



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“DETECCIÓN DE SITIOS INMUNODOMINANTES DE LA TOXINA Pet  
UTILIZANDO EL MÉTODO DE PHAGE DISPLAY”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
P R E S E N T A:  
**M. EN C. ULISES HERNÁNDEZ CHIÑAS**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS**

**MÉXICO D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



El presente trabajo se realizo en el **Laboratorio de Investigación Básica del Departamento de Salud Pública-UNAM**, y **Laboratorio 134 del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM**.



## AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** a través de la Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública, Laboratorio de Investigación Básica.

Al **PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS-UNAM**, por permitirme realizar mis estudios de doctorado.

A la **DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA)**, por el apoyo económico que me fue proporcionado del **1 de enero de 2005 al 31 de agosto de 2006**.

Al **COMITÉ TÉCNICO DEL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT)**, al **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)** por los apoyos de los proyectos: IN202709 y No. 82755.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mi Director y Asesor**

**DR. CARLOS A. ESLAVA CAMPOS**, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por apoyarme y siempre darme valiosos consejos. Por ser un gran ser humano, que además de verme como estudiante me permitió verlo como un amigo, y quien dedico su tiempo a lo largo de este trabajo, dándome confianza y sobretodo su amistad y tiempo.

### **A mi Comité Tutorial**

**DR. KARLEN GAZARIAN, DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ y DR. CARLOS A. ESLAVA CAMPOS**, quienes se preocuparon siempre en todos mis tutoriales para que el trabajo de investigación mejorara, con sus comentarios y sabios consejos.

### **Al Jurado**

Presidente: **DR. RUY ENRIQUE PÉREZ MONTFORT**  
Secretario: **DR. CARLOS A. ESLAVA CAMPOS**  
Vocal: **DRA. CLARA INÉS ESPÍTIA PINZÓN**  
Vocal: **DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO**  
Vocal: **DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE**

*"La enseñanza, ¿quién no lo sabe?, es ante todo una obra de infinito amor"*

Agradezco a Todos Aquellos que Contribuyeron en mi Formación Académica, Tanto con sus Enseñanzas como con sus Críticas y Consejos, pero Principalmente por el Tiempo que Dedicaron Así Mismo y la Paciencia que Tuvieron Conmigo.

**Tatiana Gazarian**

Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quien con su ayuda, apoyo y comprensión me alentó a lograr esta realidad.

**Dr. Alejandro Cravioto; Dr. Juan Xicohtencatl, M. en C. Armando Navarro, Dra. Guadalupe Rico, Dr. Ángel Manjares, Dra. Sandra Gavilanes, Dr. Jorge Mateo.**

No es fácil llegar, se necesita ahínco, lucha y deseo, pero sobre todo apoyo como el que he recibido durante este tiempo. Ahora más que nunca se acredita mi cariño, admiración y respeto. Gracias por lo que hemos logrado.

**Paloma Salazar, Alejandra Berrocal, Gabriela Chi, Columba, Domingo Meza, Alejandro Solís, Alejandro Benítez.**

Gracias a su apoyo y consejo he llegado a realizar la más grande de mis metas. La cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir.

# ÍNDICE

	<b>Pag.</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	iii
<b>RESUMEN</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>I.1</b> Sistema de Secreción Tipo V	4
<b>I.2</b> SPATEs	5
<b>I.3</b> Estructura y Análisis de SPATEs	8
<b>I.4</b> Modelo de Secreción de las SPATEs	14
<b>I.5</b> Clasificación de las SPATEs	16
<b>I.5.1</b> SPATEs Clase I	16
<b>I.5.2</b> SPATEs Clase II	20
<b>I.6</b> Importancia Epidemiológica de las SPATEs	23
<b>I.6.1</b> SPATEs en los Diferentes Grupos Filogenéticos de <i>Escherichia col.</i>	23
<b>I.6.2</b> SPATEs en <i>E. coli</i> Comensales y de Origen Clínico.	24
<b>I.6.3</b> SPATEs en EAEC	25
<b>I.7</b> Motivos Funcionales en las SPATEs	26
<b>I.8</b> Phage Display	26
<b>I.8.1</b> Librería de Péptidos al Azar (RPLs)	28
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	32
<b>III. HIPOTESIS</b>	33
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b>	34
<b>V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	34
<b>VI. MÉTODOS</b>	35
<b>VI.1</b> Material Biológico	35
<b>VI.2</b> Purificación de Pet y Pic	35
<b>VI.3</b> SDS-PAGE	37
<b>VI.4</b> Anticuerpos anti-Pet y anti-Pic	37
<b>VI.5</b> Sueros de Niños	38
<b>VI.6</b> Detección de Sueros Positivos anti Pet y anti-Pic	38
<b>VI.7</b> Inmunotransferencia	38
<b>VI.8</b> Purificación de IgG	39
<b>VI.9</b> Selección de Fagos con Péptidos Miméticos	40
<b>VI.10</b> Amplificación de Clonas	42
<b>VI.11</b> Secuenciación de DNAss de las Clonas	43
<b>VI.12</b> Afinidad de los Mimotopos a los Anticuerpos	44
<b>VI.13</b> Anticuerpos Anti Mimotopos	45
<b>VI.14</b> Péptidos Sintéticos	46
<b>VI.15</b> Alineamiento y Ubicación de las Secuencias de Aminoácidos de los Mimotopos Seleccionados	46
<b>VI.16</b> Participación de las Secuencias Identificadas Como Motivos Funcionales	47
<b>VI.16.1</b> Inhibición de la Degradación de Espectrina	47
<b>VI.16.2</b> Inhibición de la Quimiotaxis	48

<b>VII. RESULTADOS</b>	50
<b>VII.1</b> Purificación y Secuencia N-Terminal de Pet y Pic	50
<b>VII.2</b> Selección de Suero de Niños Infectados	51
<b>VII.3</b> Reactividad del Suero de Conejo	52
<b>VII.4</b> IgG de los Sueros de Pacientes y de Conejos	53
<b>VII.5</b> Bioselección de Péptidos Mimotopos	54
<b>VII.6</b> Secuencia de Aminoácidos de los Péptidos Mimotopos	54
<b>VII.7</b> Bioselección de Péptidos Mimotopos con la IgG de Conejo	57
<b>VII. 8</b> Alineamiento de las Secuencias Obtenidas con las Reportadas para Diferentes SPATEs	60
<b>VII.9</b> Anticuerpos anti Mimotopos	62
<b>VII.10</b> Reactividad de los Sueros Anti Mimotopos Contra Péptidos Sintéticos	63
<b>VII.11</b> Participación de los Motivos PDDSS y PGxxN en la Actividad Biológica de Pet	65
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	68
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	81
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	82

## ABREVIATURAS

<b>Å</b>	Angstrom
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ABTS</b>	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfónico)
<b>AE</b>	Adherencia y esfacelamiento
<b>Agg</b>	Agregativo
<b>Aida</b>	Adhesina secretada por ETEC
<b>APEC</b>	<i>Escherichia coli</i> patógeno de aves
<b>App</b>	Proteína de adhesión y penetración, serin proteasa secretada por <i>N. meningitidis</i>
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BCIP</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato de toluidina
<b>Boa</b>	Serin proteasas autotransportada por <i>Salmonella bolgori</i>
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>c/u</b>	Cada uno
<b>C7C</b>	Péptido de siete aminoácidos con dos cisteínas en los extremos
<b>CL</b>	Caldo Luria
<b>DegP</b>	Proteasa periplásmica Do <i>E. coli</i>
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EaaA</b>	Proteína que une IgG secretada por <i>E. coli</i>
<b>EaaC</b>	Proteína que une IgG secretada por <i>E. coli</i>
<b>EAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<b>EatA</b>	Autotransportadora de ETEC
<b>ECOR</b>	Colección de <i>Escherichia coli</i> de referencia
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
<b>ELISA</b>	<i>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>EpeA</b>	Serin proteasa secretada por EHEC
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
<b>Espl</b>	Serin proteasa secretada por STEC
<b>EspP</b>	Serin proteasa extracelular codificada en el plásmido
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica
<b>g</b>	gravedad
<b>gr</b>	gramos
<b>h</b>	horas
<b>HasA</b>	Hemoforo (heme acquisition system)
<b>Hbp</b>	Proteasa de hemoglobina
<b>HeLa</b>	Línea celular de carcinoma de cérvix humano
<b>Hep-2</b>	Línea celular de carcinoma de laringe humano
<b>HK-2</b>	Línea celular del tubo proximal de riñón humano

<b>HT29</b>	Línea celular de adenocarcinoma de colon humano
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-1 tiogalactopiranoside
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>L</b>	Litros
<b>LB</b>	Agar Luria
<b>M</b>	Molar
<b>ME</b>	Membrana Externa
<b>MFP</b>	Proteína de fusión de membrana
<b>MI</b>	Membrana Interna
<b>min</b>	Minutos
<b>mm</b>	Milímetros
<b>MN</b>	Células Mononucleares
<b>NBT</b>	Azul de nitro tetrazolio
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>PBS</b>	Amortiguador salino de fosfatos
<b>PBS-L</b>	Amortiguador salino de fosfatos/Leche
<b>PBS-T</b>	Amortiguador salino de fosfatos/tween
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>Pet</b>	Toxina codificada en el plásmido
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonil fluoride
<b>PssA</b>	Serin proteasa secretada por <i>E. coli</i> productora de la toxina Shiga toxin
<b>r</b>	Ronda de selección
<b>r.p.m.</b>	revoluciones por minuto
<b>Sat</b>	Serin proteasa autotransportada
<b>SAZ</b>	Suero activado con zimosán
<b>Sec</b>	Sistema de secreción localizado en la membrana interna
<b>SepA</b>	Proteína extracelular de <i>Shigella</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>SigA</b>	Serin proteasa secretada por <i>Shigella flexneri</i>
<b>SPATEs</b>	Serin proteasas autotransportadas de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>
<b>SRP</b>	Resonancia de superficie de plasmon
<b>SST6</b>	Sistema de secreción tipo VI
<b>STEC</b>	<i>Escherichia coli</i> productora de la toxina shiga
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TpsA</b>	Familia A del sistema de transporte en pareja
<b>TpsB</b>	Familia B del sistema de transporte en pareja
<b>Tsh</b>	Hemaglutinina sensible a la temperatura
<b>u.f.p.</b>	Unidades formadoras de placa
<b><math>\mu</math>l</b>	microlitros
<b>UPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
<b>VacA</b>	Citotóxina vacuolizante secretada por <i>Helicobacter pylori</i>
<b>Vat</b>	Toxina vacuolizante
<b>VERO</b>	Células de riñón de mono verde africano

**W**

Watts

**w/v**

peso/volumen

## RESUMEN

Las proteasas de serina autotransportadas de la familia *Enterobacteriaceae* (SPATEs por sus siglas en inglés), son proteínas de alto peso molecular ( $\geq 100$  kDa), relacionadas con la patogénesis de las bacterias que las producen. Pet y Pic integrantes de la familia SPATEs, fueron inicialmente identificadas en cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). Pic además, es secretada por cepas de *Escherichia coli* uropatógena y de *Shigella flexneri*. Algunas de las propiedades biológicas identificadas en las SPATEs, están relacionadas con el motivo de serina GDSGS y aunque se conoce que éstas proteasas son inmunogénicas, los sitios inmunodominantes aún no han sido identificados. El propósito de este trabajo consistió en identificar sitios inmunodominantes de Pet y Pic, utilizando el método de Phage display, para evaluar si estos participan en alguna o algunas de las funciones biológicas descritas para estas proteasas. La identificación de los sitios inmunodominantes, se realizó utilizando anticuerpos anti-Pet y anti-Pic (obtenidos de niños infectados con EAEC y de conejos inmunizados con Pet o Pic), y como ligando dos bibliotecas de péptidos, una de 7 (C7C) y otra de 12 aminoácidos fusionados a la proteína PIII de la envoltura del fago filamentoso M13. El procedimiento permitió la selección de tres mimotopos con las secuencias consenso: PQPxK con los anticuerpos de un niño, PGxI/LN y PDDSS con los anticuerpos de conejo anti-Pet y anti-Pic, respectivamente. El análisis bioinformático de estas secuencias mostró que PGxI/LN y PDDSS se localizan en la región aminoterminal de diferentes SPATEs. Con un modelo tridimensional desarrollado para Pet, se identificó que ambas secuencias se localizan en la región globular de la proteína a 11 Å del motivo de serina proteasa. Anticuerpos obtenidos en ratones inmunizados con fagotopos, que expresan péptidos con los motivos antes mencionados, fueron reactivos con Pet, Pic y con péptidos sintéticos TYPGYINHSKA y LLPQPPKLLLP, diseñados con las secuencias de los mimotopos seleccionados. La participación de estos dos motivos en algunas propiedades biológicas de Pet, se analizó por ensayos de neutralización con anticuerpos obtenidos contra cada uno de los mimotopos (PGxI/LN y PDDSS).

La actividad degradante de fodrina/espectrina descrita en Pet fue inhibida solo parcialmente, sin embargo, el efecto quimioattractante sobre células mononucleares humanas inducido para Pet se neutralizó en un 80%. Los resultados obtenidos, demuestran que el método de Phage display fue un procedimiento adecuado para la identificación de motivos inmunodominantes de Pet, Pic y otras SPATEs. Además, se demostró que estos son motivos funcionales relacionados con la actividad quimioattractante de Pet.

