluciones de la proteína estándar y se les agregó 1 ml de colorante diluido (1 parte de colorante concentrado de BioRad en 5 partes de agua desionizada). Las muestras se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm. Con los datos obtenidos de la proteína estándar se realizó una curva patrón y sobre ésta se intrapolaron los resultados obtenidos para las diferentes fracciones de proteína recombinante.

Ensayo de inmunodetección

Las muestras de proteína se cargaron por duplicado en geles de poliacrilamida al 15 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Un gel se tiñó con azul de Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, con diámetro de poro de 22 µm, a 64 volts por 2 h a 4° C. Al concluir la transferencia de las proteínas, la membrana se bloqueó con solución de leche en polvo descremada al 5% en amortiguador salino de Tris (TBS) con Tween 20 al 0.1% (TBS-T) por 12 h a 4° C con agitación, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. La inmunodetección se realizó por la técnica de Western blot. La membrana

bloqueada se lavó tres veces con 30 ml de TBS-T frío cambiando el amortiguador entre los lavados. A continuación, la membrana se incubó con anticuerpos que reconocen a la proteína o a la etiqueta que ésta posee, diluidos en TBS-T por 1 h a 4° C con agitación, y posteriormente se realizaron lavados sucesivos como se describió anteriormente. De ser necesario, la membrana se incubó en las mismas condiciones con un anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP), que reconoce a las IgG de conejo (GAR), diluido 1: 20000 en TBS-T. Después de lavados sucesivos la membrana se incubó con solución detectora, la cual consta de una parte de luminol y una de peróxido de hidrógeno. En este sistema de detección la HRP cataliza la oxidación del luminol que inmediatamente después de ser oxidado emite luz a una longitud de onda de 428 nm, la cual es captada por una película fotosensible. La autoradiografía se obtuvo colocando la membrana dentro de un casete de impresión, en contacto con una hoja de papel para radiografías que posteriormente se revela.

Identificación de interacciones proteína-proteína

Inmunorréplica de afinidad tipo Western (*Affinity Blot*)

Esta técnica es una variante de la inmunodetección por Western blot. El ensayo clásico consiste en la detección de una proteína etiquetada que actúa como ligando sobre una membrana que contiene un lisado celular completo o una proteína purificada. Se transfirieron 4 µg de las proteínas BSA, como control negativo de interacción, y His-CesT o del complejo Tir-HisCesT a una membrana de nitrocelulosa, después que ésta se bloqueó y lavó, se incubó con 30 µg de His EscN por 2 h a 4° C con agitación. Después de lavados sucesivos, la membrana se incubó con anticuerpos que reconocen a His-EscN diluidos 1:10000 en TBS-T. Posteriormente el procedimiento continúa como se describió para la inmunodetección tipo Western.

Ensayo de copurificación (*Pull Down*) por cromatografía de afinidad a níquel

Una vez obtenida la construcción bicistrónica en el vector pTrc99A, se transformó en la cepa de *Salmonella* JR501 para preparar DNA plasmídico y transformarlo en la cepa SJW1368. Esta última es una cepa mutante en el operón maestro flagelar y se ha utilizado con éxito en la expresión de genes del SST3 de virulencia. De una colonia aislada de SJW1368 con la construcción de interés, se inició un cultivo de 5 ml de LB y el antibiótico respectivo que se creció a 37° C con agitación por 12 h. A la mañana siguiente se inoculó un cultivo de 200 ml de LB con antibiótico con una dilución 1:100 del precultivo y se creció a 30° C con agitación hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0.6-0.8. Después de esto, se indujo la expresión de los genes con 0.1 mM de IPTG y el cultivo se incubó 5 h en las condiciones antes mencionadas. El fraccionamiento y purificación de las proteínas se realizó como se describió en la sección de purificación de proteínas recombinantes.

Ensayo de copurificación (*Pull Down*) por cromatografía de afinidad a glutatión, de chaperonas o complejos efector-chaperona fusionados a histidinas, con GST-EscN

La técnica de copurificación consistió en la incubación de 50 µg de His-CesT o 100 µg del complejo Tir-HisCesT con 50 µg de GST o de GST-EscN, con resina sefarsa acoplada a glutatión, por 2 horas en agitación a 20° C. Los ensayos se realizaron en presencia de 2mM MgCl₂, 100 µM de 5'-adenil-β, γ-imidotrifosfato (AMP-PNP), 150 mM de NaCl y 0.01% de Tween 20. Después de la incubación, la resina se lavó tres veces con 1.5 ml de amortiguador TN (Tris 20 mM pH 8.0 y NaCl 150 mM) y las proteínas se desprendieron de la resina con 1 ml de amortiguador de elución (Tris 50 mM pH 8.0 y glutatión reducido 10mM). Todas las fracciones se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% por 12 horas a 4° C. Las proteínas se centrifugaron y resuspendieron en amortiguador de corrida, el pH de las muestras se ajustó con Tris saturado y se sometieron a SDS PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se realizó la inmunodetección con anticuerpos anti CesT diluidos 1:10000 en TBS-T, después

de lavados sucesivos la membrana se incubó con anticuerpo GAR y el procedimiento continuó como se mencionó anteriormente.

Se utilizó una variante de esta técnica para analizar interacciones entre el complejo efector-chaperona con la ATPasa, que consistió en mezclar la fracción soluble de lisados celulares que contenían al complejo Tir-HisCesT o a His-CesT y EscN sin etiqueta en presencia de 300 μ l de resina acoplada a níquel. La mezcla se incubó por 12 h a 4° C en agitación. Ésta se empacó en una columna y se lavó con 40 ml de TN con concentraciones crecientes de imidazol (gradiente que va de 10 mM hasta 50 mM de imidazol). Las proteínas se eluyeron de la resina con 400 μ l de TN con 400 mM de imidazol. Se transfirieron muestras de las fracciones obtenidas a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con anticuerpos anti EscN diluidos 1:10000 en TBS-T, después de lavados sucesivos la membrana se incubó con el anticuerpo secundario GAR diluido 1:10000 en TBS-T y se continuó como se describió en el apartado “ensayo de inmunodetección”.

RESULTADOS

Clonación de los genes

El producto amplificado del gen *tir* (1650 pb) se clonó en el vector PCR-BluntII TOPO (3519 pb) de Invitrogen. Se purificó el DNA plasmídico de una colonia transformante para analizarlo por restricción con la enzima *EcoRI* ya que el vector posee dos sitios de restricción para esta enzima flanqueando el sitio donde se inserta el producto de PCR. Esta construcción se nombró pMRtir (Fig. 13). Una vez verificada la secuencia nucleotídica (ver más adelante), pMRtir se utilizó para subclonar a *tir* en diferentes vectores de expresión.

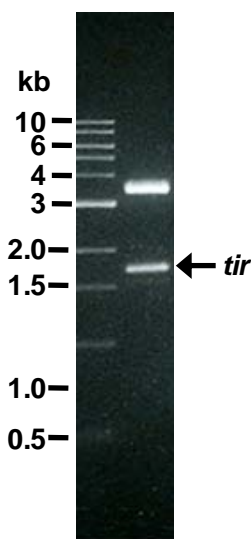


Figura 13. Análisis de restricción de pMRtir con *EcoRI*.

El plásmido pMRtir y el producto amplificado de *cesT* se digirieron con las enzimas *Asel* y *BamHI* para clonarlos en los sitios *Ndel* y *BamHI* de los vectores pET19b (5717 pb) y pTrc99AFF4 (4176 pb). Se utilizó *Asel* debido a que ambos genes poseen un sitio de corte *Ndel* dentro de su secuencia y porque los extremos cohesivos producto de la digestión de *Asel* son compatibles con los que deja *Ndel*. El producto amplificado de *espF*, al igual que el de *cesT* se ligó directamente en los vectores de expresión.

Después de seleccionar a las transformantes por su resistencia a ampicilina, se escogió una construcción de cada reacción de ligación para analizarlas por restricción con *Nco*I y *Bam*HI (Fig. 14). Las construcciones en pET19b se designaron pMEtir, contiene a *tir* (1650 pb); pMEsF, a *espF* (620 pb) y pMEcT, a *cesT* (470 pb).

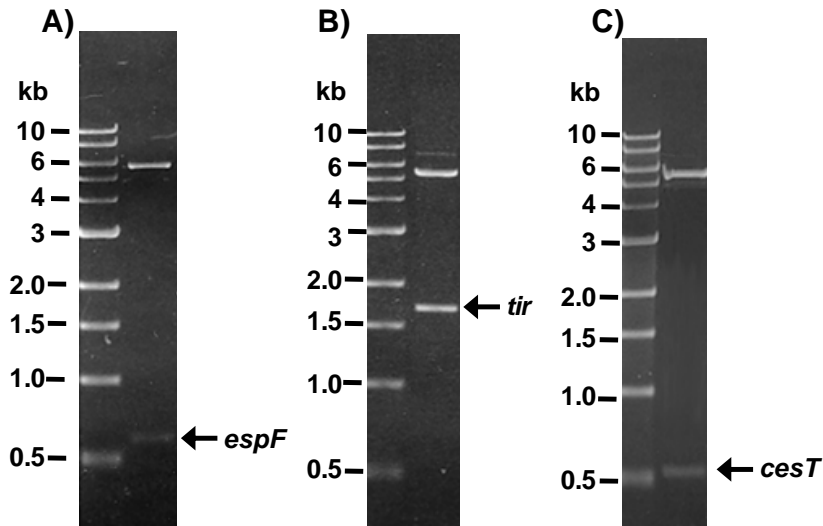


Figura 14. Análisis de restricción con las enzimas *Nco*I y *Bam*HI de las construcciones generadas a partir de pET19b donde A) pMEtir, B) pMEsF y C) pMEcesT

Por otro lado, los genes se clonaron en el vector pTrc99AFF4. Siguiendo la nomenclatura utilizada en este trabajo, las construcciones generadas se denominaron pMTtir, para el plásmido que porta al gen *tir*, pMTsF porta al gen *espF* y pMTcT a *cesT*. Estas construcciones se utilizaron, como se describe más adelante, para generar plásmidos bicistrónicos que expresen 2 genes simultáneamente bajo el control del mismo promotor.

La secuencia obtenida de las construcciones se comparó con la secuencia previamente reportada para el LEE de EPEC E2348/69 serotipo 0127:H6 (Eliott y col. 1998), para verificar que los genes clonados no presentaran mutaciones. En todos los casos se obtuvo 100% de identidad, a excepción de la secuencia de *espF* en la que se detectaron dos cambios T por C y T por A en las posiciones 432

y 689, respectivamente. Sin embargo al alinear esta secuencia con la del genoma completo de EPEC 0127:H6 recientemente reportada (Iguchi y col., 2009) se obtuvo una identidad del 100%.

Construcción bicistrónica pMTBtir-hcT

Se insertó a *cesT* fusionado a la etiqueta de histidinas junto con el sitio de unión a ribosoma (RBS) de pET19b, en los sitios *Xba*I y *Hind*III de pMTtir. Para determinar la inserción de este gen en pMTtir se utilizó la técnica de PCR en colonia, y como control positivo de amplificación se aisló una colonia con la construcción pMEcT, que tiene a *cesT* clonado en pET19b. En la figura 15 se muestran algunas de las colonias que insertaron a *cesT*. Se purificó el DNA plasmídico de la colonia número 11 y se designó pMTBtir-hcT (Fig.15).

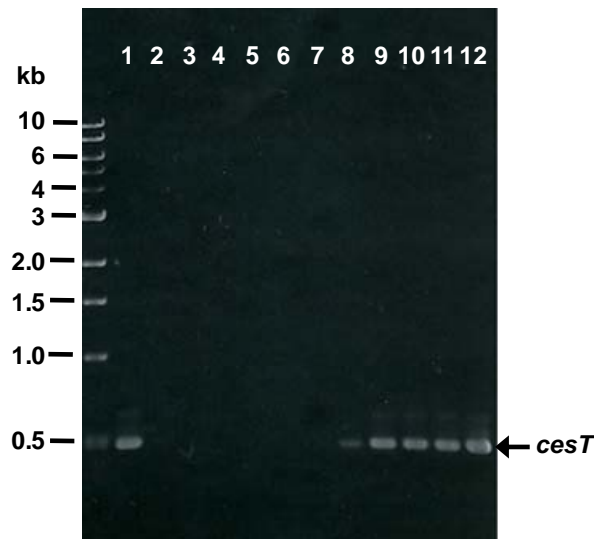


Figura 15. PCR de colonia de la construcción pMTBtir-hcT. Carril 1: pMEcT. Carriles 2 al 12 corresponden a las colonias transformantes.

Construcción bicistrónica pMTBIsF-hcF

Para generar la construcción bicistrónica que exprese los genes *espF* y *cesF* simultáneamente, *cesF*, la etiqueta de histidinas y el RBS de pET19b se insertaron en los sitios *XbaI* y *PstI* de pMTsF. Para verificar la presencia de los genes, se purificó DNA plasmídico de 3 transformantes y se analizó por restricción con *NdeI* y *BamHI* para extraer ambos genes (Fig. 16). Se seleccionó una clona con el patrón de restricción adecuado y se nombró pMTBIsF-hcF.

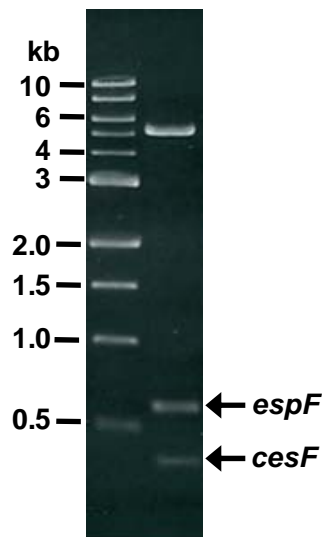


Figura 16. Análisis de restricción de la construcción pMTBIsSf-hcF con las enzimas *NdeI* y *BamHI*

Inducción de las construcciones bicistrónicas en *Salmonella* SJW1368

Se realizó un perfil de inducción para determinar las condiciones óptimas de producción de las proteínas. Se indujeron cultivos de *Salmonella* SJW1368 con las construcciones bicistrónicas pMTBItir-hcT y pMTBIsF-hcF con 0.1 mM de IPTG a 30°C en agitación y se tomaron muestras de los cultivos antes y después de agregar el IPTG, figuras 17 y 18 respectivamente.

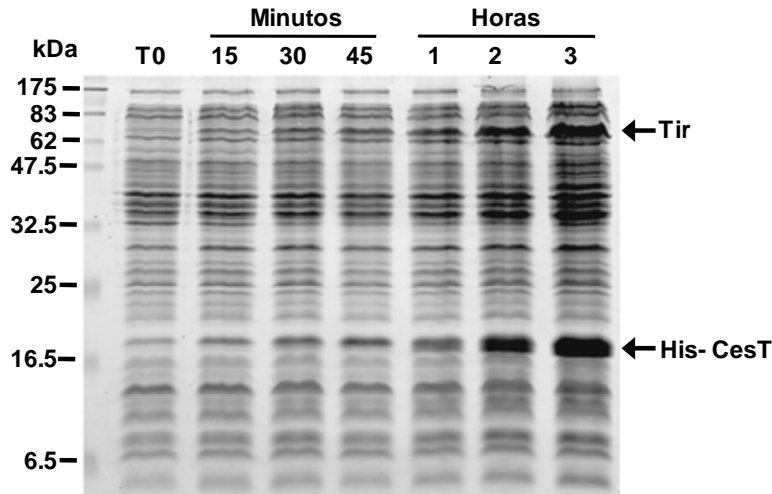


Figura 17. SDS PAGE del perfil de inducción de pMTBTir-hcT en SJW1368 donde la posición de las proteínas Tir y His-CesT se indica con flechas en color negro. T0: cultivo sin inducir. Los carriles restantes indican el tiempo en que se tomaron muestras después de la inducción.

En la figura 17 se observa la sobreproducción de la chaperona His-CesT de 20.2 kDa y el efector Tir de 56.5 kDa. Aunque éste último migra por encima del marcador de 62 kDa, ya se ha reportado la migración anómala de Tir en SDS-PAGE (Warawa y Kenny, 2001). Para corroborar la identidad de las proteínas CesT y Tir se realizó una inmunodetección utilizando anticuerpos específicos contra ambas proteínas (ver más adelante).

En el caso de pMTBI_sF-hcF las condiciones de inducción que se utilizaron fueron las mismas que se describieron para pMTBI_sTir-hcT, pero a diferencia de ésta la sobreproducción de las proteínas His-CesF de 15.8 kDa y EspF de 21 kDa se obtuvo a partir de las 3 horas de haber agregado el IPTG (Fig. 18) y no fue tan clara como la observada con Tir y His-CesT (Fig. 17).

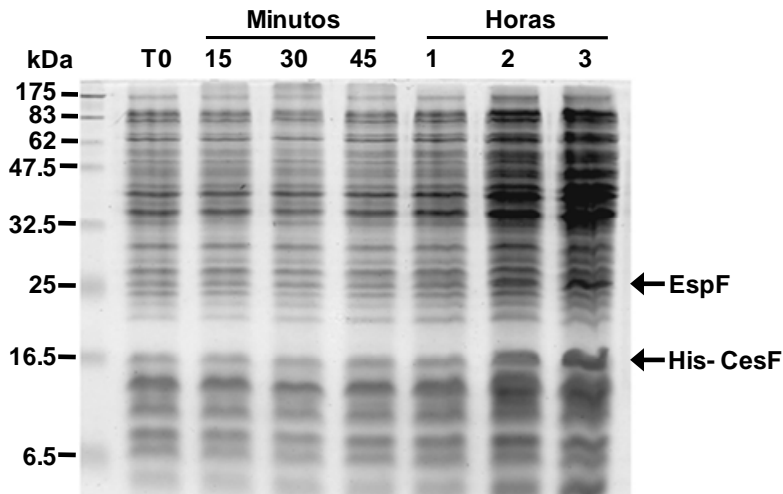


Figura 18. SDS PAGE del perfil de inducción de pMTBIStF-hcF en SJW1368. La posición de las proteínas EspF y His-CesF se indica con flechas en color negro. T0: cultivo sin inducir. Los carriles restantes indican el tiempo en que se tomaron las muestras después de la inducción.

Purificación de complejos efector- chaperona

Con los datos obtenidos de los perfiles de inducción se determinaron las condiciones de purificación de los complejos. Para las dos construcciones bicistrónicas la purificación de las proteínas se realizó a partir de un cultivo de 200 ml de *Salmonella* SJW1368 crecido en LB con ampicilina en las condiciones ya descritas, variando únicamente el tiempo de inducción que fue de 3 horas para pMTBIStir-hcT y 4 para pMTBISsF-hcF. Después de la inducción, las células se lisaron y centrifugaron. La fracción soluble del lisado se cargó en una columna empacada con agarosa acoplada a níquel. Se tomaron muestras de cada una de las fracciones obtenidas de la purificación así como de la fracción soluble del lisado celular que se cargó a la resina para analizarlas por SDS PAGE (Fig. 19).

En la figura 19 se observa la coelución de Tir con His-CesT a partir de la fracción de 80 mM de imidazol, obteniéndose la mayor cantidad de proteínas en las fracciones de 200 y 300 mM de imidazol. En las fracciones eluidas con altas concentraciones de imidazol se observa una banda que migra a la altura del

marcador de 32 kDa, que corresponde al dímero de CesT (Fig. 19), esto se confirmó mediante inmunodetección con anticuerpos anti CesT, ver más adelante.

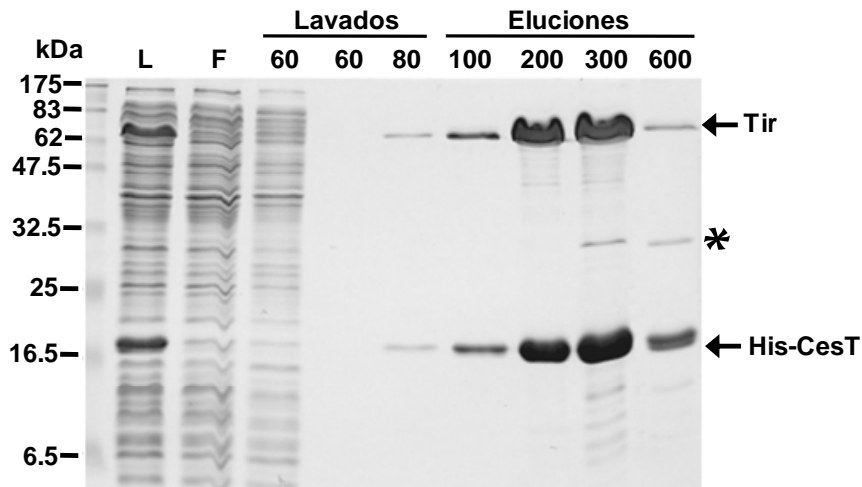


Figura 19. Copurificación del efector Tir con His-CesT, señaladas con flechas en color negro y un asterisco que indica al dímero de His-CesT. Donde L: corresponde al lisado celular soluble. F: fracción no unida a la resina. 60 y 80: corresponden a los lavados con imidazol. Los carriles 100 a 600: son las fracciones eluidas con concentraciones crecientes de imidazol.

Como un control adicional para demostrar que la interacción entre Tir y His-CesT es específica se coexpresó a la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) junto con estas proteínas en células de *Salmonella* SJW1368 y se realizó la copurificación como se mencionó antes. En la figura 19A se muestra que a pesar de que en la fracción soluble del lisado que se cargó en la resina de níquel las proteínas Tir, CAT y His-CesT se encuentran en gran cantidad, His-CesT sólo interactúa con Tir, y ambas proteínas coeluyen juntas de la resina, mientras la CAT se observa en la fracción que no se unió a His-CesT ni a la resina (Fig. 19A).