## ABSTRACT

The serine protease autotransporter of the *Enterobacteriaceae* (SPATEs), are high molecular weight ( $\geq 100$  kDa) proteins secreted by different bacteria of the family related with the bacteria pathogenesis. Pet and Pic are two SPATEs initially identified in *Escherichia coli* enteroaggregative (EAEC) strains, Pic also have been identified in uropathogenic *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* strains. Some of the different biological properties identified in the SPATEs, are related with the GDSGS serine motif. Although, these proteases are highly immunogenic, the immunodominant sites have not been identified yet. The purpose of this study was to identify immunodominant sites of Pet and Pic by the Phage display procedure and assess whether these, participate in one or more of the biological functions described for these proteases. For the immunodominant sites detected, we used Pet and Pic antibodies (obtained from children naturally infected with EAEC and antibodies from a rabbit immunized with Pet or Pic toxins) and peptide libraries of 7 (C7C) and 12 amino acids fused to the protein PIII of M13 filamentous phage as ligands. The procedure allowed the selection of the consensus sequences: PQPxK with the antibodies from one child and PGxI/LN and PDDSS with rabbit anti-Pet and anti-Pic antibodies respectively. The PGxI/LN and PDDSS sequences are located in the aminoterminal of a large number of different SPATEs. Using a three-dimensional model developed for Pet, we localized both amino acid sequences in the globular region of the protein to 11 Å of the serine protease motif. Antibodies induced in mice by mimotopes carrying the three aforementioned motifs were reactive with Pet, Pic and with synthetic peptides carrying the immunogenic mimotope sequences TYPGYINHSKA and LLPQPPKLLLLP, thus confirming that the peptide moiety of the selected phages induced the antibodies specific for the toxins. The participation of these two motifs in biological properties of Pet was analyzed by antibody neutralization assays. The fodrin/spectrin disruption described by Pet was inhibited partially, however, the chemoattractant activity of human mononuclear cells induced by the same Pet protein was 80% neutralized. The results showed that Phage display method was a suitable

procedure to the identification of immunodominant motifs in Pet, Pic and in other SPATEs. Also, we showed that they are functional motifs related with the chemoattractant activity of Pet.

Nota aclaratoria:

En este trabajo se decidió utilizar la nomenclatura de una sola letra para nombrar una secuencia de aminoácidos y solo cuando uno de ellos se encuentre en el texto se escribirá con el nombre completo del aminoácido.

## I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias patógenas han desarrollado diferentes estrategias para diseminarse, multiplicarse y sobrevivir dentro del hospedero. Muchos de estos mecanismos están relacionados con proteínas asociadas a la adherencia (factores de colonización), endotoxinas (lipopolisacárido), exotoxinas (citotoxinas, enterotoxinas) e invasinas, entre otros.

Con respecto a los productos con actividad tóxica, en general, son proteínas que pueden quedar atrapadas en el espacio periplásmico y liberarse cuando la bacteria muere o son secretadas a través de la membrana externa. Para facilitar este transporte del citoplasma al medio extracelular, las bacterias Gramnegativas han desarrollado diferentes sistemas de secreción numerados de acuerdo a como han sido descritos; en la actualidad se conocen los tipos I, II, III, IV, V, y VI (Economou y cols. 2006). Las diferencias en estos sistemas se han establecido de acuerdo a la complejidad de la maquinaria que utiliza la bacteria para liberarlas.

En las bacterias Gramnegativas, como *Escherichia coli* (*E. coli*), existen sistemas que transportan las toxinas a través de las dos membranas (citoplásmica y membrana externa o pared celular) en un solo evento, o por vías que utilizan más de uno, en este último caso, se requiere de mayor energía por lo que las bacterias que utilizan este sistema necesitan obtenerla de diferentes fuentes, debido a que el espacio entre las dos membranas (el periplasma) carece de ATP (Dautin y cols. 2007b).

El sistema llamado de secreción tipo I fue descrito por Letoffé y cols. (1994), a pesar de la simplicidad del sistema en bacterias Gramnegativas es capaz de transportar tanto pequeñas proteínas (19 kDa) como el hemoforo HasA (Létoffé y cols. 1994), hasta proteínas de superficie con peso molecular por

arriba de los 800 kDa (adhesinas). En este sistema el translocador está compuesto por tres proteínas: el transportador-ABC, que es un complejo de unión a ATP (Binet y cols. 1997), una proteína de fusión de membrana (MFP) y una proteína de membrana externa formadora de poros en la bacteria. Este sistema se ha encontrado en *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pasteurella haemolytica* y *Bordetella pertussis* (Henderson y cols. 2004).

El sistema de secreción tipo II utiliza un transporte en dos eventos; en el primero las proteínas blanco expresan un péptido señal que es reconocido por el sistema de secreción Sec, compuesto de una ATPasa (SecA), algunas proteínas de membrana interna (SecD, SecE, SecF, SecG y SecY) y una peptidasa señal (SecB). SecA, provee la energía para el transporte a través del translocon y la peptidasa señal (SecB), remueve el péptido señal de la proteína, liberándolo dentro de la región periplásmica.

Existen evidencias de que en este sitio las proteínas adoptan un estado casi nativo, facilitado por algunas chaperonas. El segundo evento que contempla el transporte a través de la membrana externa, requiere de 12 a 15 proteínas accesorias que en su conjunto se denominan componente secretor (Sandkvist y cols. 2001a y 2001b). Esta vía de secreción fue identificada por primera vez en *Klebsiella oxytoca*, la bacteria utiliza el sistema para la secreción de una lipoproteína que hidroliza el almidón (d'Enfert y cols. 1987). Además de *Klebsiella oxytoca*, esta vía ha sido observada en bacterias como *Vibrio cholerae*, *E. coli enterotóxica*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia enterocolítica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia pseudomallei*, *E. chrysanthemi* y *Xanthomonas campestris*.

En bacterias Gramnegativas existen sistemas para la secreción de proteínas efectoras (moléculas que requieren una maquinaria de múltiples proteínas especializadas para su translocación a la célula blanco), que modulan las funciones de las células blanco en lugar de perturbar irreversiblemente la

homeostasis celular (Galán y cols. 2009). Estos sistemas de secreción son los tipos III, IV y VI, los cuales han evolucionado como un complejo de proteínas que de manera coordinada modulan la interacción con la célula blanco.

El sistema de secreción tipo III o inyector, es de los más estudiados y ha sido identificado en bacterias patógenas de plantas y mamíferos en los que se incluye *Salmonella entérica*, *Shigella flexneri*, *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Citrobacter rodentium*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* y *Chlamydia trachomatis* (Pallen y cols. 2005; Troisfontaines y Cornelius. 2005).

El sistema de secreción Tipo IV se ha relacionado ancestralmente con el evento de conjugación en bacterias, este sistema de transporte es diverso debido a la capacidad que tiene para transportar proteínas o DNA-proteína entre bacterias de la misma, o de diferentes especies, e incluso la transferencia a integrantes de otros reinos como los hongos, plantas o células de mamíferos. Entre los prototipos de este sistema de secreción están la transferencia de T-DNA por *Agrobacterium tumefaciens* y el sistema de secreción de la toxina pertusis de *B. pertussis*.

Históricamente, el sistema de secreción tipo VI (SST6) fue originalmente descrito como una maquinaria relacionada con el sistema de secreción tipo IV. Muchos de los SST6 fueron identificados por un proceso de selección por pérdida de virulencia hacia la célula del hospedero, por sobrevivencia en un modelo de infección o por la identificación de proteínas secretadas dentro del sobrenadante del cultivo (Barker y cols. 2006, Bingle y cols. 2008). Entre las bacterias que utilizan este sistema de secreción se incluyen: *Burkholderia mallei*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*

enteroagregativa, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Salmonella entérica* y *Vibrio cholerae* (Filloux y cols. 2008).

### **I.1 Sistema de Secreción Tipo V**

Es de nuestro interés profundizar un poco más en el sistema de secreción tipo V ya que las proteínas en estudio (SPATEs), la utilizan para su secreción. Su descripción original se relaciona con la IgA1 proteasa (IgA1) producida por *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner y cols. 1987). Es uno de los sistemas de secreción más simples y a partir de su descripción, se han reportado como un procedimiento frecuente en la liberación al medio externo de muchas proteínas de diferentes grupos de bacterias (Henderson y cols. 2001; Dautin y cols. 2007a). Por las características del sistema se ha definido como de autotransporte y las proteínas secretadas se conocen como autotransportadas. Estas en general son proteínas de gran tamaño y están compuestas de una secuencia señal (N-terminal), un dominio pasajero que excede los 100 kDa, y un dominio  $\beta$  o C-terminal (translocador) con un peso aproximado de ~30 kDa.

El primer paso para la secreción de la proteína, el péptido señal se une al complejo Sec, y así iniciar su translocación al espacio periplásmico a través de la membrana interna (MI); subsecuentemente, el dominio  $\beta$  se integra a la membrana externa formando un poro ( $\beta$ -barril) y es a través de este que el dominio pasajero atraviesa el poro y puede ser liberado al espacio extracelular o quedar anclado a la membrana externa de la bacteria, donde actúa como una adhesina, enzima degradativa, citotóxina o como mediador de otros factores de virulencia de la bacteria (Henderson y cols. 1998; Thanassi y Hultgren; 2000; Desvaux y cols. 2005; Dautin y cols. 2007b).

Por sus características el sistema de secreción tipo V, se ha conformado en dos subgrupos (Henderson y cols. 2001). En el primero llamado de autotransportadas, la información requerida para su transporte se encuentra en un solo polipéptido (péptido señal, dominio pasajero y translocador), un ejemplo de este son las serin proteasas autotransportadas de la familia enterobactereacea (SPATEs). En el otro subgrupo, el dominio pasajero y el dominio  $\beta$ -barril son translocados como dos proteínas separadas (transporte en pareja), tal es el caso de los miembros de la familia TpsA y TpsB (Jacob-Dubuisson y cols. 2001).

Hasta el momento no ha sido posible definir si la existencia de ambos subgrupos se debe a un proceso de evolución divergente o convergente. (Henderson y cols. 2004). Al respecto, al realizar una comparación entre las secuencias de aminoácidos, se identificó que existe similitud en un alto porcentaje entre diferentes proteínas autotransportadas, así como, con las transportadas en pareja, por tal hecho se ha propuesto una clasificación definiendo a las proteínas autotransportadas como Va y las de sistema de secreción en pareja como Vb (Desvaux y cols. 2004a). Recientemente, se propuso que la adhesina YadA secretada por *Yersinia* pudiera ser el prototipo de una nueva clase de adhesina bacteriana agrupada en la familia adhesinas oligoméricas súper enrolladas; que a su vez se clasifico en un subgrupo llamado de la vía Vc (Henderson y cols. 2004).

## I.2 SPATEs

Las SPATEs son proteínas que utilizan el sistema de secreción Va, entre las bacterias que las secretan se encuentran: *Salmonella bongori*, *Shigella flexneri*, *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* productora de toxina tipo shiga (STEC), *E. coli* de serogrupos asociados a infecciones extraintestinales,

principalmente aisladas de infecciones de vía urinarias (UPEC), y por *E. coli* patógena de aves (APEC). Hasta el momento se han reportado 20 diferentes SPATEs (Tabla 1), con diversas propiedades y actividades biológicas, funciones que dependen de la secuencia y estructura del dominio pasajero (Yen y cols. 2008).

**Tabla 1. Proteasa de Serina Autotransportadoras de Enterobacteras**

SPATE	BACTERIA	ENFERMEDAD	FUNCIÓN	REFERENCIA
<b>CLASE I</b>				
Pet	EAEC	Diarrea	Enterotoxina, citotoxina	Eslava, 1998; Villaseca 2000
EspC	EPEC	Diarrea	Enterotoxina	Mellies, 2001, Navarro-García, 2004
SigA	<i>Shigella flexneri</i>	Shigellosis	Citotoxina	Henderson, 2004
Sat	EAEC, UPEC	Diarrea, Infecciones de vías urinarias	Citotoxina vacuolizante sobre células de vejiga y riñón	Guyer, 2002
EspP	EHEC	Diarrea con sangre, colitis hemorrágica	Citoxina	Brunder, 1997
Vat	APEC, UPEC	Colibacilosis, septicemia	Citotoxina vacuolizante	Parham, 2005
<b>CLASE II</b>				
Pic	EAEC, UPEC, <i>Shigella flexneri</i>	Diarrea, Infecciones de vías urinarias	Hemaglutinina, degrada complemento y muco, se une al grupo hem	Henderson, 1999; Parham, 2004
SepA	<i>Shigella flexneri</i>	Shigellosis	Inflamación intestinal	Benjelloun-Touimi, 1995 Provence, 1994; Kostakioti, 2004
Tsh-APEC	APEC	Colibacilosis, septicemia	Hemaglutinina, adhesina para CR, Hb y MEC	Parham, 2005
Tsh-UPEC	UPEC	Infecciones de vías urinarias	Desconocido	Parham, 2005
Hbp	<i>E. coli</i> , extraintestinal	Infecciones de heridas y septicemia	Proteína secuestradora del grupo Hem	Otto, 1998
EaaA/EaaC	<i>Escherichia coli</i>	Desconocido	Desconocido	Sandt, 2000
BoA	<i>Salmonella bongori</i>	Diarrea	Desconocido	NCBI AAW66606
EpeA	EHEC	Diarrea con sangre y colitis hemorrágica	Desconocido	Leyton, 2003
Espl	STEC	Diarrea, Falla renal	Desconocido	Schimdt, 2001
Eata	ETEC	Diarrea	Efecto citopático sobre células intestinales	Patel, 2004
Aida	ETEC	Diarrea	Desconocido	NCBI ZP_00714135

**SPATEs y su Ubicación como Miembros del Clan de las Proteasas Semejantes a la Quimotripsina.** La estructura terciaria del dominio I de las SPATEs tiene similitud con la tripsina, lo anterior originó que estas proteasas se incluyeran dentro de la familia de IgA proteasa (S6). En ésta se encuentran enzimas como la IgA1 proteasa de *N. gonorrhoeae*, Hap de *H. influenzae* integrantes del

clan de Quimotripsina PA(S) (<http://merops.sanger.ac.uk>), ampliamente distribuidas en eucariotes, procariontes, arqueas y virus. Las quimotripsinas participan en diferentes procesos fisiológicos como es el caso de la digestión, homeostasis, apoptosis, traducción de señales, reproducción y respuesta inmune (Hedstrom y cols. 2002).