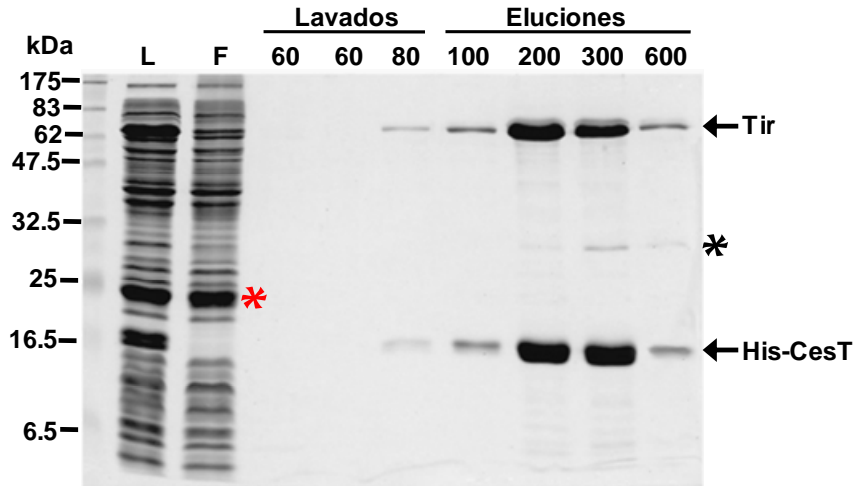


Figura 19A. Copurificación del efector Tir con His-CesT, señaladas con flechas, el asterisco en color rojo señala a la CAT, mientras que el que está en negro indica al dímero de His-CesT. Donde L: corresponde al lisado celular soluble. F: fracción no unida a la resina. 60 y 80: corresponden a los lavados con imidazol. Los carriles 100 a 600: son las fracciones eluidas con concentraciones crecientes de imidazol.

Una muestra del complejo Tir-HisCesT eluido con 600 mM de imidazol se transfirió a una membrana de nitrocelulosa por duplicado, una de ellas se incubó con anticuerpos anti Tir (Fig. 20A) y la otra con anti CesT (Fig. 20B). En ambos casos se obtuvo el reconocimiento de una banda que migra a la altura reportada para estas proteínas.

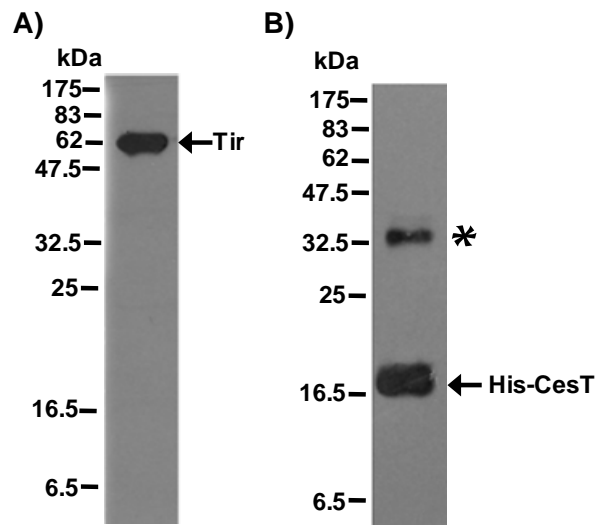


Figura 20. Inmunodetección de Tir y His-CesT, las proteínas se señalan con flechas en color negro. A) Inmunodetección utilizando anticuerpos anti Tir. B) Inmunodetección utilizando anticuerpos anti CesT, el asterisco indica la posición del dímero de la chaperona.

Las condiciones que se utilizaron para la copurificación del efector EspF con su chaperona CesF etiquetada en el N-terminal con histidinas fueron similares a las utilizadas para el complejo Tir-HisCesT. El efector EspF coeluye con His-CesF a concentraciones superiores a 200 mM de imidazol. Se observó también la presencia de una banda que migra a la altura del marcador de 32 kDa que concuerda con la masa predicha para el dímero de la chaperona His-CesF que sólo se detecta en fracciones eluidas con altas concentraciones de imidazol (Fig. 21).

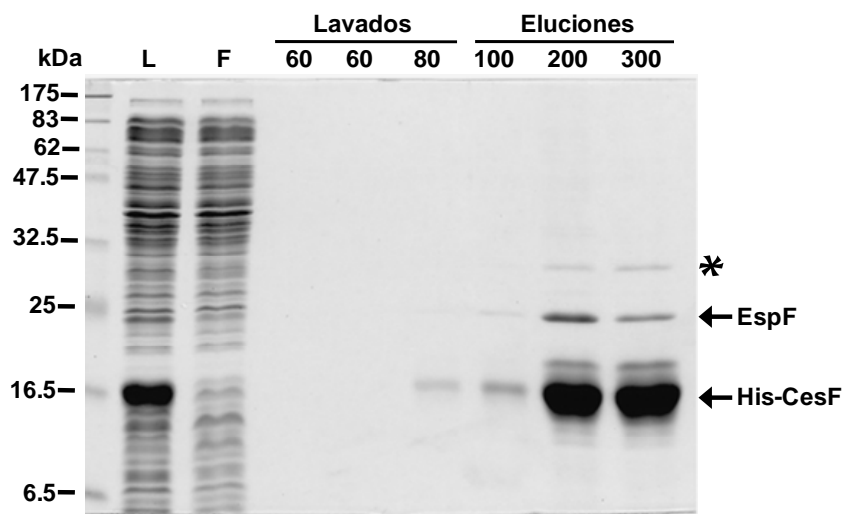


Figura 21. Copurificación del efector EspF con His-CesF, señaladas con flechas en color negro; el asterisco indica la posición del dímero de His-CesF. Donde L: corresponde al lisado celular soluble. F: fracción no unida a la resina. 60 y 80: corresponden a los lavados con imidazol. Los carriles 100 a 600: son las fracciones eluidas con concentraciones crecientes de imidazol.

En el laboratorio se tiene una construcción bicistrónica que produce al translocador EspB con su chaperona His-CesAB (Gaytán, 2008; datos no publicados). En la figura 22 se muestra la copurificación de estas dos proteínas, sin embargo esta interacción no es tan clara como las de los efectores con sus chaperonas mostradas en las figuras 17 y 21. Se observa una banda que migra a la altura del marcador de tamaño molecular de 25 kDa, que corresponde al dímero de His-CesAB (Fig. 22).

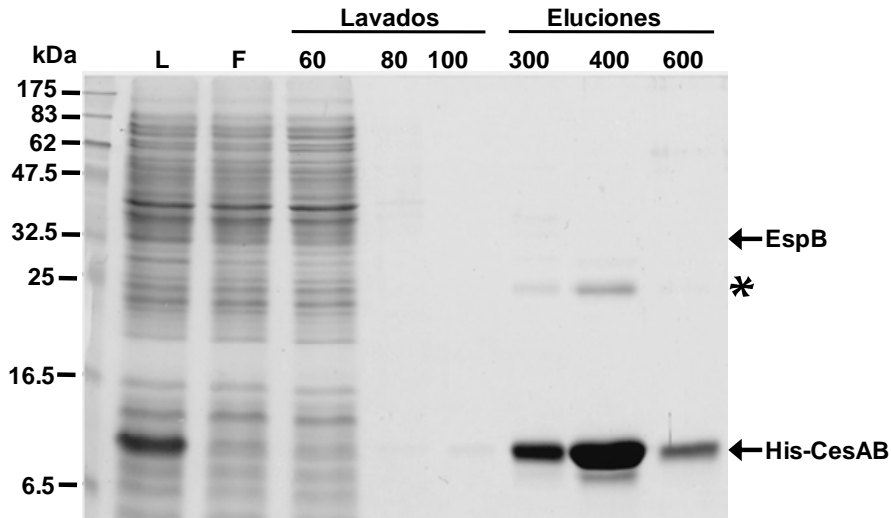


Figura 22. Copurificación del translocador EspB con His-CesAB, señaladas con flechas en color negro; el asterisco indica la posición del dímero de His-CesAB. Donde L: corresponde al lisado celular. F: fracción no unida a la resina. 60, 80 y 100: corresponden a los lavados con imidazol. Los carriles 300 a 600: son las fracciones eluidas con concentraciones crecientes de imidazol

Se transfirieron muestras de las fracciones eluidas con 300 mM y 400 mM de imidazol a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con anticuerpos anti CesAB y anti EspB, respectivamente (Fig. 23).

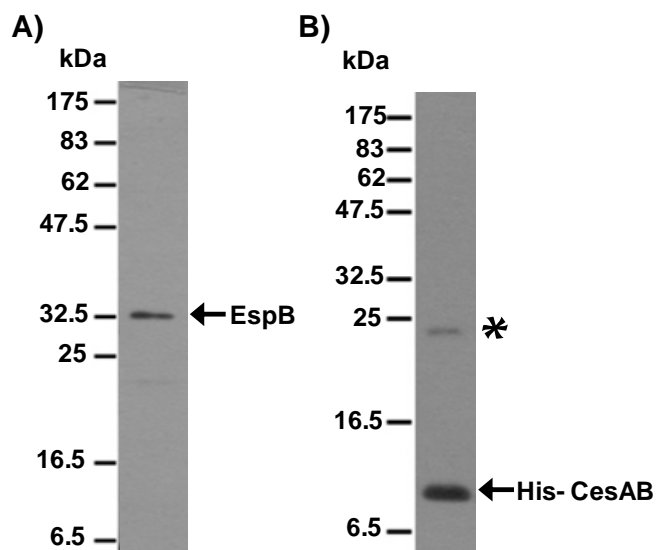


Figura 23. Inmunodetección de EspB y His-CesAB, las proteínas se señalan con flechas en color negro. A) Inmunodetección utilizando anticuerpos anti EspB B) Inmunodetección utilizando anticuerpos anti CesAB, el asterisco indica la posición del dímero de la chaperona

Purificación de las chaperonas CesT y CesF

Para realizar ensayos de interacción, se purificó también a las chaperonas His-CesT (Fig. 24) y His-CesF (Fig. 25) a partir de cultivos de 200 ml de células BDP. Se tomaron muestras de cada fracción obtenida y se corrieron en SDS PAGE. En la figura 24 se observa la purificación de His-CesT, que por ser una proteína altamente soluble se purifica en grandes cantidades

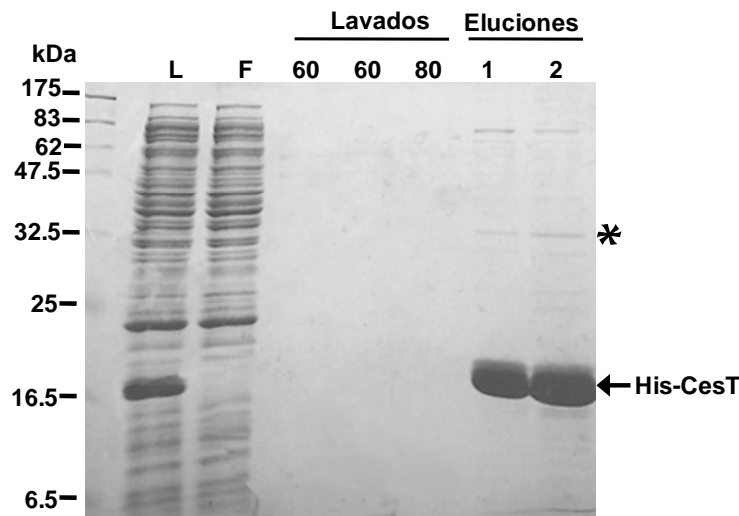


Figura 24. Purificación de His-CesT. Donde: L: Fracción soluble del lisado celular que se cargó en la resina. F: Fracción no unida a la resina. 60 y 80: corresponden a los lavados con imidazol. 1 y 2: fracciones eluidas de la resina con 200 mM de imidazol.

Por otro lado His-CesF a pesar de ser considerada también una proteína soluble se purificó en menor cantidad, en comparación con His-CesT.

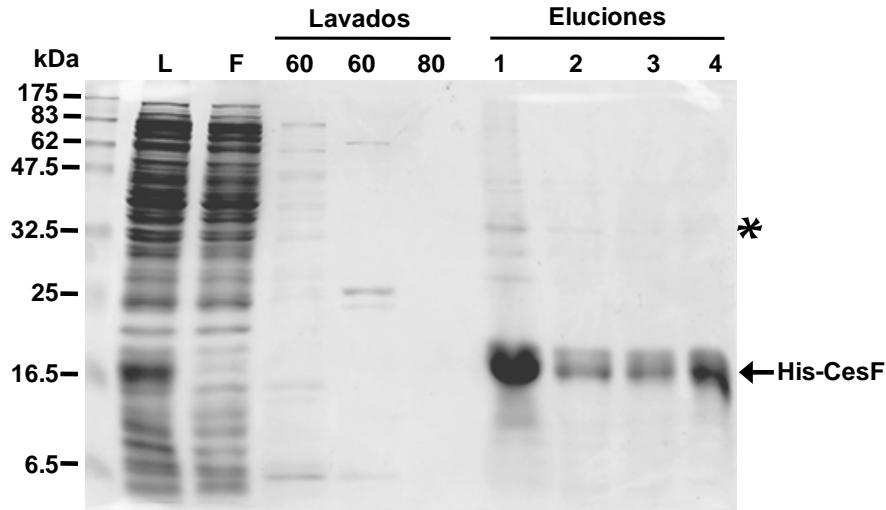


Figura 25. Purificación de His-CesF. Donde L: Fracción soluble del lisado celular que se cargó en la resina. F: Fracción no unida a la resina. 60 y 80: corresponden a los lavados con imidazol. 1 a 4: fracciones eluidas de la resina con 200 mM de imidazol.

Purificación de GST-EscN y GST

Una técnica utilizada frecuentemente para incrementar la solubilidad de proteínas recombinantes consiste en fusionar a la proteína de interés con la Glutación-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, lo que adicionalmente facilita su purificación por cromatografía de afinidad a glutatión (Smith y Johnson 1988). Debido a esto, la proteína de fusión GST se utiliza ampliamente en ensayos de copurificación para detectar interacciones proteína-proteína (Sambrook y Russell, 2001). En este trabajo se purificó a la ATPasa EscN fusionada a la GST en su extremo N-terminal (74.8 kDa). La purificación de la proteína se realizó con amortiguador PBS con 1% de Tritón X-100 y se eluyó en cuatro fracciones de 1 ml, con 10 mM de glutatión reducido en Tris pH 8.0. Se tomaron muestras de distintas fracciones de la purificación y se analizaron por SDS PAGE (Fig. 26).

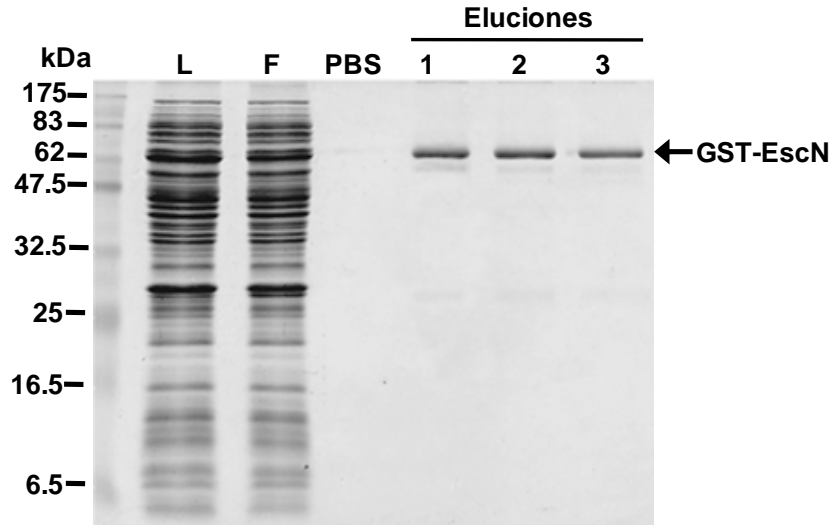


Figura 26. SDS PAGE de la purificación de GST-EscN. Donde L: Fracción soluble del lisado celular que se cargó en la resina. F: Fracción no unida a la resina. PBS último lavado con amortiguador del mismo nombre. Carriles 1-3 corresponden a las fracciones eluidas con 10 mM de glutatión reducido.

En ensayos de copurificación es importante que la interacción entre las proteínas no se deba a la proteína de fusión, razón por la cual se purificó a la proteína GST (26 kDa) para utilizarla como control negativo. La purificación de esta proteína se realizó en las mismas condiciones que para GST-EscN salvo pequeñas modificaciones: se utilizó un cultivo de 100 ml de células BDP transformadas con el plásmido pGEX-4T-2 y la inducción se realizó con 0.1 mM de IPTG a 30°C por 4 h. La figura 27 muestra las fracciones de la purificación de GST.

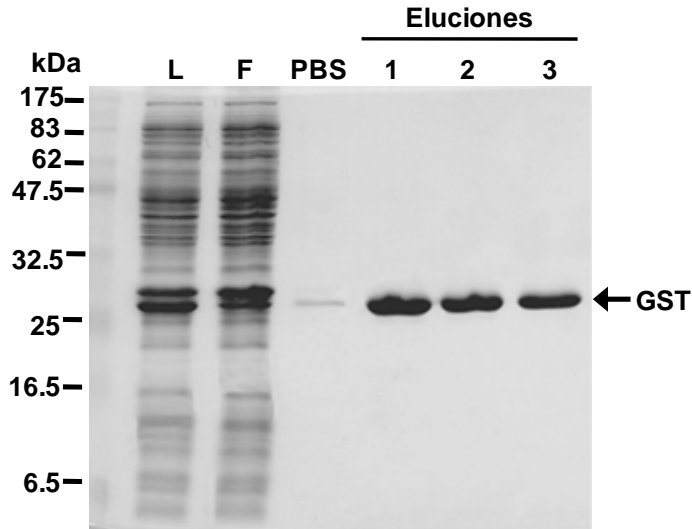


Figura 27. SDS PAGE de la purificación de GST. Donde L: Fracción soluble del lisado celular que se cargó en la resina. F: Fracción no unida a la resina. PBS último lavado con amortiguador del mismo nombre. Carriles 1-3 corresponden a las fracciones eluidas con 10 mM de glutatión reducido.

Ensayos de interacción entre EscN y el complejo efector-chaperona (Tir-HisCesT)

Inmunorréplica de afinidad tipo Western blot (*Affinity Blot o Far Western*)

La técnica de inmunorréplica de afinidad tipo Western permite determinar de una manera rápida y sencilla si dos proteínas interactúan entre sí. En una primera aproximación para evaluar la interacción de EscN con el complejo Tir-HisCesT, se transfirieron 4 μ g de proteína de este complejo así como de albúmina sérica bovina (BSA) como control negativo, de un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes a una membrana de nitrocelulosa, este procedimiento se hizo por duplicado (Fig. 28A). Una membrana se incubó con 30 μ g de proteína His-EscN purificada. Después de extensivos lavados, se realizó la inmunodetección con anticuerpos anti EscN. Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones de este ensayo, His-EscN sólo es capaz de unirse a His-CesT y no a Tir o BSA (Fig. 28B). Para validar este experimento, es necesario demostrar que el anticuerpo utilizado no cruza con las proteínas del complejo efector-chaperona; para ello la segunda membrana se probó con anticuerpos anti

EscN. En la figura 28C se observa que el anticuerpo no se une de forma inespecífica a ninguna de las proteínas del complejo Tir-HisCesT.

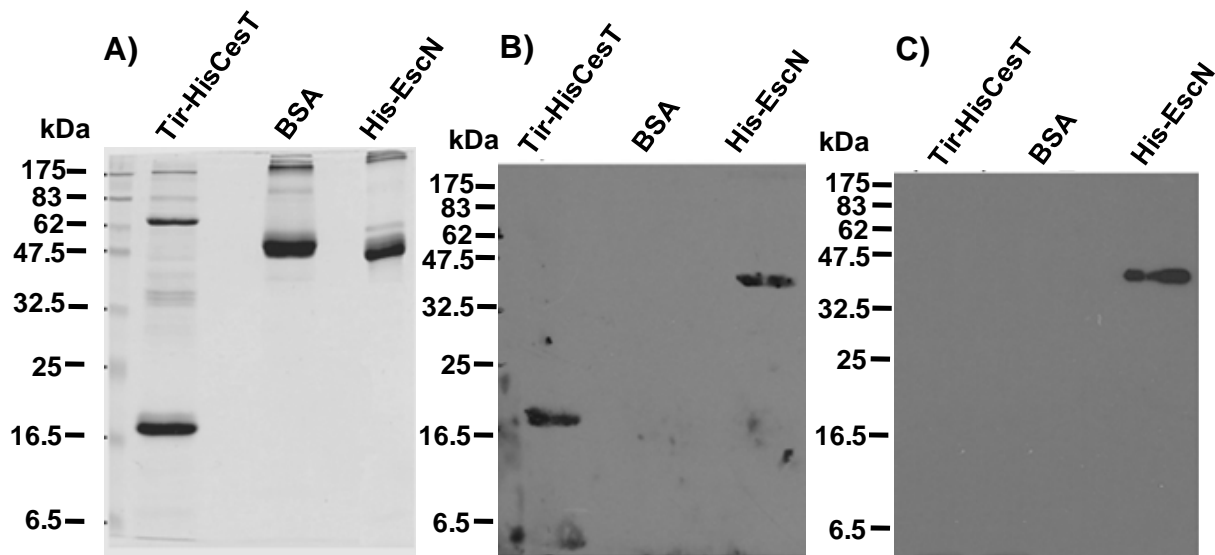


Figura 28. Inmunorréplica de afinidad tipo Western. A) Gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie. B) Inmunodetección de la membrana incubada con 30 μ g de His-EscN utilizando anticuerpos anti-EscN. C) Inmunodetección de la membrana utilizando anticuerpos anti-EscN.

Para corroborar los resultados anteriores, se realizó el mismo ensayo, pero utilizando a His-CesT como sonda en la solución de incubación de la membrana. Sin embargo, His-CesT no fue capaz de reconocer al efector Tir (Fig. 29). Debido a esto, la metodología de inmunorréplica de afinidad se dejó de utilizar en este trabajo como se discutirá en la siguiente sección.

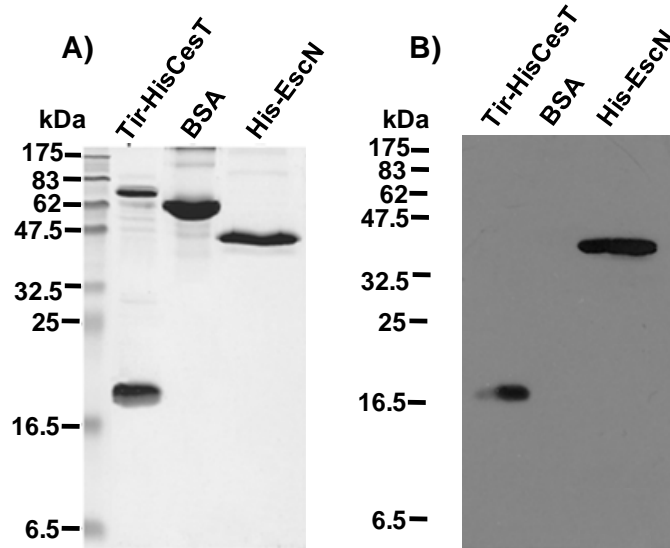


Fig. 29 Inmunorréplica de afinidad tipo western. A) Gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie. B) Inmunodetección de membrana incubada con 30 μ g de His-CesT utilizando anticuerpos anti-CesT.