El motivo GDSGS (serin proteasa) de estas enzimas, se localiza en el plegamiento formado por dos  $\beta$ -barriles, en esta región se encuentran el núcleo catalítico formado por Histidina, Asparagina y Serina; el cual interacciona con el sustrato en la posición P1\*. La especificidad de las proteasas de serina esta dada por la interacción P1-S1, sin embargo, esta también participa un grupo de aminoácidos adyacentes al residuo catalítico (GDSGS), como es el caso de Glicina y la combinación Glicina y Asparagina, aminoácidos que crean una carga negativa en el sitio S1 que le confiere la especificidad a la enzima para sustratos que contengan Arginina o Lisina en la posición P1 (Hendstrom y cols. 2002).

\*Para describir la especificidad de las peptidasas, se utiliza un modelo en el cual el sitio catalítico esta flanqueado por ambos lados por subsitios específicos, los cuales se acomodan sobre un residuo aminoácido. Los sitios para la enzima son numerados, con la nomenclatura S1....Sn a la región N-terminal y S1'.....Sn' a la región C-terminal. Los residuos del sustrato son numerados P1....Pn, y P1'....Pn', respectivamente.

:

Sustrato: -P3-P2-P1† P1'-P2'-P3'-

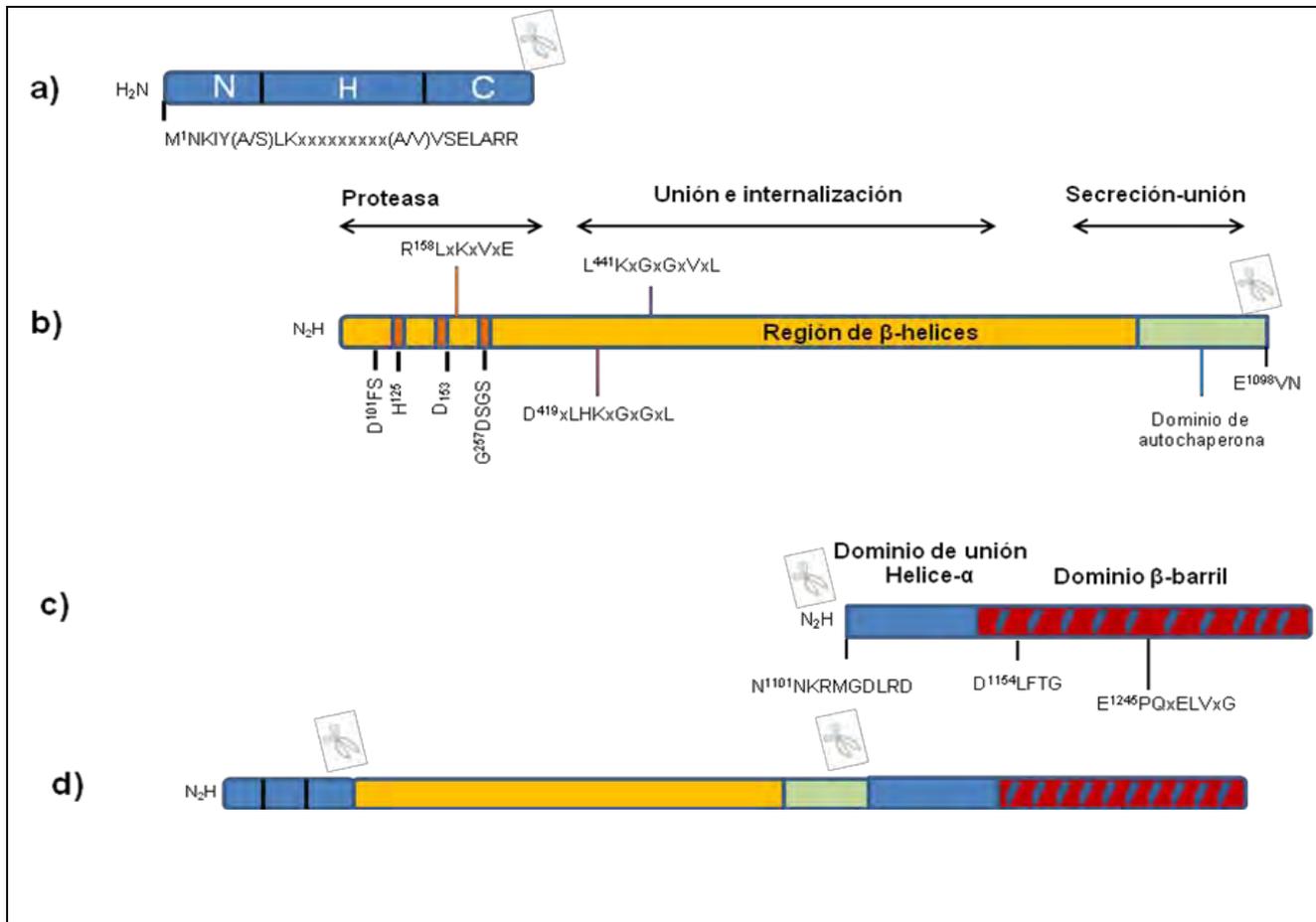
Enzima: -S3-S2-S1 \* S1'-S2'-S3'-

La tecnología ha facilitado la síntesis de oligopéptidos, los cuales se han utilizado como sustrato de estas enzimas, mediante estos se han podido determinar aminoácidos esenciales en las posiciones P1-P1'. (Barrett y cols. 1994). Dutta y cols. (2002) utilizaron péptidos sintéticos para la búsqueda de sustratos de SPATEs, con estos identificaron actividades semejantes a la de las quimotripsinas de mamíferos, la elastasa y la tripsina. Estos hallazgos han permitido demostrar que los miembros de la familia de proteasas de serina IgA son parte del clan de la quimiotripsina, ya que presentan actividades semejantes a algunas proteasas de serina de mamíferos. Lo anterior ha despertado el interés hacia el

estudio de estas enzimas multifuncionales, ya que podrían ser antecesoros de las quimotripsinas de mamíferos.

### **I.3 Estructura y Análisis de SPATEs**

Las SPATEs (Fig. 1), son proteínas sintetizadas como un solo polipéptido que contiene toda la información requerida para su exportación y secreción: péptido señal, dominio pasajero y translocon (Henderson y cols. 1998).



**Figura 1. Motivos Conservados en los Tres Dominios de las SPATEs.** La caja azul (a), representa el péptido señal. La caja amarilla (b), el dominio pasajero y el translocador por la caja roja (c). d) representa un esquema general de las SPATEs. El péptido señal está dividido en los dominios N, H y C de acuerdo a su ubicación en la región amino (N) o carboxilo (C), así como por la composición de aminoácidos hidrofóbicos (H). En el dominio pasajero, se encuentra la triada catalítica (representada por barras naranjas) y un dominio de autochaperona (caja verde). Dentro del dominio pasajero (b) se encuentran regiones asociadas a funciones biológicas (marcadas con una flecha de dos cabezas) como catalítico, internalización y en la biogénesis del autotransporte (la región de secreción y unión). El translocador (c) contiene en la región N-terminal una hélice alfa (caja azul) que se une al dominio β formado por 12 hélices β. Considerando la estructura primaria de Pet, los residuos fueron numerados iniciando con la primer metionina de la secuencia señal. La letra x muestra la posición de residuos poco conservados. Los sitios de corte están representados por una tijera.

**Péptido Señal.** En la región amino terminal de las SPATEs se encuentra el péptido señal (también llamado secuencia señal o secuencia líder), compuesta por los dominios: (i) n-dominio, compuesto de aminoácidos con carga positiva, (ii) h-dominio o región hidrofóbica y (iii) el c-dominio que es un péptido de reconocimiento también llamado señal. Esta región es importante para la translocación de la proteína al espacio periplásmico, actividad relacionada con peptidasas líder (Fekkes y Driessen, 1999; Desvaux y cols. 2006).

Para analizar el papel que desempeña la secuencia señal en la biogénesis de las SPATEs, se utilizó como modelo EspP, serin proteasa secretada por *Escherichia coli* O157:H7 (Szabady y cols. 2005). Para esto, se construyeron mutantes en los tres dominios del péptido y se analizó su participación en el transporte de la proteína a través de las membranas interna y externa de la bacteria. Los resultados mostraron que mientras el n-dominio no es importante para que la proteína se transloque al espacio periplásmico, el c-dominio es requerido para el reconocimiento de la proteína. Al realizar modificaciones en el péptido señal de EspP, se observó que se induce el plegamiento de la proteína en la región periplásmica lo que impide el transporte del dominio pasajero, lo anterior confirma la importancia del péptido señal no solo como un blanco de reconocimiento, también como parte importante de la vía de transporte del dominio pasajero, ya que evita su plegamiento en el periplasma (Szabady y cols. 2004; Desvaux y cols. 2007).

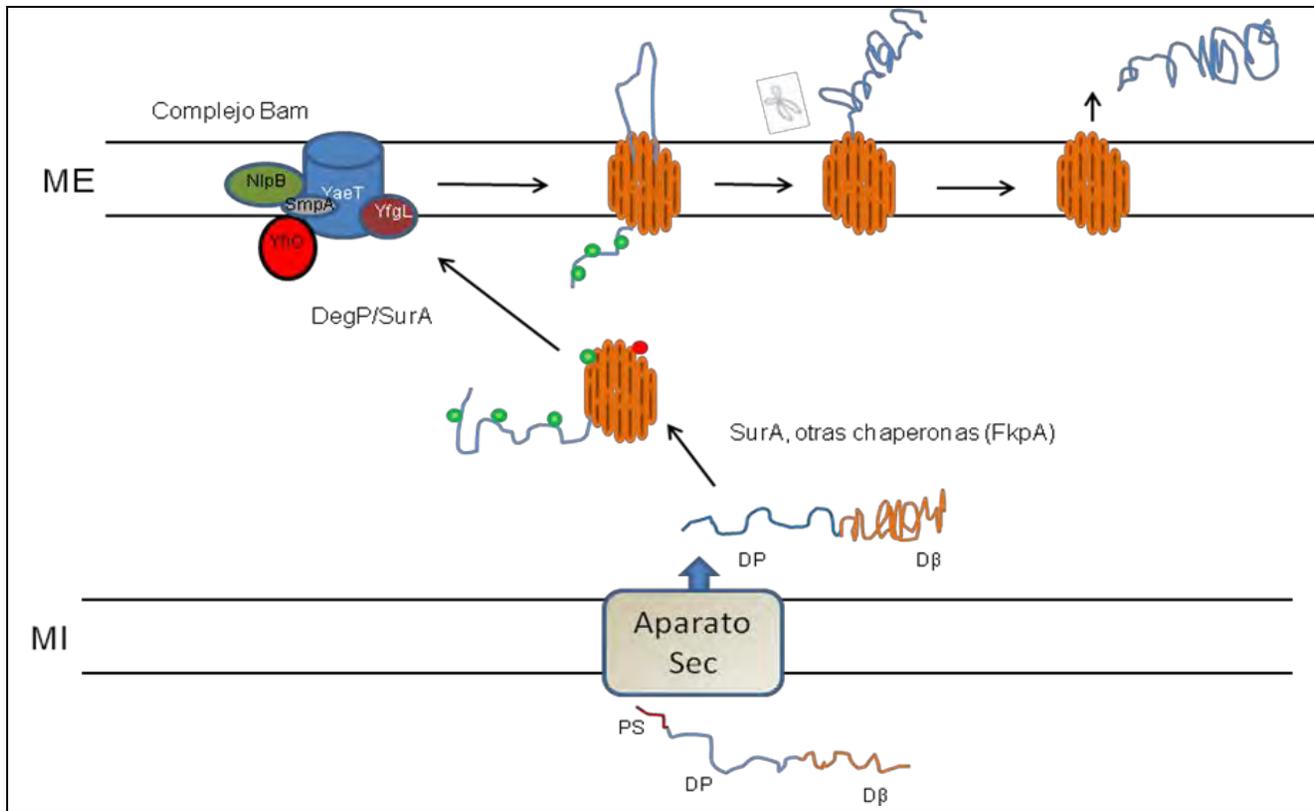
**Translocador.** Se ha confirmado tanto en EspP como en Tsh (SPATE secretada por APEC), la participación del dominio  $\beta$ -barril como unidad de translocación de las SPATEs, (Kostakioti y Stathopoulos, 2006; Velarde y Nataro 2004). Este dominio está dividido en dos regiones: (i) la región de unión con una estructura secundaria de una hélice- $\alpha$  y (ii) un dominio  $\beta$  que forma una estructura de  $\beta$ -barril cuando se ubica en la membrana externa, esta unidad de translocación es determinante para el paso del dominio pasajero a través de la membrana externa.

Debido a su importancia, muchos investigadores han enfocado sus estudios hacia esta estructura, la cual presenta más del 60% de los aminoácidos conservados dentro de las SPATEs. Yen y cols. (2008) plantean la hipótesis de que estos residuos conservados tienen un papel importante en la estabilidad del  $\beta$ -barril, principalmente, a través de interacciones de residuos alifáticos o que estos residuos participan en la secreción del dominio pasajero.

La estructura del translocador de EspP (Barnard y cols. 2007), muestra 12 hebras  $\beta$ , con 174 aminoácidos conservados de los cuales la mitad (84) son polares y los otros no polares (90). Estudios bioquímicos de los translocadores de las serin proteasas Tsh y EspP, indican que existen como una unidad monomérica *in vitro* (Kostakioti y Stathopoulos. 2006; Hritonenko y cols. 2006, Skillman y cols. 2005).

Kostakioti y Stathopoulos (2006), identificaron una secuencia conservada EVNNLNKRMGDLRD, ubicada entre la región carboxilo-terminal del dominio pasajero y la región amino-terminal del translocador (Fig. 1). Este motivo es el más grande y el más conservado dentro de estos polipéptidos; mutaciones en ciertos residuos de este motivo revelaron la importancia que tienen en la secreción del dominio pasajero, aunque no, en el anclaje del translocador. Este sistema de secreción es mucho más complejo de lo que parece, ya que estudios recientes muestran que realmente no son proteínas con la información necesaria para su autotransporte.

Leva y Bernstein (2009), reportan la interacción del translocador de EspP con el complejo Bam (también conocido como complejo YaeT u Omp85), compuesto por una proteína hetero-oligomérica de membrana externa (BamA) y algunas lipoproteínas (BamB-E), complejo que cataliza el ensamble de proteínas de membrana externa de la bacteria. Además, describen que la parte amino terminal de EspP interacciona con las chaperonas SurA y Skp componentes del espacio periplásmico (Fig. 2).



**Figura 2. Sistema de Secreción Tipo V.** Las proteínas autotransportadas (AT) son translocadas primeramente al espacio periplásmico iniciando con el reconocimiento del péptido señal (PS) por el aparato de secreción Sec. Una vez en el periplasma, las AT son estabilizadas por chaperonas periplásmicas como SurA (círculos verdes) y/o DegP (círculos rojos), y quizás por FkpA. Las chaperonas pueden unirse al dominio pasajero (DP) para prevenir la agregación, el plegamiento prematuro y/o mantener a la proteína parcialmente plegada para su translocación. Algunos resultados sugieren que el β-barril o translocador (Dβ) es insertado en la membrana externa (ME) de la bacteria vía el complejo Bam. Finalmente el dominio pasajero pasa a través del translocon para su liberación

Resultados similares fueron reportados por Ruiz-Pérez y cols. (2009), quienes analizaron EspP con chaperonas de región periplásmica de la bacteria utilizando resonancia de superficie de plasmon (por sus siglas en inglés SPR). Ellos encontraron una interacción directa proteína-proteína con las chaperonas SurA y DegP, tanto para la unidad de translocación, como para el dominio pasajero. Estos datos sugieren que las SPATEs requieren de moléculas accesorias (Fig. 2).

**Dominio Pasajero.** Este dominio corresponde a moléculas efectoras extracelulares de la proteína autotransportada, la secuencia de aminoácidos así como su función pueden variar dependiendo de la

proteasa. Entre las actividades identificadas en el dominio pasajero se han descrito: (i) capacidad enzimática, (ii) locomoción de la bacteria mediante la actina, (iii) de adhesina, (iv) como toxina o citotóxina, (v) proteína inmunomoduladora, (vi) o como factor que permite la maduración de otras proteínas de virulencia (Desvaux y cols. 2004b).

A pesar de las diferentes funciones, el dominio pasajero de las SPATEs, presenta una estructura conservada rica en hélices- $\beta$  y un dominio globular semejante a una tripsina (Yen y cols. 2008). Otto y cols. (2005), definieron por cristalografía la estructura de la SPATE Hbp (proteasa de hemoglobina), proteasa secretada por una cepa no diarreogénica (extra intestinal) de *E. coli*. En su estudio dichos autores observaron la presencia de un dominio conformado por hélices  $\beta$  de 24 vueltas similar al identificado en Pertactina de *Bordetella pertussis* y la toxina vacuolizante VacA de *Helicobacter pylori* proteasas autotransportadas que no pertenecen a la subfamilia SPATEs. En Hbp se identificaron además los dominios globulares I y II, el primero situado en la región amino-terminal de la proteína madura (residuos 1-256), que se asocia con la actividad proteolítica de la enzima y el segundo ubicado en los residuos 481-556, este, aunque presenta una región de unión a quitina, su participación en la adherencia de la bacteria no se ha confirmado.

Yen y cols. (2008), después de realizar un análisis bioinformático del dominio pasajero de diferentes SPATEs, observaron que de un total de ~1200 residuos, 173 eran conservados y posiblemente contribuyan a la estabilidad estructural y la capacidad funcional de las proteasas. La mayor parte de estos aminoácidos conservados (122 de los 173 aminoácidos), se encuentran en la hélice- $\beta$ , siendo estos principalmente de tipo hidrofóbico, lo que indica que interacciones no polares participan en la estabilidad estructural de la hélice- $\beta$ . En el dominio globular, se encuentran motivos como el de serin proteasa G<sup>257</sup>DSGS (Fink y cols. 2001), y otros reportados por Yen y cols. (2008) DFS y

DxLHKxGxGxL, LKxGxGxVxL y RLxKxVxE (Fig. 1) que por su cercanía ( $\sim 11 \text{ \AA}$ ) al sitio catalítico, se han relacionado con su posible participación en la actividad catalítica de las SPATEs (Yen y cols. 2008).

En conjunto con los dominios I y II, la proteína madura posee un dominio de autochaperona formado por los residuos 950-1048 (Otto y cols. 2005) (Fig. 1). Oliver y cols. (2003), reportaron previamente en una proteína autotransportada (no-SPATEs) de *Bordetella pertussis* (BrKA), que este dominio influye en el plegamiento y la eficiencia de secreción del dominio pasajero a través de la membrana externa de la bacteria.

Dutta y cols. (2003) a fin de identificar dominios funcionales relacionados con la estructura del dominio pasajero de Pet (SPATE secretada por *Escherichia coli* enteroagregativa), utilizaron mutagénesis por transposones (scanning linker mutagénesis). Después de realizar 92 mutaciones distribuidas en el dominio pasajero observaron la presencia de tres dominios principales, el primero es el dominio catalítico localizado en la región N-terminal, el segundo se identificó en la parte central y participa en la unión e internalización a células epiteliales, el último se encontró en la región C-terminal y esta relacionado con la secreción de la proteasa (Fig. 1).

#### **I.4 Modelo de Secreción de las SPATEs**

Como ya fue referido, el primer paso en el proceso de autotransportación de las SPATEs es el reconocimiento y orientación al espacio periplásmico, en este proceso participan la secuencia señal (formada por aproximadamente 20 a 30 aminoácidos) y el sistema de secreción Sec (Fig. 2), (Henderson y cols. 1998, Mallik y cols. 2002).

Una vez en el espacio periplásmico estas proteasas requieren protegerse de otras proteasas existentes en este espacio y así mantener un estado óptimo para su translocación. Al respecto Ruiz- Pérez y cols. (2009), señalan que en la biogénesis de las autotransportadoras participan las chaperonas SurA y DegP o quizás FkpA que uniéndose al dominio pasajero o al translocador previenen la agregación y el plegamiento prematuro de la proteasa y así dirigen al autotransportador a interactuar con el complejo Bam (Fig. 2).

Se han descrito varias opciones para que se lleve a cabo la secreción de las SPATEs a través del translocón. Dautin y Bernstein (2007b), señalan que el dominio pasajero es plegado dentro del periplásmo en una conformación de postranslocación, en este modelo se menciona la posible participación de la proteína de membrana externa Omp85 o complejo Bam, el cual es esencial para que se promueva la integración y ensamble de proteínas de ME (Voulhoux y cols. 2003).

El corte del dominio pasajero de la unidad de translocación, puede ocurrir sobre la superficie de la bacteria ya sea en la región de unión al translocador o dentro de la región  $\alpha$ -hélice predicha (Oliver y cols. 2003). En los casos donde el dominio pasajero se libera, existe controversia si el corte es resultado de proteasas unidas a membrana o un evento autoproteolítico. En algunos casos como el de App y EspP de *Neisseria meningitidis* y *E. coli* enterohemorrágica, respectivamente; se ha mostrado que es un evento autoproteolítico (Serruto y cols. 2003, Leva y Bernstein, 2009). Sin embargo, lo anterior no es constante en todos los casos, ya que en ocasiones las SPATEs se siguen liberando al espacio extracelular a pesar de haber mutado el sitio activo de la enzima (Eslava y cols. 1998).

## I.5 Clasificación de las SPATEs

En la actualidad las SPATEs se clasifican en dos clases, lo anterior se debe, por un lado, a la identidad (58%) en la secuencia de aminoácidos del dominio pasajero y por el otro las funciones biológicas que cada proteasa presenta. Con base en lo anterior Dutta y cols. (2002) con algunas modificaciones propuestas por Yen y cols. (2008), es que Pet, EspC, SigA, Sat y EspP que son proteasas con actividad citotóxica se incluyen en las de clase I y Pic, SepA, Tsh, EaaA/EaaC, Boa, Vat, EpeA, EspI, EatA y Aida sin propiedades tóxicas integran al grupo de clase II (Tabla 1).

### I.5.1 SPATEs Clase I

**Pet.** En una cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), responsable de un brote de diarrea en un hospital pediátrico de la ciudad de México; Eslava y cols. (1993), identificaron que la bacteria secretaba una proteína de alto peso molecular (104 kDa), que fue reconocida por el suero de los niños infectados. El nombre de Pet (por sus siglas en inglés Plasmid encoded toxin), le fue asignado debido a que los genes que la codifican se localizan en el plásmido Agg (pAgg), que se ha relacionado con la virulencia de este grupo de bacterias (Eslava y cols. 1998).

El análisis histológico de la necropsia del intestino del niño del cual se aisló la cepa de EAEC productora de Pet, mostró la presencia de daño semejante a enterocolitis con la presencia de infiltrado inflamatorio de linfocitos y células plasmáticas y necrosis del epitelio glandular. Un estudio en el modelo de asas ligadas de rata desafiado un grupo de estas con la cepa de EAEC productora de Pet y otro con fracciones purificadas de la toxina, muestras de intestino de ambos grupos, mostró la presencia de reacción inflamatoria intensa con hemorragia, necrosis y ulceración del epitelio. En el grupo

desafiado con la toxina, además se observó incremento en la liberación de moco, exfoliación de células y la presencia de ranuras intercriptales (Eslava y cols. 1993; Navarro-García y cols. 1998; Sainz y cols. 2002).

Posteriormente en un ensayo *in vitro* en cámaras de Ussing, en el que se emplearon preparaciones de intestino de rata, se identificó que Pet también induce efecto de tipo enterotóxico. Lo anterior se concluyó al analizar los cambios electrofisiológicos del tejido, en estos se observó la presencia de un incremento de la corriente de corto circuito y decremento de la corriente eléctrica, efecto que indica alteración de la permeabilidad de la mucosa. Al analizar por microscopia de luz las preparaciones utilizadas en este último ensayo, se observaron alteraciones del tejido similares a las descritas en los ensayos de asa ligada de rata (Navarro-García y cols. 1998).

Al evaluar la actividad de Pet sobre células HEp-2 y HT29 en cultivo, se observó alteración de la morfología de las células con desprendimiento de la monocapa (efecto citopático), efectos que fueron dosis y tiempo dependientes (Navarro-García y cols. 1998; Villaseca y cols. 2000). Estas observaciones sugerían actividad de la toxina sobre el citoesqueleto de las células ya que había pérdida de las fibras de estrés y liberación del contacto focal, lo que ocasionaba el redondeamiento de la célula. (Navarro-García y cols. 1998).

Posteriormente se demostró que el daño que sufre el citoesqueleto de la célula, se debe a un efecto de degradación sobre las cadenas alfa y beta de la fodrina (o su homólogo espectrina), ocasionado por Pet (Villaseca y cols. 2000). La ruptura de la fodrina se presenta entre los aminoácidos M<sup>1198</sup> y V<sup>1199</sup> en una hélice  $\alpha$  y dentro del dominio de unión a calmodulina (Canizales-Román y Navarro-García, 2003). Las diferentes propiedades identificadas en Pet están relacionadas con el motivo de serin proteasa de la

toxina, ya que dichos efectos fueron inhibidos al utilizar un inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo), así como una cepa mutante en el motivo de serina (Pet S260I).

La internalización de la proteína a las células eucariotas, se realiza por un proceso de endocitosis mediada por clatrina. Pet se somete a un transporte retrogrado hacia el retículo endoplásmico para lo cual utiliza el translocon Sec61 (Navarro-García y cols. 2007a; 2007b). La presencia de Pet en el citosol correlaciona con la colocalización de su blanco fodrina ocasionando el efecto citotóxico observado en células HEp-2 tratadas con la proteína Pet purificada (Villaseca y cols. 2000; Canizales-Román y Navarro-García, 2003). En estudios recientes (Betancourt-Sánchez y cols. 2009), utilizando un modelo *in vitro* en células HEp-2 tratadas con Pet y con una cepa EAEC de origen clínico, observaron los cambios morfológicos antes mencionados y después de tres horas de infección la presencia de un incremento de células muertas, estos resultados indican que además de la secreción e internalización de Pet, es importante la adhesión en el proceso de infección por EAEC.

**EspP.** Brunder y cols. (1997), describieron la proteasa EspP (del inglés, Extracellular serine protease plasmid-encoded); proteína extracelular de 104 kDa, secretada por una cepa de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) del serotipo O157:H7. Al mismo tiempo Djafari y cols. (1997), describieron la serin proteasa PssA (del inglés, protease secreted by STEC), secretada por una de *Escherichia coli* productora de toxina tipo shiga (STEC) del serotipo O26:H-, aunque ambas proteínas son idénticas y codificadas en un plásmido de virulencia de la bacteria tienen diferentes actividades biológicas. EspP degrada la pepsina A y el factor V de coagulación (Brunder y cols. 1997), mientras PssA tiene actividad de proteasa sobre la caseína y es citotóxica para células Vero (Djafari y cols. 1997).