Co purificación (*pull down*) del complejo Tir-His CesT con GST-EscN

La mayoría de las proteínas recombinantes fusionadas a GST son altamente solubles por lo que pueden utilizarse en una gran variedad de aplicaciones moleculares. La técnica de copurificación empleada en este trabajo consistió en la incubación de 50 μ g de GST o GST-EscN con 100 μ g del complejo Tir-HisCesT por 2 horas en distintas condiciones; como son la presencia de nucleótido ATP o AMP-PNP, para favorecer la oligomerización de la enzima, la concentración de NaCl o el tipo de amortiguador en el que el ensayo se llevó a cabo. La interacción entre GST-EscN y el complejo Tir-HisCesT sólo se detectó en amortiguador TN a bajas concentraciones de sal (150 mM) y en presencia de nucleótido. Debido a la naturaleza transitoria de estas interacciones no es posible observar la co-purificación de las proteínas en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie, por lo que es necesario utilizar anticuerpos que reconozcan a las proteínas con las que se busca la interacción, en este caso se utilizaron anticuerpos anti CesT (Fig. 30).

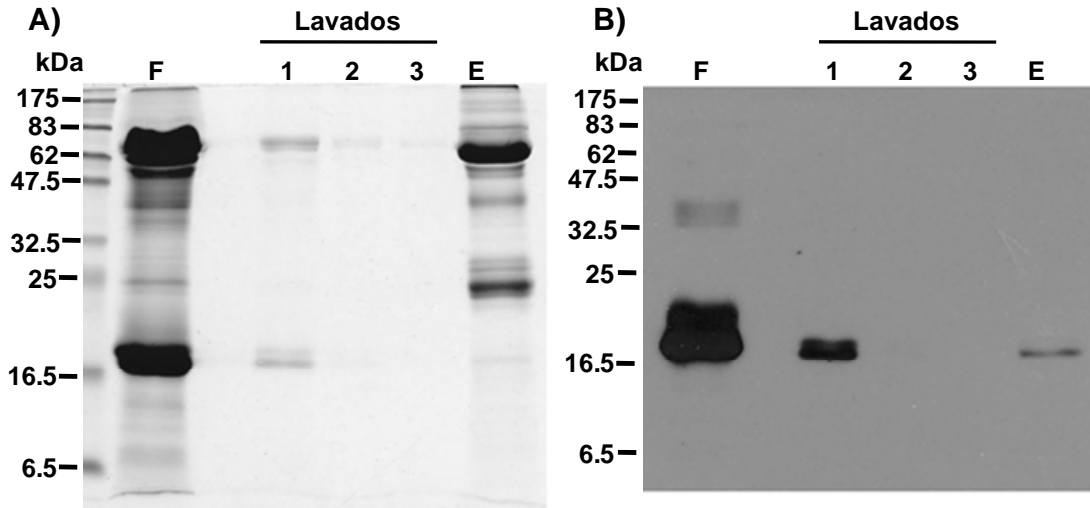


Figura 30. Copurificación del complejo Tir-HisCesT con GST-EscN. Donde F: Fracción que no se une a GST-EscN. Carriles 1 a 3: Lavados con amortiguador TN. E: Elución de las proteínas con 20 mM de glutatión reducido. A) Tinción con Coomassie. B) Inmunodetección utilizando anticuerpos anti CesT.

En el caso de la proteína GST no se observó interacción con el complejo Tir-HisCesT (Fig. 31).

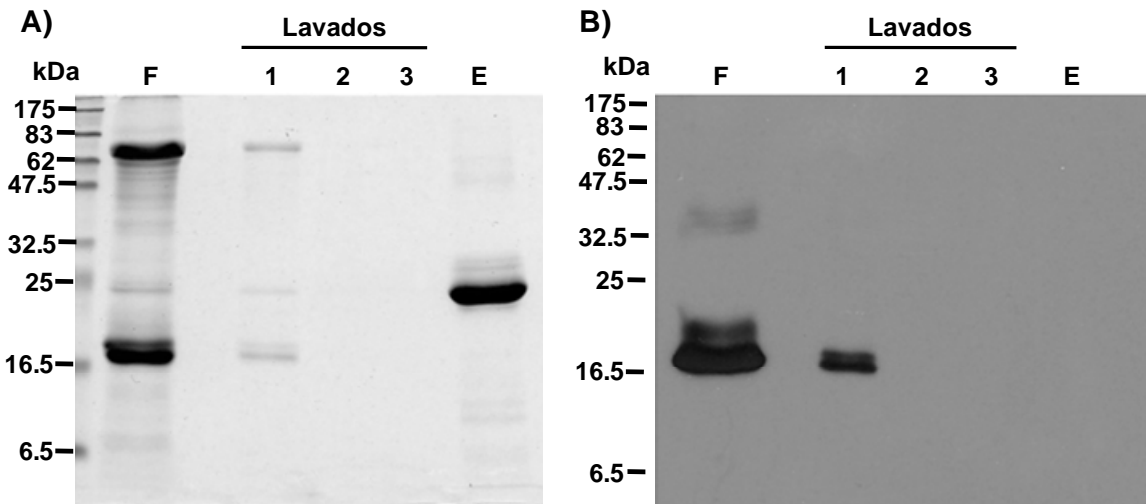


Figura 31. Copurificación del complejo Tir-HisCesT con GST. Donde F: Fracción que no se une a GST. Carriles 1 a 3: Lavados con amortiguador TN. E: Elución de las proteínas con 20 mM de glutatión reducido. A) Tinción con Coomassie. B) Inmunodetección utilizando anticuerpos anti CesT.

Copurificación del complejo Tir-HisCesT o His-CesT con versiones mutantes de GST-EscN

Uno de los intereses del laboratorio es caracterizar la función de la región C-terminal de EscN, la cual se piensa podría reconocer a los complejos efector-chaperona. Debido a esto, se realizó en el grupo el alineamiento múltiple de secuencias de ATPasas del SST3 de diferentes organismos, y se identificaron residuos que están altamente conservados en el dominio C-terminal de estas proteínas. Se realizó la mutagénesis dirigida de éstos (Fig. 32), y se evaluó la capacidad de dichas mutantes de EscN para complementar la secreción de proteínas en una cepa de EPEC Δ escN (Andrade y col., 2009 datos no publicados).

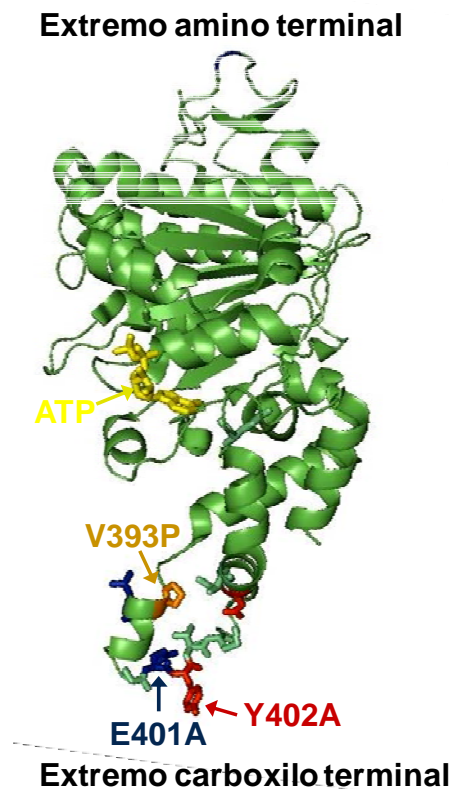


Figura 32. Estructura cristalográfica de EscN carente de los primeros 102 aminoácidos donde se observa la posición de las mutaciones puntuales con las que se evaluó interacción proteína-proteína con el complejo Tir-HisCesT o His-CesT sola (Modificado de Zarivach y col., 2007).

En este trabajo se utilizaron las proteínas EscN mutantes que no restauraron la secreción de la cepa Δ escN, se fusionaron en el extremo N-terminal a la GST y se purificaron como se mencionó anteriormente (Fig 33) con el fin de hacer ensayos de interacción *in vitro*, mediante la técnica de copurificación con el complejo Tir-HisCesT.

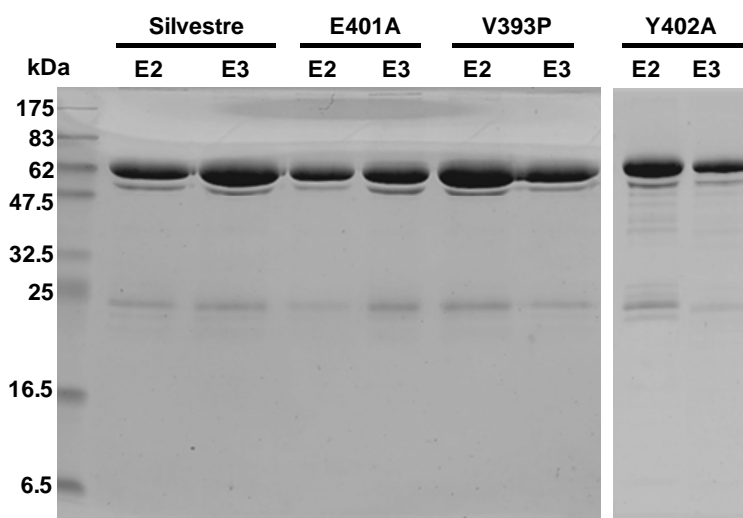


Figura 33. Purificación de GST-EscN silvestre y mutantes E401A, V393P e Y402A. Donde E2 y E3 corresponden a la segunda y tercera elución, respectivamente, con 10 mM de glutatión reducido.

Las tres mutantes evaluadas, EscN^{V393P}, EscN^{E401A} y EscN^{Y402A} interactúan con el complejo efector-chaperona, a diferencia de GST y GST-FliL, proteína del SST3 flagelar que se utilizó como control negativo, en donde no se observa señal del anticuerpo anti CesT en la fracción eluida. (Fig. 34).

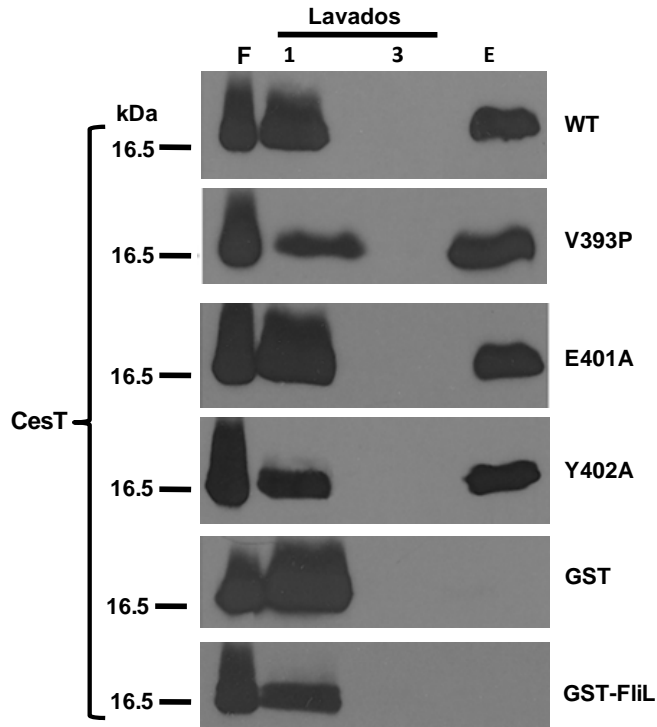


Figura 34. Inmunodetección con anticuerpos anti CesT de los ensayos de copurificación del complejo Tir-HisCesT con GST-EscN silvestre o mutantes puntales: V393P, E401A, Y402A, GST y GST-FilL. Donde F corresponde a las proteínas que no se unieron a GST-EscN inmobilizada en la resina de Sefarosa acoplada a glutatión, Carriles 1 y 3 son el primer y último lavado, respectivamente con amortiguador TN y E es la elución con 10 mM de glutatión reducido.

Por otra parte, se realizaron ensayos de copurificación *in vitro* de His-CesT con GST-EscN silvestre, las mutantes V393P y E401A así como con GST. Al igual que los resultados obtenidos con el complejo efector-chaperona, GST-EscN silvestre y las versiones mutantes, pero no GST, interactúan y coeluyen con la chaperona His-CesT (Fig. 35).

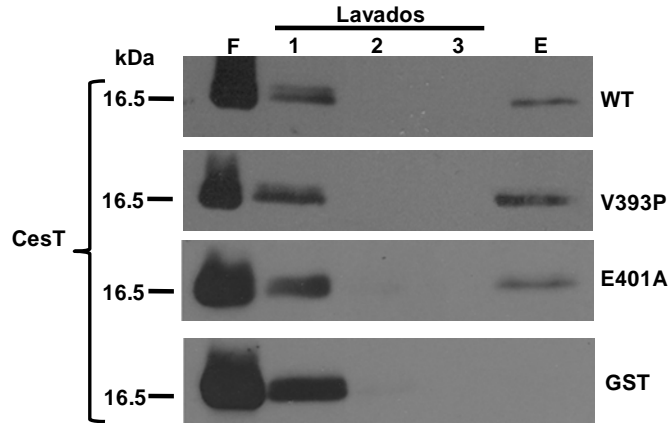


Figura 35. Inmunodetección con anticuerpos anti CesT del ensayo de copurificación de His-CesT con GST-EscN silvestre o mutantes puntales: V393P, E401A y GST. Donde F corresponde a la proteína His-CesT que no se unió a GST-EscN inmovilizada en la resina de Sefarosa acoplada a glutatión, Carriles 1 a 3 son el primer, segundo y último lavado, respectivamente con amortiguador TN y E: es la fracción eluída con 10 mM de glutatión reducido.

Para confirmar los resultados mostrados anteriormente, se realizaron ensayos de copurificación mezclando la fracción soluble de lisados celulares que contuvieran a Tir-HisCesT o His-CesT y a EscN sin etiqueta, utilizando ahora resina acoplada a níquel para fijar al complejo efector-chaperona o a la chaperona sola y copurificar a EscN. Los resultados son similares a los observados con la resina acoplada a glutatión, EscN copurifica con el complejo Tir-HisCesT y con la chaperona His-CesT. El control negativo de este experimento consistió en incubar el lisado que contenía a EscN sin etiqueta con la resina de níquel para demostrar que ésta no se une inespecíficamente a la resina (Fig. 36).

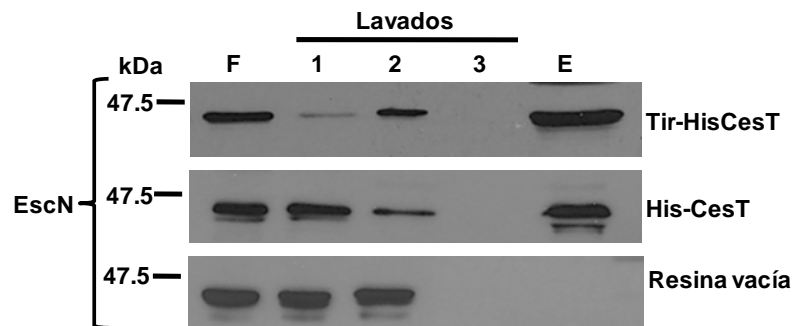


Figura 36. Inmunodetección con anticuerpos anti EscN de los ensayos de copurificación de EscN silvestre con el complejo Tir-HisCesT o His-CesT. Donde F corresponde a la proteína EscN que no se unió al complejo Tir-HisCesT o His-CesT sola inmovilizadas en la resina de Agarosa acoplada a níquel, Carriles 1 a 3 son el primer, segundo y último lavado, respectivamente con amortiguador TNI y E es la fracción eluída con TNI con 200 mM de imidazol.

DISCUSIÓN

El SST3 se utiliza para el ensamblaje de dos estructuras macromoleculares distintas. Una de éstas es el flagelo, que es un apéndice móvil que le permite a la bacteria desplazarse en medio líquido y la otra es una estructura denominada complejo aguja o inyectisoma, que se utiliza para inyectar efectores de virulencia durante la infección de células eucariontes (Cornelis, 2006).

Debido a que la arquitectura general de los inyectisomas está ampliamente conservada entre distintas especies de patógenos Gram negativos, es posible identificar componentes comunes, como son: un aparato de secreción localizado en la base de la estructura, proteínas translocadoras que forman un poro en la membrana plasmática del hospedero y efectoras que alteran las vías de transducción de señales, chaperonas específicas que se unen a los efectores en el citoplasma de la bacteria impidiendo que se degraden, y activadores transcripcionales específicos. Sin embargo, en la mayoría de los casos se desconocen los mecanismos que controlan tanto la síntesis como el reconocimiento y el orden de secreción de proteínas a través de estos sistemas (Botteaux y col., 2007).

A pesar de que existe una señal de secreción dentro de los primeros aminoácidos de las proteínas secretadas por el SST3 y de que en muchos casos la secreción de éstas depende de su interacción con chaperonas citoplásmicas dentro de la bacteria que las dirigen al aparato de secreción; aún se discute qué tipo de señal es la que reconoce el sistema para discriminar a las proteínas que serán secretadas. Adicionalmente, se ha demostrado que en este direccionamiento o conducción hacia el aparato secretor también participa la ATPasa específica del SST3 (Gauthier y Finlay, 2003; Akeda y Galán, 2005, Ehrbar y col., 2006, Stafford y col., 2007). En el 2004 se aisló la mutante puntual L373P en el C-terminal de la ATPasa InvC del SST3 de *Salmonella*, que a pesar de oligomerizar e hidrolizar ATP como la enzima silvestre, no restaura la secreción cuando se introduce en la

cepa Δ invC (Akeda y Galán, 2004). Posteriormente, se reportó que esta mutante no interactúa con el complejo efector-chaperona SptP-SicP, sugiriendo que el extremo C-terminal de InvC es responsable del reconocimiento de los complejos efector-chaperona (Akeda y Galán, 2005). En el 2007 se obtuvo la estructura cristalográfica de la ATPasa EscN de EPEC con la mutación V393P, que es equivalente a la L373P de InvC. Se observó que esta mutación no afecta la estructura general de la proteína sin embargo altera la conformación del C-terminal debido al rompimiento de una α -hélice en la región donde se postula ocurre el reconocimiento de los complejos efector-chaperona (Zarivach y col., 2007).

Por otro lado, diferentes trabajos sugieren que las chaperonas contribuyen al reconocimiento de los efectores por el sistema secretor, incluso se propone que la unión de la chaperona al CBD de su efector puede facilitar la formación de una estructura secundaria que cambiaría la conformación de esta región, lo que funcionaría como una señal de reconocimiento de carácter estructural para el aparato secretor del SST3 (Birtalan y col., 2002). El caso de la chaperona CesT de EPEC es muy interesante, primero se estableció que es indispensable para la estabilidad y secreción de Tir y por tanto para la formación de la lesión A/E (Abe y col., 1999). Posteriormente se observó que CesT interactúa con la ATPasa EscN y se propuso que esta interacción sirve para dirigir a Tir a la base del aparato de secreción (Gauthier y Finlay, 2003). Finalmente, se demostró que CesT es capaz de interactuar con al menos ocho efectores diferentes, además de Tir, tanto de la isla LEE como codificados en otras regiones del cromosoma, los cuales son: Map, EspH, EspZ, EspG, EspF, NleA, NleH y NleH2. En este trabajo sugieren que la interacción coordinada de CesT con Tir y la secreción de este efector son eventos claves en la sincronización del orden en que los efectores son secretados por EPEC (Thomas y col., 2007).

En el presente trabajo se abordó la pregunta del reconocimiento de los complejos efector-chaperona por la ATPasa. Se construyeron plásmidos bicistrónicos que

expresan al mismo tiempo y a partir del mismo promotor a tir y cesT así como a espF y cesF, en los dos casos los genes de las chaperonas están fusionados a una etiqueta que codifica para 10 histidinas en la región 5'. Mediante cromatografía de afinidad a níquel se observó que Tir coeluye con His-CesT y EspF con His-CesF. Estas interacciones se mantuvieron estables incluso a concentraciones altas de NaCl (500 mM) e imidazol (300 mM), por lo que se pueden observar directamente en una tinción con Coomassie (Fig. 19 y Fig. 21, respectivamente). Para corroborar estos resultados, se construyeron 2 plásmidos en los que la etiqueta de histidinas se fusionó a tir y espF, y éstos se insertaron río abajo de sus respectivas chaperonas clonadas en pTrc99A. Sin embargo, utilizando estas construcciones, no se observó la copurificación de las chaperonas con los efectores etiquetados. Para determinar si la producción de proteína se afectó durante el experimento, se hicieron ensayos de inmunodetección con anticuerpos anti histidinas para detectar a los efectores en los lisados celulares completos pero no se detectó a His-Tir ni a His-EspF (datos no mostrados), lo que indica que éstos se degradan aún cuando se coexpresaron con sus chaperonas. Posiblemente esto se debe a que en las construcciones bicistrónicas, los genes río abajo que tienen la etiqueta de histidinas y el sitio de unión a ribosomas (RBS) extraídos de pET19b, se expresan en mayor cantidad que los genes clonados en pTrc99A, como ha sido previamente reportado (Minamino y Macnab 2000a). La causa de esto puede ser que la secuencia del RBS de pET19b se diseñó para sobreproducir proteínas recombinantes (Dubendorff y Studier 1991), mientras que pTrc99A tiene el RBS de lacZ (Amman y col., 1988). Adicionalmente, se ha reportado que las chaperonas del SST3 interactúan entre sí formando homodímeros que se unen al efector, por lo que existe una relación estequiométrica de dos monómeros de chaperona por un efector (Ghosh 2004). Esto explicaría por qué los efectores son estables y copurifican con las chaperonas cuando éstas provienen de pET19b y por el contrario si se sobreproduce a los efectores, la cantidad de chaperona podría no ser suficiente para estabilizarlos y se degradarían.