**EspC.** Stein y cols. (1996), reportaron que la cepa E2348/69 de *Escherichia coli* enteropatógena clásica (EPEC), secretaba una proteasa a la que denominaron EspC (EPEC-secreted protein C). Esta al igual que la mayoría de los integrantes del grupo de las SPATEs, es una proteína de alto peso molecular (110 kDa) con diferentes funciones. También, es una proteína altamente inmunogénicas y se han identificado anticuerpos tanto en el suero de voluntarios retados con EPEC (Jarvis y cols. 1995), como en muestras de leche materna (Manjarrez-Hernández y cols. 2000).

Durante el estudio de EspC se identifico que comparte algunas de las propiedades descritas para Pet, tal es el caso del efecto de enterotoxina y la capacidad para degradar espectrina o fodrina (Navarro-García y cols. 2004). También se observó que al igual que Pic de EAEC (Hernández-Chiñas, 2002) y Hbp de *E. coli* extraintestinal, EspC rompe la hemoglobina (Drago-Serrano y cols. 2006). Con respecto a como se internalizar a la célula eucariota, un estudio realizado por Vidal y cols. (2008) refiere que es a través del sistema de secreción tipo III.

**SigA.** Esta proteasa secretada por *Shigella flexneri* tiene un peso molecular de 103 kDa, el gen que la codifica (*sigA*) se localiza en la isla de patogenicidad *she*, por análisis funcional de la proteína se estableció que tiene capacidad para degradar la caseína. SigA presenta identidad alta con Pet y al igual que esta proteasa induce efecto citopático en células HEP-2 y degrada la cadena alfa de la fodrina (proteína recombinante humana), esta última observación sugiere que la proteasa contribuye al daño celular observado durante la infección por *Shigella*. (Rajakumar y cols. 1997; Al-Hasani y cols. 2000). Por otro lado ensayos en el modelo de asa ligada de conejo, mostraron que SigA tiene actividad de enterotoxina, esta última propiedad así como la de citotoxina se han relacionado con la capacidad de degradación de la fodrina inducida por la proteasa (Al-Hasani y cols. 2000; 2009).

**Sat** (Secreted autotransporter toxin). Se identificó originalmente en la cepa (CFT073) de *E. coli* uropatógena (UPEC), que fue aislada de un paciente con pielonefritis aguda. La proteína con peso de 107 kDa, presenta actividad citopática sobre células VERO, HK-2 y HEp-2 y en líneas celulares primarias de riñón CRL-1573 y de vejiga CRL-1749 (Guyer y cols. 2000). Similar a lo descrito en otras SPATEs, se ha comprobado que el efecto citopático a diferentes líneas celulares inducido por Sat, se relaciona con Ser<sup>256</sup> la serina del sitio activo (Maroncle y cols. 2006). Los ensayos *in vitro* con diferentes líneas de células, mostraron que Sat además induce efecto vacuolizante que se ha relacionado con el daño celular (Guyer y cols. 2002). Utilizando el modelo animal de ratones inoculados con la cepa UPEC productora de Sat, se observó que la bacteria no solo colonizaba la vejiga, riñón y el tracto urinario del animal, el estudio histológico mostró la formación de vacuolas en las células del tubo proximal, lo que confirmaba las observaciones *in vitro* con células en cultivo. Sat es una proteasa que además se ha identificada en cepas de *Shigella spp*, EPEC, EAEC y EHEC. (Guyer y cols. 2002; Niyogi y cols. 2004; Hernández-Chiñas y cols. 2008; Boisen y cols. 2009).

### **I.5.2 SPATEs Clase II**

**Tsh.** Una de las primeras proteasas de serina descritas fue Tsh (Temperature-sensitive hemagglutinin), esta proteína con un peso de 104 kDa es secretada por cepas de *Escherichia coli* patógenas de aves (APEC), inicialmente se consideró como hemaglutinina, sin embargo, posteriormente se identificó que degrada la hemoglobina con lo que se libera el grupo Hemo (Provence y cols. 1994, Stathopoulos y cols. 1999). Esta actividad se identificó al analizar su secuencia de aminoácidos en el dominio pasajero y se observó que Tsh tiene una identidad de 99.9% con Hbp, SPATE secretada por una cepa de *E. coli* extraintestinal de origen humano (Otto y cols, 1998). Tsh además tiene homología con la IgA proteasa de *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae*, pero a diferencia de estas dos proteasas Tsh no tiene la capacidad

para degradar inmunoglobulinas. (Provence y cols. 1994). El dominio pasajero de Tsh presenta una serina activa en la posición 259 de la secuencia lineal, mutaciones en este aminoácido no inhiben la actividad hemaglutinante o la secreción extracelular de Tsh, por lo que al parecer dicha serina no esta directamente relacionada con las propiedades referidas (Stathopoulos y cols. 1999). Aunque el gen *tsh* ha sido identificado en cepas UPEC se desconoce si participa como factor de virulencia en las infecciones de vías urinarias asociadas a la infección por esta bacteria (Parham y cols. 2005).

**SepA.** Benjelloun-Touimi y cols. (1995) describen en *Shigella flexneri* SepA (*Shigella* extracelular protein), una proteína de 110 kDa con homología a Tsh. Utilizando mutantes en *sepA* se observo que las bacterias perdían la capacidad para degradar la mucosa e inducir un proceso inflamatorio. (Banjelloun-Touimi y cols. 1998).

**Vat** (toxina vacuolizante). En el sobrenadante del cultivo de la cepa APEC (Ec222) se identifico Vat que es una serin proteasa que induce la formación de vacuolas en células (Perreira y Gyles 2003), efecto similar al descrito en Sat (Guyer y cols. 2000) y VacA proteína autotransportada de *H. pylori* (Salvadori y cols. 2001). Parham y cols. (2005) realizaron un estudio para buscar SPATEs en cepas de *E. coli* extraintestinal, los resultados mostraron alta prevalencia de Vat en cepas UPEC.

**EaaA y EaaC.** Ambas proteasas se identificaron en la cepa ECOR-9 (Sandt y cols., 2000) *E. coli* aislada de un niño sano. Los genes de estas proteasas se encuentran relacionados con proteínas de superficie de la bacteria cuya función es la unión de inmunoglobulina (IgG). Aunque, la función de EaaA y EaaC no ha sido confirmada experimentalmente, por el hecho de presentar alta identidad (99.4%) con proteínas que unen IgG, se ha propuesto que pudieran participar en la degradación de la unión de las inmunoglobulinas a la bacteria. (Sandt y cols., 2000).

**EspI y EpeA.** Son otras dos proteínas secretadas por cepas del grupo STEC. El gen de EspI se encuentra en una isla de patogenicidad y el de EpeA en el plásmido de la bacteria. EspI es capaz de degradar pepsina y apolipoproteína I y EpeA, al igual que Pic es capaz de degradar mucina, gelatina y pepsina, además se identificó que inducen efecto citopático en células HEP-2 en cultivo (Schmidt y cols. 2001, Leyton y cols. 2003).

**EatA.** Esta serin proteasa autotransportada se ha identificado en algunas cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), por ensayos *in vitro* se mostró que esta enzima tiene capacidad para degradar la pepsina y oligopéptidos conjugados con p-nitronilido, sustratos identificados para catepsina G; propiedades parecidas a las descritas para SepA, lo anterior sugiere la participación de EatA en la patogénesis de las cepas ETEC. (Patel y cols. 2004).

**Pic.** El gen de Pic (*pic*) se encuentra en el cromosoma de las bacterias patógenas *Escherichia coli* enteroagregativa, *E. coli* uropatógena y *Shigella flexneri* (Gutiérrez-Jiménez y cols. 2008). Originalmente se identificó en el locus cromosomal *pic/set* en *Shigella flexneri* 2a, dentro de la isla de patogenicidad *she* (Al-Hasani y cols. 2001). En este locus se encuentran los genes que codifican para Pic (Protein involved in colonization), y una proteína homóloga llamada PicU, identificada en la cepa CFT073 del grupo UPEC (Henderson y cols. 1999; Parham y cols. 2004).

Pic no posee propiedades enterotóxicas o citotóxicas, sin embargo, tiene la capacidad para degradar proteínas del complemento y mucina (Henderson y cols. 1999; Dutta y cols. 2002). La actividad como mucinasa descrita en Pic es dosis dependiente y relacionada con los motivos de serin proteasa y de unión a monosacáridos que constituyen la mucina (Gutiérrez-Jiménez y cols. 2008). En un análisis sobre la identidad de Pic y otras SPATEs se mostró relación con Tsh y con Hbp (50%). Considerando

la identidad antes señalada se evaluó si Pic presentaba actividad de degradación de hemoglobina. Los resultados mostraron que Pic al igual de Hbp y Tsh tiene la capacidad para romper el grupo hem y además de unión al hierro (Hernández-Chiñas y cols. 2002). La actividad mucinolítica y de captación de hierro de Pic sugiere una estrategia efectiva de la bacteria para la penetración de la capa de moco intestinal y/o la obtención de una fuente de carbono y hierro para su metabolismo. [PicU proteína homóloga de Pic, en ensayos *in vitro* presenta actividad mucinolítica contra mucina de la glándula submaxilar de bovino (Parham y cols. 2004)].

## **I.6 Importancia Epidemiológica de las SPATEs**

### **I.6.1 SPATEs en los Diferentes Grupos Filogenéticos de *Escherichia coli***

El análisis filogenético de *E. coli* por diferentes procedimientos (Herzer y cols. 1990; Clermont y cols. 2000; Escobar-Páramo y cols. 2004), ha permitido definir cuatro grupos clónales designados por las letras A, B1, B2 y D. En los grupos A y B1 están las cepas comensales y algunas relacionadas con la patogénesis de la diarrea, en B2 están principalmente las cepas que causan infecciones extraintestinales al igual que en el grupo D pero en este las cepas contienen menos genes asociados a virulencia.

Restieri y cols. (2007) en una colección de cepas de *E. coli* de los grupos asociados con la etiología de la diarrea (ECOR), analizaron la presencia por PCR de los genes *tsh*, *vat*, *sat*, *espP*, *sigA*, *sepA*, *espC*, *eatA*, *pet*, *aaaA/aaaC*, *pic* y *aida-I*, que codifican para 13 diferentes SPATEs. En su estudio estos investigadores encuentran relación entre la presencia de alguno de los genes para las SPATEs y el grupo filogenético y/o patotipo. *vat*, *sat* y *pic* se identificaron en el grupo B2 y D que integran a cepas relacionadas con infecciones extraintestinales. Esto resulta interesante ya que las tres SPATEs se han

identificado principalmente en cepas UPEC. Los genes *aaaA/aaaC* y otros más se identificaron en el grupo filogenético A, en este se incluyen tanto cepas comensales de la biota natural como algunas causantes de diarrea. Estos resultados sugieren una distribución filogenética específica de ciertas SPATEs, y además, concuerdan con los reportados por Parham y cols (2005), quienes identificaron varias SPATEs utilizando iniciadores degenerados de una región conservada del translocón o dominio  $\beta$  de las proteasas.

### **1.6.2 SPATEs en *E. coli* Comensales y de Origen Clínico.**

En la literatura existen diferentes estudios realizados buscando la relación de SPATEs con la virulencia de los diferentes grupos patógenos de *E. coli*. Uno de estos fue realizado por Restieri y cols. (2007) quienes evaluaron la presencia de genes de diferentes SPATEs en cepas de *E. coli* que causan diarrea (ETEC, EPEC y EHEC), relacionadas con infecciones de vías urinarias (UPEC), de origen aviar (APEC), así como en cepas comensales de la biota habitual del intestino. Sus resultados mostraron que existe asociación de *sepA* (50%) en cepas ETEC, *espC* (33%) con EPEC y *espP* (100%) con EHEC. En 84 cepas UPEC que incluyeron en su estudio identificaron la presencia de *vat* (42%), *sat* (56%) y *pic* (21%), con respecto a las cepas APEC incluyeron 323 aislados en las que identificaron los genes *tsh* (50%) y *vat* (33%). En este estudio en particular no se identificó la presencia de genes para alguna de las SPATEs en las cepas comensales.

Por su parte Boisen y cols. (2009) quienes analizaron 10 cepas de cada uno de los tipos patógenos de *E. coli*, encontraron asociación entre *Sat* (20%) y cepas EHEC y *SigA* (50%) con cepas EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), este último dato sugiere que *SigA* puede ser utilizado como marcador de virulencia de EIEC. En este mismo estudio, se incluyeron cepas de *Shigella flexneri* en las que identifico la presencia

de Sat en el 90% de las cepas analizadas, SigA en 70% y Pic y SepA en el 40% de las cepas, la presencia de algunas de estas SPATEs en cepas de *Shigella flexneri* habían sido reportadas previamente (Roy y cols. 2006).

### **I.6.3 SPATEs en EAEC**

EAEC es un patógeno considerado como emergente, relacionado con la etiología de diarrea persistente (>14 días de duración), diarrea con sangre y también con cuadros de diarrea aguda, que afectan principalmente a niños menores de cinco años. También, se ha aislado, en cuadros de diarrea en pacientes con SIDA, viajeros que visitan países en desarrollo, adultos mayores y en diferentes brotes de diarrea en comunidades y nosocomios (Villaseca y cols. 2005). Fue en este grupo patógeno en el que primeramente se identificaron las SPATEs Pet y Pic (Eslava y cols., 1998, Henderson y cols., 1999). Aunque, Pet es la proteasa que se seleccionó como modelo de estudio, la frecuencia con la que se identifica es mínima comparada con Pic que es mucho más frecuente en cepas EAEC (Pereira y cols. 2007; Eslava y cols. 1993; Czecsuli y cols. 1999; Okeke y cols. 2000; Villaseca y cols. 2005).