Además de las chaperonas, otro componente necesario para la secreción eficiente de proteínas en los SST3 es la ATPasa. Ésta es una enzima multifuncional que además de aportar la energía para que se ensamble el sistema, también se ha propuesto que participa en el direccionamiento de las proteínas secretadas a la base del aparato secretor, e interactúa con diferentes componentes como chaperonas, dominios citosólicos de las proteínas membranales del aparato exportador y proteínas reguladoras que controlan el orden de secreción en el SST3 (Lorenz y Büttner, 2009, Stone y col., 2008). Por mucho tiempo se pensó que la energía de hidrólisis de ATP era indispensable para la secreción de proteínas por estos sistemas debido a que además de disociar a la chaperona de su efector inmediatamente antes de que éste sea secretado, también se utilizaría para desplegar al efector permitiendo su paso a través del estrecho canal del SST3 (Gauthier y Finlay, 2003; Akeda y Galán, 2005; Lorenz y Büttner, 2009). No obstante, recientemente se demostró que la secreción de proteínas por el SST3 flagelar puede ocurrir aún en ausencia de la ATPasa FliI. En este nuevo modelo se propone que FliI sólo participa en la conducción de las proteínas que serán secretadas hacia la base del aparato de exportación, en su inserción inicial en el canal y en la disociación del complejo que FliI forma con el regulador FliH de la base del inyectisoma. En este caso, la continuación del desplegamiento y posterior secreción a través del SST3 se realizaría mediante la energía de la fuerza protón motriz (Minamino y Namba, 2008).

En este trabajo se utilizaron las técnicas de copurificación e inmunorreplica de afinidad tipo Western Blot para demostrar la interacción de EscN con His-CesT en complejo con Tir y con His-CesT sola. A pesar de que en el 2003 se demostró mediante inmunorreplica de afinidad que EscN interactúa con Tir (Gauthier y Finlay, 2003), en el presente trabajo no se observó dicha interacción empleando esta técnica (Fig. 28). Esto puede deberse a que el ensayo de interacción se realizó en condiciones nativas a diferencia de lo reportado por estos autores, en donde antes de incubar a las proteínas contenidas en la membrana, con EscN purificada, éstas se desnaturalizaron con urea. Estos autores no observaron

interacción de EscN con BSA después de incubarla con urea, sin embargo es posible que este agente desnaturalizante modifique la estructura nativa de Tir favoreciendo su interacción con EscN. Otra posibilidad que explica la falta de interacción entre este efector y la ATPasa es que las condiciones utilizadas en este trabajo no permitieron que Tir se pliegue correctamente después de transferirlo a la membrana de nitrocelulosa, para corroborar esto se hizo una inmunorréplica de afinidad donde se utilizó a His-CesT como sonda, pero los resultados fueron los mismos, CesT no se unió a Tir (Fig. 29). Por este motivo se decidió dejar de utilizar esta técnica para evaluar interacciones de EscN con otras chaperonas o complejos efector-chaperona.

Por otra parte, la copurificación mediante cromatografía de afinidad a glutatión es utilizada frecuentemente para demostrar interacciones proteína-proteína. En 2005 mediante esta técnica se demostró la interacción de His-InvC con la chaperona GST-SicP y con el complejo efector-chaperona SptP-GSTSicP, pero no con el efector SptP solo. En el mismo trabajo se reportó que la hidrólisis de ATP no se necesita para estas interacciones, aunque éstas son más eficientes cuando InvC forma hexámeros que cuando está como monómero (Akeda y Galán 2005). En este sentido, se ha demostrado que la unión de nucleótido favorece la oligomerización de las ATPasas. En el caso de Flil, se observó que forma estructuras anulares con simetría hexamérica en presencia de ATP, y más aún, cuando se sustituyó el ATP por el análogo no hidrolizable AMP-PNP, la formación de estas estructuras anulares se incrementó 20 veces (Claret y col., 2003). Debido a esto, en el presente trabajo se utilizó este análogo no hidrolizable en los ensayos de copurificación de Tir-HisCesT o His-CesT sola con GST-EscN. En la figura 30 y 31, respectivamente, se observa que His-CesT en complejo con Tir, coeluye con GST-EscN pero no con GST. Para validar estos resultados se decidió utilizar otra proteína del SST3 flagelar fusionada a la GST, ya que en los ensayos de copurificación in vitro pudiera haber unión inespecífica. Se probó la interacción de Tir-His-CesT con la proteína flagelar GST-Flil, y al igual que sucedió con la

proteína de fusión GST, el complejo no copurificó con GST-FliL (Fig. 33). Esto demuestra que la interacción que reportamos es específica.

Con respecto al complejo EspF-His-CesF no fue posible evaluar interacciones con EscN debido a la inestabilidad del mismo, a pesar de que se utilizaron diferentes condiciones para resolver este problema, como son: probar diferentes amortiguadores durante el proceso de purificación y diálisis de las proteínas. Estos fueron PBS, TN y TNED (20 mM de Tris pH 7.4, 300 mM de NaCl, 1 mM de EDTA y 1mM de DTT), en los que se incluyeron distintos reactivos como glicerol al 20% o etanol al 15 % para incrementar la estabilidad del complejo pero sin éxito. A su vez, se utilizó el programa ProtParam del servidor electrónico www.expasy.org para determinar algunos parámetros de las proteínas utilizadas en este trabajo como son: la masa molecular, el punto isoeléctrico, la composición de aminoácidos, la vida media estimada, el coeficiente de extinción y el índice de inestabilidad de las proteínas. Los resultados obtenidos mostraron que las proteínas Tir y CesT tienen índices de inestabilidad de 37.15 y 39.82, respectivamente, mientras que los valores obtenidos para EspF y CesF son mayores, 45.77 y 40.84 respectivamente, los cuales superan el valor máximo para una proteína estable que es de 40 (Gasteiger y col., 2005). En el caso de EspF, esto posiblemente se deba al alto contenido de residuos de prolina y serina, ya que 60 de los 206 aminoácidos que componen a esta proteína corresponden a estos dos residuos. En relación con esto, se ha demostrado que regiones ricas en prolinas (P), ácido glutámico (E), serinas (S) y treoninas (T) pueden servir como señal para la degradación proteolítica. Adicionalmente, cuando estos residuos se encuentran flanqueados por aminoácidos con carga positiva se denominan secuencias PEST, y la baja hidrofobicidad de estas regiones sugiere que están expuestas en la superficie, lo que les permite interactuar con las proteínas de los complejos proteolíticos (Chen y Clarke 2002). A diferencia de EspF, la chaperona CesF no contiene un gran número de prolinas y serinas, sin embargo posee un contenido mayor de aminoácidos no polares como leucina (L) e isoleucina (I) en comparación con otros residuos. Existen reportes que demuestran que proteínas

en las que no se detectaron secuencias PEST se degradaron rápidamente por una vía distinta al mecanismo proteolítico regulado por este motivo (Bies y col., 1999). En proteínas que presentan parches de leucina expuestos en la superficie (por ejemplo: los zipper de leucina de proteínas de unión a DNA), se ha visto que su degradación puede estar regulada por estas regiones (Hillier y col., 1998).

Debido a que las ATPasas son de las proteínas del aparato de secreción que están más conservadas entre los distintos SST3, la identidad de secuencia suele ser alta. Mediante alineamientos de secuencias de aminoácidos de ATPasas de diferentes SST3 se identificaron residuos idénticos y altamente conservados en la región carboxilo terminal de las diferentes proteínas (Andrade y col., 2009 datos no publicados). Como se ha propuesto que esta región es importante para la interacción de las ATPasas con los complejos efector-chaperona del SST3 (Akeda y Galán 2005), se realizó mutagénesis dirigida sobre estos residuos y se evaluó la capacidad de las diferentes versiones mutantes de EscN de complementar la secreción de proteínas en una mutante Δ escN (Andrade y col., 2009 datos no publicados). En el presente trabajo, se utilizaron las mutantes de EscN que fueron incapaces de restaurar la secreción de proteínas a pesar de tener actividad hidrolítica silvestre, se fusionaron a GST y se hicieron ensayos de interacción *in vitro* mediante la técnica de copurificación (pull down) con His-CesT sola o en complejo con Tir. Se observó que todas las mutantes puntuales en el carboxilo terminal de EscN utilizadas en los ensayos de copurificación, mantienen la capacidad de unir a His-CesT en complejo con Tir o His-CesT sola (Fig. 34 y 35, respectivamente). Contrario a lo reportado previamente, la mutante de EscN con un cambio en la valina 393 por prolina (que es equivalente al cambio de leucina 373 por prolina de InvC), sigue siendo capaz de interactuar con His-CesT sola o en complejo con Tir, lo que indica que este residuo *per se* no es el sitio de interacción de la ATPasa con los complejos efector-chaperona. Posiblemente la falta de complementación del fenotipo de secreción en la cepa Δ escN por estas mutantes se deba a que éstas perdieron la capacidad para interactuar con otros componentes del SST3, como por ejemplo con la proteína codificada por el gen

orf15 (EscO) o SepL (proteína que controla el cambio de especificidad en la secreción de sustratos en EPEC). Esta hipótesis se sugiere ya que en trabajos recientes se han demostrado interacciones de ATPasas del SST3 de otros patógenos como CdsN de *Chlamydomphila* con Cpn0706 (homóloga a EscO de EPEC), así como de la ATPasa Spa47 de *Shigella* con MxiC (homóloga a SepL de EPEC), que podrían participar de algún modo en la secreción de proteínas a través del SST3 (Stone y col., 2008, Botteaux y col., 2008).

CONCLUSIONES

- Se co-purificaron a los complejos efector-chaperona Tir-HiscesT y EspF-HisCesF mediante cromatografía de afinidad a níquel.
- Se identificó la interacción tanto de His-CesT sola como en complejo con Tir con la ATPasa GST-EscN silvestre y las mutantes puntuales V393P, E401A y Y402A mediante ensayos de copurificación.
- Las mutantes no funcionales del carboxilo terminal de la ATPasa EscN interactúan con CesT sola o en complejo con el efector Tir. En contraste con lo reportado previamente, nuestros resultados sugieren que la región de la ATPasa EscN que contiene a la valina 393 no es el sitio de unión de los complejos efector-chaperona.

PERSPECTIVAS

- Probar interacciones de EscN con otros efectores y translocadores, otras chaperonas de efectores y translocadores, así como con otros complejos efector-chaperona o translocador-chaperona.
- Hacer pequeñas deleciones o dobles y triples mutantes puntuales en los residuos altamente conservados del C-terminal de EscN para evaluar su interacción con los complejos.
- Realizar interacciones in vivo mediante coimmunoprecipitación o con el sistema de doble híbrido en bacteria o levadura, de la ATPasa con los distintos complejos o chaperonas.