En nuestro laboratorio se cuenta con un cepario que se ha ido integrando desde hace más de 25 años, en el se guardan cepas de los diferentes grupos patógenos de *Escherichia coli*. Del cepario se seleccionaron cepas EAEC aisladas de niños con y sin diarrea y otras aisladas de muestras ambientales, en estos se analizó la presencia de los genes *pet*, *pic* y *sat* así como la expresión de las mismas proteasas. Los resultados mostraron que 63% de las cepas aisladas de niños con diarrea y el 33.8% de las aisladas de niños sanos, presentaban uno o más de los genes para SPATEs ( $P < 0.05$ ). Resultados similares se observaron al analizar la expresión de las proteasas. El análisis individual de cada SPATE mostró que *pic* y *sat* eran los genes que se encontraban con mayor frecuencia en cepas como gen único

o en asociación *pic/sat*. Con respecto a las cepas de origen ambiental solo dos presentaron *pic* pero ninguna la expreso (Hernández-Chiñas y cols. 2008).

Un estudio reciente por Boisen y cols. (2009) quienes analizaron 55 cepas EAEC de diferentes orígenes geográficos, observaron que el 94.5% de las cepas presentaban más de una de las SPATEs, incluyendo miembros de la clase I (Pet, Sat, SigA, ES<sub>SpP</sub>) y/o clase II (Pic, SepA, Tsh), estos dos últimos estudios muestran la importancia que tienen las serin proteasas como posible factor de virulencia de EAEC.

### **I.7 Motivos Funcionales en las SPATEs**

Para elucidar la relación estructura función de diferentes SPATEs, se han empleado métodos como el análisis bioinformático (Yen y cols. 2008) o la inducción de mutaciones en el dominio pasajero (Dutta y cols. 2003). Como previamente ha sido referido, dichos procedimientos han permitido identificar algunos motivos funcionales de las proteasas, sin embargo, hasta el momento no se ha realizado ningún estudio que permita ubicarlos directamente en las proteínas. El método de Phage display es un procedimiento útil que permite identificar sitios inmunodominantes de proteínas, en este estudio para los propósitos del mismo, se considero como una herramienta conveniente para el estudio de las SPATEs.

### **I.8 Phage Display**

En 1985, George Smith mostró como una proteína extraña se podía fusionar a una proteína de la cubierta de un bacteriófago, con dicho procedimiento se lograba que dicha proteína extraña se hiciera accesible. Con este antecedente tres años más tarde, se desarrolló un sistema que permitía la expresión

de una biblioteca de péptidos fusionados a una de las proteínas de la cubierta de un fago filamentoso. Fueron estos trabajos los que dieron lugar para que a partir de la década de los 90's del siglo pasado, se despertara un enorme interés para la generación de diferentes bibliotecas (Scott y cols. 1990; Devlin y cols., 1990; Cwirla y cols. 1990). Es así como surge el método de Phage display, el cual se ha desarrollado como un instrumento de investigación ampliamente utilizado en casi todas las disciplinas de la investigación biológica (Wang y cols. 2004; Bratkovic y cols. 2010).

El éxito de esta biotecnología consiste en la inserción de una secuencia extraña en un lugar apropiado dentro del genoma de las proteínas de la cubierta del fago filamentoso, lo que resulta en la expresión de un péptido extraño fusionado a una de las proteínas de la envoltura del fago. Si se insertan secuencias aleatorias, es posible obtener una gran biblioteca de péptidos con secuencias diferentes, presentadas en cada fago.

Entre los fagos filamentosos utilizados están M13, f1 y fd los cuales contienen DNA circular de una sola cadena (DNAss), en el se encuentran los genes que codifican para las proteínas de superficie. De estas pVIII es la más abundante con 2670 copias, pIII con cinco copias localizada en la región de la “cabeza”, pVI de importancia para la unión a la célula huésped, pVII y pIX localizadas en la región del “tallo”, las cuales son requeridas para la estabilidad y el inicio del ensamble del fago (Rodi y cols. 1999).

El genoma de los fagos filamentoso es flexible por lo que en el pueden acomodarse insertos grandes de secuencias extrañas, sin que afecte en forma importante su replicación y ensamble. Los fagos son estables incluso a temperaturas superiores a los 70 °C por 30 min; resisten el ácido clorhídrico a una concentración 0.2 N, condiciones importantes para el adecuado desarrollo de la técnica de Phage

display. El ciclo de vida del fago M13 inicia por la unión del fago al receptor de cepas de *E. coli* (pili F), y una vez que el genoma del fago fue inyectado la bacteria empieza a producir las partículas fágicas. El DNAss es complementado por una polimerasa del hospedero para continuar con la síntesis de las 10 proteínas que conforman el fago incluidas las estructurales (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX), las de ensamble y exportación (pI y pIV) y las implicadas en la replicación (pII, pV y pX). El ensamble y exportación de estos fagos requiere, además, de algunos componentes de la membrana de la bacteria

### **I.8.1 Librería de Péptidos al Azar (RPLs)**

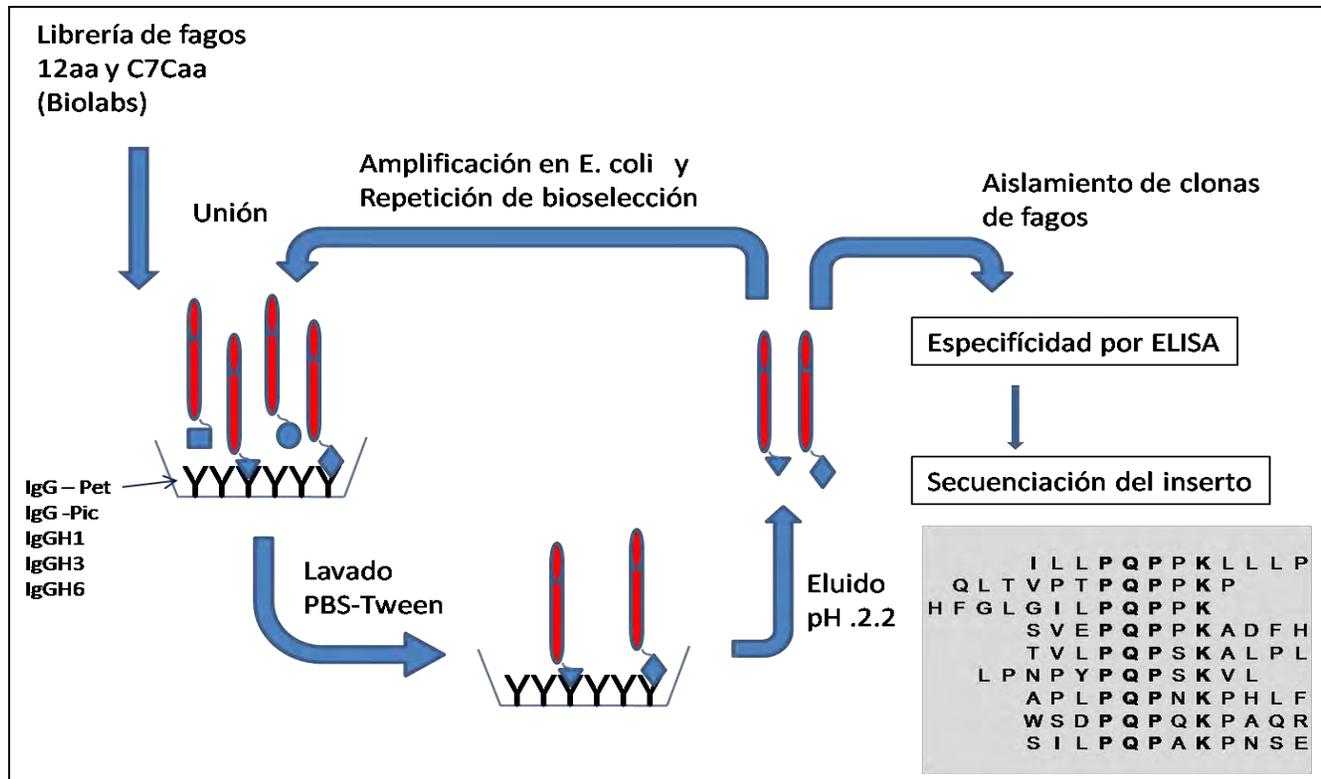
La mayoría de las librerías que existen son de naturaleza universal, éstas pueden ser utilizadas para el mapeo de epitopes empleando anticuerpos monoclonales o policlonales, con los que se pueden seleccionar mimotopos de proteínas, carbohidratos e incluso lípidos por lo que su aplicación es muy amplia solo limitada por la imaginación (Wang y Yu. 2004). Estas librerías además se pueden utilizar para la selección de agonistas y antagonistas, para identificar sustratos o inhibidores de enzimas, para el análisis de interacción proteína-proteína, así como en el diseño de anticuerpos catalíticos e incluso el desarrollo de vacunas (Bradkovic y cols. 2010).

En la construcción de RPLs, los péptidos son codificados por oligonucleótidos constituidos por residuos al azar (X) codificado por un codón degenerado NNK o NNS (N=A, C, G o T; K= G o T; S= G o C), esto es para reducir la formación del codón de paro.

En una librería de seis aminoácidos ( $X^6$ ) son 64 millones de secuencias peptídicas diferentes codificadas por 1 billón de secuencias específicas NNK, ésta librería esta genéticamente unida al genoma que codifica para una de las proteínas de la cubierta del fago, esto hace que la RPLs contenga

más de un billón de fagos cada uno presentando un péptido diferente. Estos péptidos pueden ser de seis a 43 aminoácidos de acuerdo a los reportes de la literatura (Wang y Yu. 2004). La complejidad de la librería esta restringida a aproximadamente de  $10^9$  a  $10^{10}$  aminoácidos, principalmente por la limitada capacidad de transformación en *E. coli*. Los RPLs de péptidos largos en general son utilizados para el mimetismo de epitopes estructurales y los más cortos para formas no estructurales. En el caso de los péptidos cortos se han introducido modificaciones como es el añadir cisteínas en los extremos, esto con el propósito de que se forme un asa (loop) que permite mimetizar epitopes estructurales.

Para la selección de mimotopos de epitopes (biopanning o bioselección) se utilizan anticuerpos específicos de acuerdo a los pasos que a continuación se describen (Fig. 3) (Smith and Scout, 1993): El primer paso consiste en preparar la biblioteca primaria o realizar la amplificación de una ya existente y proceder a exponer los fagos a la molécula blanco previamente inmovilizada (anticuerpo unido a una placa de ELISA). En la siguiente fase se procede a remover los fagos con baja afinidad al anticuerpo por medio de lavados (PBS-Tween). Posterior a la eliminación de los fagos con poca afinidad se realiza la obtención de los fagos que se unieron al anticuerpo y realizar su amplificación en *Escherichia coli*. El último paso consiste en repetir el proceso (de tres a cuatro rondas), para que los fagos con secuencias peptídicas que presenten aminoácidos en común se incrementen.



**Figura 3. Bioselección o Biopanning.** El diagrama representa experimento de bioselección utilizado para la identificación de péptidos mimotopos de regiones inmunodominantes. La molécula selectora es una IgG representada por “Y” la cual es inmobilizada sobre una matriz sólida (placa de ELISA). Después de la adición de los fagos que presentan una librería de péptidos, se incuba para que se lleve a cabo la interacción entre el anticuerpo y el péptido mimotopo de epítopos inmunodominantes. Esto es seguido por lavados para remover los fagos que no se unieron, seguido de la elución de los fagos unidos. Estos se amplifican infectando *E. coli* para su uso en la próxima ronda de selección. Después de 3 o 4 rondas de bioselección; se obtienen clones individuales de los fagos para su caracterización. La especificidad de cada clona con la IgG puede ser determinada por ELISA o Western-blot. La secuencia de los péptidos insertados en cada clona se deduce de la secuencia del ssADN correspondiente a la región que codifica para el inserto extraño. Motivos comunes pueden ser identificados como se observa en el diagrama.

Phage display se ha convertido en una herramienta eficiente para identificar y mapear epítopos de antígenos relacionados con enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Dybwad y cols. 1995); parasitosis como la teniasis (Gazarian y cols. 2001); enfermedades ocasionadas por bacterianas como la neumonía (Buchwald y cols. 2005), meloidosis (Chan and Nathan, 2005), bronquitis y sinusitis (Bioshop-Hurley y cols. 2005), infecciones virales como el SIDA (Yang y cols. 1995; Palacio-Rodríguez y cols. 2007), hepatitis B (Folgori y cols. 1994) y dengue (Yao y cols. 1995). Con este procedimiento se pueden seleccionar mimotopos de epítopos de proteínas con propiedades antigénicas,

de esta manera, los mimotopos pueden ser utilizados como inmunógenos capaces de inducir una respuesta específica en el hospedero.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los últimos 16 años se han identificado más de 20 SPATEs en diferentes enterobacterias, la mayoría de estas con diferentes propiedades biológicas como es el caso de Pet. Como ya se hizo referencia esta proteasa degrada Fodrina o espectrina, factor V de coagulación y pepsina. En los efectos señalados se ha demostrado la participación del motivo de serina localizado en la región globular de la proteína. También se ha observado que la proteína tiene la capacidad de internalizarse y que funciona como quimioattractante de células mononucleares *in vitro*, propiedades en las que el motivo de serina no participa. La conclusión al respecto es la existencia en la proteína de otros motivos funcionales, razón por la que diferentes investigadores han tratado de elucidar la estructura-función de diferentes SPATEs. Entre los procedimientos utilizados para dicho propósito se ha empleado desde el análisis bioinformático (Yen y cols. 2008), hasta la inducción de mutaciones en el dominio pasajero (Dutta y cols. 2003). Los resultados obtenidos al respecto señalan la existencia de ciertos motivos, aunque, sin la evidencia directa que permita definir su función.