LITERATURA CITADA

- Abe, A., De Grado, M., Pfuetzner, R., Sánchez-San Martín, C. DeVinney, R., Puente, J. L., Strynadka, N. and Finlay, B. 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Molecular Microbiology*. 33(6):1162-1175
- Abe, A., Matsuzawa, T. and Kuwae, A. 2005. Type-III effectors: Sophisticated bacterial virulence factors. *Comptes Rendus Biologies*. 328:413-428
- Akeda, Y. and Galán, J. 2004. Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *Journal of Bacteriology*. 186(8):2402-2412
- Akeda, Y. and Galán, J. 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature Letters*. 437(6):911-915
- Alper, J. 2003. Data gaps need bridging to assess infectious gastrointestinal diseases. *The New Magazine of the American Society for Microbiology*. 69(2):65-68
- Amman, E., Ochs, B. And Abel, K. J. 1988. Tightly regulated *tac* promoter vector useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*. 69:301-315
- Anderson, D. and Schneewind, O. 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Molecular Microbiology*. 31(4):1139–1148
- Bhavsar, A., Guttman, J. and Finlay, B. 2007 Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Insight Review Nature*. 449(18):827-834
- Bies, J., Nazarov, V. and Wolff, L. 1999. Identification of Protein instability determinants in the carboxy-terminal region of c-Myb removed as a result of retroviral integration in murine monocytic leukemias. *Journal of Virology*. 73(3): 2038–2044
- Birtalan, S., Phillips, R. and Ghosh, P. 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Molecular Cell*. 9:971-980
- Bommaris, B., Maxwell, D., Swimm, A., Leung, S., Corbett, A., Bornmann, W. and Kalman, D. 2007. Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir is an SH2/3 ligand that recruits and activates tyrosine kinases required for pedestal formation. *Molecular Microbiology*. 63(6):1748–1768
- Botteaux, A., Sory, M., Biskri, L., Parsot, C. and Allaoui, A. 2008. MxiC is secreted by and controls the substrate specificity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Molecular Microbiology*. 1:1-12
- Chen, H. and Frankel, G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis *FEMS Microbiology Reviews*. 83-98
- Chen, E. and Clarke, D. 2002. The PEST sequence does not contribute to the stability of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *BMC Biochemistry*. 3. This article is available from:<http://www.biomedcentral.com/1471-2091/3/29>
- Claret, L., Calder, S., Higgins, M. and Hughes, C. 2003. Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly. *Molecular Microbiology*. 48(5):1349–1355
- Cornelis, G. 2006. The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology*. 4:811-825

- Crepin, V., Shaw, R., Abe, C., Knutton, S. and Frankel, G. 2005. Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. *Journal of Bacteriology*. 187(8):2881–2889
- Daniell, S., Takahashi, N., Wilson, R., Rosenshine, I., Knutton, S., Frankel, G. and Aizawa, S. 2001. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 3(12):865-871 4
- Dean, P. and Kenny, B. 2008. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Current Opinion in Microbiology*.12:1-9
- Delahay, R. and Frankel, G. 2002. Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Molecular Microbiology*. 45 (4):905-916
- Dubendorff, J. and Studier, F. 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *Journal of Molecular Biology*. 219:45-59
- Ehrbar, K., Winnen, B. y Hardt, W.D. 2006. The chaperone binding domain of SopE inhibits transport via flagellar and SPI-1 TTSS in the absence of InvB. *Molecular Microbiology*. 59(1): 248-264
- Elliott, S., Wainwright, L., McDaniel, T., Jarvis, K., Deng, Y., Lai, L., McNamara, B., Donnenberg, M. and Kaper, J. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Molecular Microbiology*. 28(1):1-4
- Elliott, S., O'Connell, B., Koutsouris, A., Brinkley, C., Donnenberg, M., Hecht, G. and Kaper J. 2002. A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic *Escherichia coli* to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF. *Infection and Immunity*. 70(5):2271-2277
- Frankel, G. and Phillips, A. D. 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cellular Microbiology*. 10(3):549-556
- Garmendia, J., Frankel, G. and Crepin, V. 2005 Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*. 73(5):2573-2585
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server (En) Ed. John M. Walker: The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press: 571-607
- Gauthier, A. and Finlay, B. 2003. Translocated intimin, receptor and its chaperone interact with ATPase of Type III secretion apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 185 (23):6747-6755
- Ghosh, P. 2004. Process of protein transport by type III secretion system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(4):771-795
- Gophna, U. Ron, E. Z. and Graur, D. 2003. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*. 312:151–163
- Hamad, H. M. and Nilles, L. M. 2007. Roles of YopN, LcrG and LcrV in controlling Yops secretion by *Yersinia pestis*. *Advances in experimental medicine and biology*. 603:225-34.
- Hillier, B., Rodriguez, H. and Gregoret, L. 1998. Coupling protein stability and protein function in *Escherichia coli* CspA. *Folding and Design*. 3(2):87-93
- Iguchi, A., Thomson, N. R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I. R., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., Kenny, B., Quail, M. A., Thurston, S., Dougan, G., Hayashi, T., Parkhill, J. and Frankel, G. 2009. Complete

- Imada, K., Minamino, T., Tahara, A. and Namba, K. 2006. Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1-ATPase subunits. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA*. 104(2):485-490
- Journet, L., Hughes, K. and Cornelis, G. 2005 .Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence. *Molecular Membrane Biology*. 22 (1-2): 41-50
- Kanack, K. J., Crawford, A., Tatsuno, I., Karmali, K. A. and Kaper, J. B. 2005. SepZ/EspZ Is secreted and translocated into HeLa cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system. *Infection and Immunity*. 73(7):4327–4337
- Kaper, J., Nataro, J. and Mobley, L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2:123-140
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M. and Finlay, B. 1997a. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*. 167(7):2606-2012
- Kenny, B. DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J. Frey, E. and Finlay B. 1997b. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. *Cell*. 91(4):511-520
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, J., Nisan, I., Neves, B., Bain, C., Wolff, Dougan, C. And Frankel. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *The EMBO Journal*. 17(8):2166–2176
- Lee, H. and Galán, J. 2004. *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Molecular Microbiology*. 51(2): 483–495
- Levine, M. M., Bergquist E. J., Nalin, D. R., Waterman, D. H., Hornick, R. B., Young, C. R. and Sotman, S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet*.1(8074):1119-22
- Lilic, M., Vujanac, M. and Stebbins, C. 2006. A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. *Molecular Cell*. 21:653-664
- Lorenz, C. and Büttner, D. 2009. Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*. 191(5):1414-1428
- Macnab, R. M. 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*.1694:207– 217
- McNamara, B. P, Koutsouris, A., O’Connell, C. B., Nougayréde, J.P, Donnenberg, M. S. Hecht, G. 2001. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *The Journal of Clinical Investigation*.107(5):621-629
- Minamino, T. and Macnab, R. 2000 FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Molecular Microbiology*. 37(6):1494-1503
- Minamino, T. and Namba, K. 2008. Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature Letters*. 451(24):485-489
- Nataro, K. and Kaper, J. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(1):142-201

- Nougayrède, J. and Sonnenberg, M. 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cellular Microbiology*. 6(11):1097-1111
- Ochoa, T., Barletta, F., Contreras, C. and Mercado, E. 2008. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.102:852—856
- Ogino, T., Ohno, R., Sekiya, K., Kuwae, A., Matsuzawa, T., Nonaka, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S. and Abe, A. 2006. Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 188(8):2801–2811
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S., Macnab, R. and Iino, T., 1994. FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 176(8):2272-2281
- Ohnishi, K., Schoenhals, G. J., Kihara, M and Macnab, R. 1997. The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: Putative components for flagellar assembly. 179(19): 6092–6099
- Paniagua, G. L., Monroy, E., García-González, O., Alonso, J., Negrete, E. and Vaca, S. 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 6:17. This article is available from: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/6/1/17>
- Papatheodorou, P., Domanska, G., Öxle, M., Mathieu, J., Selchow, O., Kenny, B. and Rassow, J. 2006. The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology. *Cellular Microbiology*. 8(4):677-689
- Parsot, C., Hamiaux, C. and Page, A. L. 2003. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology*. 7:7-14
- pET System Manual. 2003. 10^a Ed. Novagen, Merck Bioscience. USA.
- Ramamurthi, K., S. and Schneewind, O. 2003. Substrate recognition by the Yersinia type III protein secretion machinery. *Molecular Microbiology*. 50(4):1095–1102
- Roe, A. J., Tysall, L., Dransfield, T., Wang, D., Fraser-Pitt, D., Mahajan, A., Constandinou, C., Inglis, N., Downing, A., Talbot, R., Smith, D. G. E. and Gally, D. L. 2007. Analysis of the expression, regulation and export of NleA–E in *Escherichia coli* O157 :H7. *Microbiology*. 153:1350–1360
- Ryu, J. and Hartin, J. 1990. Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2. *BioTechniques*. 8(1). 43-45
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C and 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 USA*. 98(20):11638-11643
- Schlumberger, M. C., Müller, A. J., Ehrbar, K., Winnen, B., Duss, I., Stecher, B. and Hardt, W. 2005. Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA*. 102(35): 12548–12553
- Smith, D. and Johnson, K. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*. 67:31-40
- Stafford, G. P., Evans, L. D. B., Krumscheid, R., Dhillon, P., Fraser, G. M. and Hughes, C. 2007. Sorting of early and late flagellar subunits after docking at the membrane ATPase of the type III export pathway. *Journal of Molecular Biology*. 374:877–882

- Stone, C., Johnson, D., Bulir, D., Gilchrist, J. and Mahony, J. 2008. Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN. (Cpn0707) of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Bacteriology*. 190(20): 6580-6588
- Tampakaki, A., Fadouloglou, V., Gazi, A., Panopoulos, J. y Kokkinidis, M. 2004. Conserved features of type III secretion. *Journal of Bacteriology*. 6(9):805-816
- Thomas, J., Stafford, G. P. and Hughes, C. 2004. Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA*. 101(11): 3945–3950
- Thomas, N., Deng, W., Puente, J., Frey, E., Yip, C., Strynadka, N. and Finlay, B. 2005. CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 57(6):1762–1779
- Thomas, N., Deng, W., Baker, N., Puente, J. and Finlay, B. 2007. Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 28(40): 29634–29645
- Tomson, F. L., Viswanathan, V. K., Kanack, K. J., Kanteti, R. P., Straub, K. V., Menet, M., Kaper, J. B. Hecht, G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspG disrupt microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier. *Molecular Microbiology*. 56(2): 447–464
- Tu, X., Nisan, R., Yona, C., Hanskiand, E. y Rosenshine, I., 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 47(3):595–606
- Viswanathan, V., Koutsouris, A., Lukic, S., Pilkinton, M., Simonovic, I., Simonovic, M. and Hecht, G. 2004. Comparative analysis of EspF from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in alteration of epithelial barrier function. *Infection and Immunity*. 72(6):3218-3227
- Warawa, J. and Kenny, B. 2001. Phosphoserine modification of the enteropathogenic *Escherichia coli* Tir molecule is required to trigger conformational changes in Tir and efficient pedestal elongation. *Molecular Microbiology*. 42(5): 1269-1280
- Wilson, R. K., Shaw, R. K., Daniell, S., Knutton, S. and Frankel, G. 2001. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 3(11):753-762
- Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Finlay, B., Miller, S. I., and Strynadka, N. C. 2005. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature Letters*. 435(2):702-707
- Yip, C. K. and Strynadka, N. C. 2006. New structural insights into the bacterial type III secretion system. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 31(4):323-230
- Zarivach, R., Vuckovic, M., Deng, W., Finlay, B. B. and Strynadka, N. 2007. Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nature Structural and Molecular Biology*. 14(2):131-137