La propuesta del presente estudio consistió en realizar el mapeo de epitopes de dos SPATEs prototipo de las clases I (Pet) y II (Pic), para conocer si eran funcionales y responsables de algunas de las propiedades biológicas descritas para dichas proteasas. Se utilizó el método de Phage display ya que, como fue mencionado previamente, es un procedimiento que permite identificar sitios inmunodominantes de compuestos con diferente composición (proteínas, carbohidratos, lípidos). En el estudio se identificaron mimotopos de sitios inmunodominantes que son motivos compartidos entre diferentes SPATEs de ambos grupos (I, II) y cuya función está relacionada con la quimiotaxis inducida por Pet sobre macrófagos.

### **III. HIPOTESIS**

Epitopes inmunodominantes identificados en Pet y Pic son motivos relacionados con la activación de algunas funciones de las proteasas no asociadas con el motivo de serina.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Identificar motivos inmunodominantes que pudieran estar relacionados con alguna o algunas de las funciones de Pet y/o Pic en las que no participa el motivo de serina de las SPATEs.

#### **V. OJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar motivos inmunodominantes de SPATEs.
- Conocer la secuencia de aminoácidos de los mimotopos aislados y analizar si las secuencias se encuentran en la estructura primaria y terciaria de las SPATEs.
- Evaluar si anticuerpos obtenidos en ratones inmunizados con los mimotopos seleccionados reconocen a las SPATEs.
- Analizar si los mimotopos seleccionados participan en alguna(s) de las funciones biológicas descritas para una de las SPATEs incluidas en el estudio.
- Evaluar si anticuerpos obtenidos contra los péptidos sintéticos diseñados con las secuencias de aminoácidos de los mimotopos seleccionados, presentan la misma respuesta obtenida con los anticuerpos antimimotopo.

## VI. MÉTODOS.

### VI.1 Material Biológico

En el estudio se utilizaron dos cepas, *E. coli* HB101 (pCEFN1), que es portadora del gen *pet* de la cepa O42 EAEC (O44:H18), dentro del sitio BamHI/KpmI del plásmido pSPORT1 con resistencia a ampicilina (Eslava, y cols. 1998) y *E. coli* HB101 (pP56) clona mínima de expresión de Pic; un fragmento cromosomal de 5.8-kb de la cepa O42 clonado dentro de los sitios *EcoRI-ScaI* de pACYC184, con resistencia a tetraciclina (Henderson, y cols. 1999). Las dos cepas se mantuvieron conservadas en medio Dorset hasta su empleo. Antes de la obtención de las proteasas se corroboró la pureza de las cepas, para lo que se cultivaron en gelosa sangre y agar Mc Conkey. Para su conservación se crecieron en gelosa especial con 100 µg/ml de ampicilina o 10 µg/ml de tetraciclina respectivamente.

### VI.2 Purificación de Pet y Pic

Las proteasas (Pet y Pic) se obtuvieron del sobrenadante del cultivo en Caldo Luria (CL), de las clonas HB101 (pCEFN1) y HB101 (pP56), siguiendo el procedimiento descrito por Villaseca y cols. (2000), con algunas modificaciones. Tubos con 5 ml de CL se inocularon con cada una de las clonas, se incubaron por 4 h a 37 °C con agitación continua (150 r.p.m.). De estos cultivos se tomó 1 ml para inocular 1 L de CL, se incubó durante 18 h a 37 °C con agitación continua (150 r.p.m.), posteriormente el cultivo se centrifugó a 12,000 g (Sorvall RC) durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante del cultivo se precipitó con sulfato de amonio a una saturación de 75% (470 g de sal /L), dejándolo en reposo a 4 °C toda la noche. Las proteínas precipitadas se obtuvieron por centrifugación a 12,000 g (Sorvall RC) 30

min a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en amortiguador de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2, para eliminar la sal se dializó por dos días con el mismo amortiguador y un día más con 0.05 M Tris-HCl en 0.01 M de EDTA pH 8.0, se utilizaron bolsas de diálisis con poro de 12-14 000 Da (Spectrum labs. CA, USA).

Al precipitado proteico se le realizó cromatografía, primero con una resina de intercambio aniónico con Q-sepharose (Pharmacia, USA), en una columna de 1.5 cm de diámetro por 57 cm de largo, la velocidad de flujo se ajustó a 20 ml/h para obtener fracciones de 5 ml. Como amortiguador se utilizó 0.05M Tris-HCl en 0.01M de EDTA pH 8.0, las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas aumentando la fuerza iónica del sistema con 0.5 M de NaCl.

El siguiente paso fue realizar una cromatografía de intercambio catiónico empleando FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) con una columna Mono S HR 5/5 (Pharmacia, USA). La columna se equilibró con 0.05M Tris-HCl en 0.01M de EDTA pH 6.8 seguido de un gradiente salino utilizando 1M de NaCl, el flujo fue de 0.5 ml/min colectando fracciones de 1 ml. El perfil de elución se analizó a 280 nm.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, y cols. 1976), por micro ensayo en placa, utilizando albúmina sérica bovina como estándar. La reacción colorida se midió a 575 nm en un espectrofotómetro (Dynatech MR 580).

### **VI.3 SDS-PAGE**

La pureza de ambas proteínas (Pet y Pic), se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% bajo condiciones desnaturalizantes, con 0.1% (w/v) de duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (Laemli, y cols. 1970). Las dimensiones del gel fueron de 7 cm x 8 cm con un espesor de 1.0 mm. Las proteínas se separaron aplicando un voltaje constante de 100 V para el gel concentrador y 150 V para el resolutor. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R (Sigma-Aldrich, USA). El desplazamiento de las proteínas se comparó contra los que se obtuvieron de un grupo de proteínas preteñidas de pesos moleculares conocidos (Bio-Rad, USA).

### **VI.4 Anticuerpos anti-Pet y anti-Pic**

Las fracciones de 104 kDa (Pet) y 110 kDa (Pic) obtenidas en el proceso de purificación de las proteasas, fueron separadas por electroforesis (SDS-PAGE); la banda correspondiente a Pet y a Pic se cortó y se mezcló con adyuvante incompleto de Freund hasta obtener una suspensión homogénea (Villaseca, y cols. 2000). Con estas se inocularon vía intradérmica conejos Nueva Zelanda administrando una dosis cada 15 días. En total se aplicaron cinco dosis, después de la última se realizó una sangría de prueba para evaluar la respuesta de los conejos, si los títulos de anticuerpos eran elevados, los conejos se sangraban a blanco. La sangre obtenida se dejó coagular por 1 hora a 37 °C. El suero se separó por centrifugación a 2000 g (Sorvall RT 6000D) durante 15 min a 4 °C y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -20 °C hasta su uso. Como testigo negativo se utilizó el suero del conejo obtenido antes de la primera inmunización.

## **VI.5 Sueros de Niños**

La selección de sueros inmunorreactivos contra las toxinas Pet y Pic, se realizó a partir de 21 muestras obtenidas de niños (menores de cinco años) infectados con la cepa EAEC (O?:H10), durante los brotes de diarrea que se presentaron en un hospital pediátrico de la ciudad de México (Eslava, 1993).

## **VI.6 Detección de Sueros Positivos anti Pet y anti-Pic**

Se realizó un ensayo de ELISA utilizando microplacas de 96 pozos, en cada uno de estas se colocaron 100 µl Pet o Pic (8 µg/ml en amortiguador de carbonatos), las placas se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente se bloqueó la superficie de los pozos con 100 µl de 2% BSA (W/V) y 0.5% de leche descremada (W/V) diluida en PBS. Después de tres lavados con 0.1% de Tween en PBS (PBS-T) se agregó con el suero a una dilución 1:100 y se incubó durante una hora a 37 °C. Para visualizar la reacción se utilizan los anticuerpos secundarios anti-IgG de humano o anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina (Zymed, USA) a una dilución 1:1000. La reacción antígeno-anticuerpo se hizo evidente al agregar p-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich, USA), la lectura de la reacción se leyó a 405 nm en un lector de ELISA (MR 580; Dynatech).

## **VI.7 Inmunotransferencia**

Las proteínas separadas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, USA) de acuerdo al procedimiento descrito por Towbin y col. (1979). La transferencia se realizó utilizando amortiguador Tris (0.25% w/v), glicina (1.2% w/v) y metanol (16.6% v/v) a 200 mA constante durante 90 min. La eficiencia de la transferencia, se analizó con una tinción reversible

utilizando rojo de Ponceau (0.01%). Una vez corroborada la presencia de las proteínas, la membrana se destiñó con PBS-T. Los espacios libres se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS (PBS-L), durante toda la noche, manteniendo la membrana a 4 °C. Para evaluar la respuesta de los anticuerpos, las membranas se lavaron tres veces con PBS-T (5 min cada una) y se les adicionaron los sueros de los niños o el de los conejos inmunizados diluidos 1:100 y 1:300 en PBS-L. La respuesta se hizo evidente con anti-IgG de humano o anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed, USA) a una dilución 1:3500 en PBS-L. La reacción se visualizó agregando BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, USA) y se detuvo con agua corriente.

En la identificación de la proteína EspC, se utilizaron anticuerpos anti-EspC producidos en conejo y proporcionados por el Dr. Ángel Manjarrez.

## **VI.8 Purificación de IgG**

Las inmunoglobulinas (IgGs) se obtuvieron del suero de los pacientes infectados naturalmente con EAEC productoras de Pet y Pic, que presentaron mayor reactividad con ambas proteínas. Los sueros utilizados para este propósito se mezclaron con proteína G agarosa (Invitrogene, USA), de acuerdo al método descrito por Gazarian y cols. (2000b). En microtubos de 1.6 µl se colocaron 250 µl de proteína G-agarosa la cual se mezcló con 500 µl de suero, se incubó durante 20 min a temperatura ambiente (TA), con agitación suave cada 2 min. Concluido el tiempo los tubos se centrifugaron por 30 s a 500 g (Eppendorf 5415 C), el sobrenadante obtenido se eliminó y el complejo agarosa-proteína G-IgG se lavó cinco veces con 0.1 M glicina, pH 9.0. El complejo formado se disoció con amortiguador de elución (0.1 M glicina-HCl, pH 2.2), la mezcla se centrifugó a 500 g por 30 s y el sobrenadante que contiene la

fracción con la IgG purificada se ajustó a pH 7.0 con 2 M de trizma base. La concentración de cada IgG obtenida se determinó por el método de Bradford.

## VI.9 Selección de Fagos con Péptidos Miméticos

Para la bioselección (biopanning) se utilizaron dos librerías de péptidos, una de 12 aminoácidos lineales (Ph.D.-12™ Phage display Peptide Library Kit) y otra de siete aminoácidos con cisteínas en los extremos (Ph.D.-7™ Phage display Peptide Library Kit New England BioLabs Inc. [Beverly, MA, USA]). Las secuencias de péptidos desplegadas al azar ( $2.7 \times 10^9$  transfectantes), están fusionadas a través de un espaciador con los aminoácidos GGGS a la proteína PIII del fago M13. Las condiciones ideales para tener una buena selección requiere que se cuente con aproximadamente 20 copias de cada secuencia peptídica por 10  $\mu$ l, para lo cual se realizó una amplificación de las clonas en la cepa de *E. coli* ER2738 (New England Bio Lab) ajustando a una concentración de  $2 \times 10^{10}$  u.f.p/ 10 ml.

Para la bioselección se utilizó el procedimiento descrito por Smith y Scout (1993); Dower y Cwirla (1994), con ajustes menores propuestos por Gazarian y cols. (2001). En breve, en dos pozos de una placa de poliestireno de 96 pozos (Immulon 4 flat bottom plates, Dynatech Lab Inc., USA), se colocaron 100  $\mu$ l que contenían 150  $\mu$ g/ml o 7.5  $\mu$ g/ml de cada IgG diluida en PBS. Las placas se incubaron toda la noche a 4 °C con agitación suave, para eliminar la IgG no adheridas a los pozos se realizaron seis lavados con PBS-T. Para eliminar la posibilidad de reacciones inespecíficas, los pozos se trataron con 300  $\mu$ l de PBS con 1% de BSA (PBS-1% BSA) durante una hora a 4 °C, posteriormente, se realizaron cinco lavados consecutivos usando PBS-T a temperatura ambiente. Para la selección de los péptidos mimotopos, se agregaron a cada pozo 100  $\mu$ l de PBS-T que contenía aproximadamente  $2 \times 10^{10}$  unidades formadoras de placa (u.f.p.). La placa con la mezcla se incubó

durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave para promover la unión del fago con el anticuerpo.

Los fagos que no se unieron se eliminaron después de lavar con PBS-T (10 veces). Los fagos unidos al anticuerpo se efluyeron de los pozos con 100  $\mu$ l de una solución glicina-HCl 0.1N (pH 2.2). Los fagos eluidos (eluato) se recuperaron en un tubo nuevo y la mezcla se neutralizó con 35  $\mu$ l de 2 M de Tris-base. Los fagos se cuantificaron por infección de la cepa ER2738 de *E. coli* (New England BioLab). La bacteria se creció en caldo Luria hasta la fase estacionaria (18 horas), 200  $\mu$ l del cultivo se mezcló con 1  $\mu$ l del eluato, después de tres minutos de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se agregó a 4 ml de agarosa-top (fundida y mantenida a 55 °C), para posteriormente verter a una placa con agar LB/x-gal/IPTG. El número de placas obtenidas se utilizó para calcular el número de fagos en u.f.p. Para continuar con la segunda ronda, el eluato obtenido se amplificó de acuerdo al Manual Ph.D.-12TM de New England BioLabs; Un 75% del eluato se agregó a 30 ml del cultivo ER2738 (en fase log temprana) y se incubaron a 37 °C con agitación vigorosa por 4.5 horas. Después de este tiempo el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 6,000 g a 4 °C (Sorvall RC), el sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar con las condiciones antes mencionadas para garantizar la eliminación de las bacterias. Todo el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, el cual contenía  $\frac{1}{4}$  de volumen de 20% (v/v) de polietilenglicol (PEG) con 40% (w/v) NaCl (PEG-NaCl); se agitó suavemente y se dejó precipitar a 4 °C durante toda la noche.

El precipitado obtenido se centrifugó durante 10 minutos a 6,000 g, el sobrenadante se eliminó y el botón se resuspendió en 1ml de PBS para realizar una segunda centrifugación. El nuevo sobrenadante se volvió a precipitar utilizando  $\frac{1}{4}$  de volumen de PEG-NaCl, después de mezclarlo se dejó precipitar en hielo durante una hora a 4 °C, nuevamente se realizó una centrifugación con las mismas condiciones

antes referidas, finalmente se suspendió el botón obtenido en 0.02% de azida de sodio en PBS. Para asegurarnos de solo tener fagos, el tubo se volvió a centrifugar con las mismas condiciones durante cinco minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo para ser almacenado a 4 °C. Se cuantificó el número de fagos como anteriormente mencionamos. Una concentración de  $10^{12}$ - $10^{13}$  u.f.p de la amplificación de la primera ronda se utilizó para realizar la bioselección de la segunda ronda, el mismo procedimiento se realizó para una tercera ronda, en ésta último se incremento la astringencia, realizando los lavados con Tween 20 (5%) en PBS.

### VI.10 Amplificación de Clonas

Para conocer las secuencias de las clonas seleccionadas (fagotopos), los fagos obtenidos en la segunda ronda (en el caso de la bioselección con la IgG de conejo anti-Pic) y de la tercera ronda (IgG de humanos e IgG de conejos anti-Pet y anti-Pic) se cuantificaron sin realizar su amplificación. Un volumen de 10 µl del segundo o tercer eluato con aproximadamente 100 u.f.p. se mezclaron con 200 µl del cultivo en fase logarítmica de la cepa de *E. coli* ER2738, durante 3 minutos, la mezcla se vació a cajas Petri que contenían agar luria con x-gal/IPTG. Se incubó durante toda la noche a 37 °C. El cultivo con un menor número de placas se seleccionó para poder realizar la extracción al azar de 18 u.f.p. utilizando una punta de 200 µl para micropipeta previamente estilizada. Cada una de las placas seleccionadas se colocaron en tubos con 3 ml de medio 2xYT con 50 µl del cultivo en fase logarítmica de la cepa de *E. coli* ER2738 (de acuerdo al Manual Ph.D.-12TM de New England BioLabs). Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación 200 r.p.m. durante 4.5 horas, posteriormente se transfirieron a dos tubos de 1.7 ml, y se centrifugó 30 s a 14, 000 g., para clarificarlo. El sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones para después pasar el sobrenadante a dos tubo; uno de ellos se almacenó a 4 °C y el segundo se utilizó para realizar la purificación del

DNAss de cada una de las clonas seleccionadas (Sambrook y cols. 2001). A este tubo se le agregaron 400  $\mu$ l de PEG- $\text{Na}_2\text{Cl}$ , para precipitar los fagos por 10 minutos a  $-20^\circ\text{C}$ . La solución se centrifugó por 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Los fagos precipitados se resuspendieron con 100  $\mu$ l de amortiguador de yoduro (1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 4M NaI) y se le agregaron 250  $\mu$ l de etanol. La solución se incubó por una hora en hielo a  $4^\circ\text{C}$  para precipitar el DNA. Posteriormente, la mezcla se centrifugó por 10 minutos y el botón obtenido se lavó con 70% de etanol y se secó en vacío por 10 minutos. El botón se resuspendió en 15-20  $\mu$ l de agua inyectable. El DNAss obtenido se visualizó sometiéndolo a un campo electroforético utilizando un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

#### **VI.11 Secuenciación de DNAss de las Clonas**

Con el DNAss obtenido de cada clona se determinó la secuencia de la región 5' del gen pIII utilizando el iniciador (5'- CCAGACGTTAGTAAATG-3') y el kit de T7 Sequenasa<sup>TM</sup> (Amersham, USA), para esto se emplearon dideoxinucleótidos marcados radioactivamente con  $^{35}\text{S}$ . Siguiendo las indicaciones del kit, en un tubo de microcentrifuga de 1.6 ml se colocaron 1  $\mu$ l del iniciador, 10  $\mu$ l de DNAss y 2 $\mu$ l del buffer de alineamiento (1 M Tris-HCl pH 7.6, 100 mM  $\text{MgCl}_2$  y 160 mM DTT). La mezcla (DNAss-iniciador) se incubó en un termoblock a  $70^\circ\text{C}$  por 2 min, se retiró y se esperó a que la temperatura descendiera a  $37^\circ\text{C}$ . Por otro lado, se preparó la mezcla de reacción la cual contiene DTT,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{S}^{35}$  y la enzima T7 sequenasa, esta mezcla se adiciona a la de DNAss-iniciador y después de cinco minutos a  $37^\circ\text{C}$  se adicionó a un tubo que contenía cada nucleótido (A, G, C y T), incubándolo bajo las mismas condiciones. Después de este tiempo, la reacción se detuvo adicionando 4  $\mu$ l de la solución de paro (0.3% de azul de bromofenol y xileno, 10 mM de EDTA [pH 7.5] y 97.5% de formamida ionizada), los tubos se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Para obtener la secuencia de los péptidos, se realizó un gel de poliacrilamida al 6%, en cada pozo se colocaron las muestras de los tubos de reacción (cuatro tubos por secuencia, un nucleótido por tubo), la separación se realizó a 60 W. El gel se secó a 80 °C en vacío (1 h), y posteriormente el gel se expuso a una placa radiográfica por espacio de dos días para finalmente realizar el revelado de la misma.

### **VI.12 Afinidad de los Mimotopos a los Anticuerpos**

La reactividad de las clonas de fagos seleccionadas contra las diferentes IgG se evaluó en un ensayo de ELISA indirecta. El procedimiento inicial fue el mismo utilizado para el biopanning, los pozos de una placa (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp F96, NUNC, Dinamarca) se cubrieron con 5 µg/ml de las diferentes IgG utilizadas en el ensayo de bioselección, diluidas en 0.2% (w/v) de BSA en PBS-T. Las placas se incubaron toda la noche a 4 °C, al siguiente día se lavó con PBS-T y los espacios libres se bloquearon con 200 µl PBS-BSA durante 2 h a TA; después de cinco lavados con PBS-T se adicionaron 200 µl de PBS que contenían  $1 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$  u.f.p. de las diferentes clonas amplificadas anteriormente. La reactividad IgG-fago fue identificada con el anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:5000 (New England Bio Labs, USA). La cantidad de anticuerpo secundario unido fue estimado por la adición del sustrato ABTS (Sigma-Aldrich, USA) incubando a 37 °C por 20 min, la placa se leyó a 405 nm en un lector de ELISA (MR580, Dynatech). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

### VI.13 Anticuerpos Anti Mimotopos

Ratones C57BL de 3-4 semanas de edad, fueron desafiados con los fagotopos seleccionados utilizando el esquema de inmunización descrito por Galfre y cols. (1996), con algunas modificaciones propuestas por Gazarian y cols. (2005). Concentraciones de  $10^{11}$ - $10^{12}$  u.f.p. de cada uno de los fagotopos individuales en 100  $\mu$ l de PBS o la combinación de fagos obtenidos en la tercera ronda de la bioselección, se administraron vía intraperitoneal en tres ocasiones con intervalos de 15 días cada dosis. Doce días después de la última inmunización, y previa anestesia de los ratones se realizó punción cardiaca para la obtención de sangre. Previamente se tomaron muestras de sangre una antes de la primera inmunización (suero preinmune), y otras dos después de segunda y tercera dosis de inmunización, estas se tomaron a través de una pequeña incisión en el tercio medio de la parte ventral de la cola. Los experimentos con animales fueron desarrollados de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 (técnica específica para la producción, cuidados y uso de animales de laboratorio).

La reactividad de los anticuerpos anti mimotopos contra las proteínas Pet y Pic, se analizó en un ensayo de ELISA, de acuerdo a lo previamente descrito, con las siguientes modificaciones: en el ensayo, además de utilizar las proteínas Pet y Pic, se incluyó EspC, los sueros de ratones se diluyeron 1:100 en PBS-T con 0.2% de BSA. Como controles positivos se utilizaron anticuerpos anti-Pet, anti-Pic y anti-EspC producidos en conejos a una dilución 1:100. Para identificar la reacción antígeno-anticuerpo, se utilizó como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o de conejo (1:1000) marcados con fosfatasa alcalina (Zymed, USA); la reacción fue visualizada como se describió previamente.

#### **VI.14 Péptidos Sintéticos**

La reactividad de los sueros de ratones inmunizados con los fagotopos portadores de las secuencias PQPxK y PGxI/LN, se analizó contra dos péptidos P1 (TYPGYINHSKAS) y P2 (ILLPQPPKLLLP) diseñados por nosotros y sintetizados por la compañía Biosynthesis (Lewsville, Texas), los péptidos sintéticos (P1 y P2). Se utilizó el ensayo de ELISA como se describió previamente, pero en esta ocasión se fijaron a la placa diferentes concentraciones de los péptidos (1 a 10 µg/ml) disueltos en amortiguador de carbonato 0.2M, pH 9.5. Las placas con las diferentes concentraciones de los péptidos se incubaron toda la noche (4 °C), concluido el periodo de incubación se bloquearon los espacios libres con BSA 2% en PBS (w/v), posteriormente se lavo en tres ocasiones con PBS-T y se agregaron los diferentes sueros a cada uno de los pozos a una dilución 1:100 en PBS-BSA. La detección del complejo antígeno-anticuerpo se realizó agregando anti-IgG de ratón (1:1000), marcados con fosfatasa alcalina y utilizando como sustrato p-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich, USA). Como en los casos anteriores, el ensayo se realizó por duplicado.

#### **VI. 15 Alineamiento y Ubicación de las Secuencias de Aminoácidos de los Mimótopos Seleccionados**

Con el programa bioinformático Clustal W versión 1.83 (Thompson y cols. 1994), se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos identificadas en los fagotopos seleccionados, contra las secuencias de SPATEs de los grupos I y II. Los números de acceso al NCBI de todas ellas se muestran en la Tabla 7. Con el programa Modeller 9v2 (Sali y cols. 1994) se elaboró un modelo tridimensional de Pet con el programa Pymol se procedió a identificar en que sitios de la estructura terciaria se localizaban las secuencias consenso seleccionadas.

## **VI.16 Participación de las Secuencias Identificadas Como Motivos Funcionales**

Para conocer si las secuencias identificadas eran motivos funcionales de Pet se realizaron ensayos de neutralización de la actividad de degradación de la espectrina y del efecto quimioattractante sobre macrófagos inducidos por Pet.

### **VI.16.1 Inhibición de la Degradación de Espectrina**

La degradación de espectrina se realizó utilizando membranas de eritrocitos de carnero. Brevemente, 25 ml de sangre se lavaron tres veces con PBS, una vez obtenidos los eritrocitos se resuspendieron en solución isotónica de amortiguador de fosfatos de sodio (310 mosM), mismo que se utilizó para lavar los eritrocitos tres veces, el paquete celular se obtuvo por centrifugación a 1,000 g por 10 min (Villaseca y cols. 2000). Los eritrocitos obtenidos se incubaron con una solución de fosfatos de sodio (20 mosM), por 10 min, a 4 °C. Las células tratadas se centrifugaron a 20,000 g por 40 min a 4 °C, las membranas celulares se depositaron en el fondo del tubo y después de resuspenderlas se lavaron en tres ocasiones con el mismo amortiguador y se recuperaron por centrifugación (20 min) en las mismas condiciones (20,000 g). Las membranas obtenidas se resuspendieron en el mínimo volumen posible con el amortiguador hipotónico. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) y se congelaron a -70 °C hasta su uso.

Para el ensayo de neutralización la toxina Pet (50 µg/ml) se incubó (3 h) con el suero de ratones inmunizados con los mimotopos que contienen los motivos PDDSS (SPic-6) o PGxI/LN (SPet-3), siguiendo el procedimiento descrito por Villaseca y cols. (2000). Posteriormente la mezcla de reacción en un volumen de 100 µl, el cual contenía 10 µg de membranas de eritrocitos y la toxina previamente neutralizada con el anticuerpo, se incubó a 37 °C durante seis horas, la reacción se paró con el buffer de

Laemmli. El efecto se analizó separando las proteínas de la mezcla de reacción en SDS-PAGE al 6%, y posteriormente transfiriéndolo a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, USA). Para visualizar si la degradación de la espectrina era inhibida se utilizaron anticuerpos anti-alfa y beta espectrina (0.58 mg/ml) producidas en conejo (Sigma Aldrich, USA). La unión del anticuerpo se evaluó al adicionar anti IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina y el sustrato BCIP/NBT. Como control negativo se utilizaron membranas de eritrocitos sin tratar, el control positivo fueron membranas de eritrocitos tratadas con Pet sin neutralizar.

### VI.16.2 Inhibición de la Quimiotaxis

De 10 ml de sangre periférica, obtenida de donadores sanos diluidos en dos volúmenes de PBS se obtuvieron células mononucleares (MN). A la muestra de sangre diluida, se le agregaron a 4 ml de un gradiente de Ficoll ( $\delta=1.077$  Sigma Aldrich USA). Las muestras se centrifugaron (500 g, 30 min, 18 °C) y las células que se localizaban en la interfase del gradiente (MN) se colectaron y lavaron tres veces con solución Gey's (NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, 6 zH<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, Glucosa, Albúmina, pH 7.0). Las células obtenidas se diluyeron en 2 ml de la misma solución Gey's, la cuantificación de la misma se realizó en una cámara de Neubauer, colocando 100 µl de las células diluidas 1:100 en solución Gey's teñidas con azul de tripano.

Para el ensayo de quimiotaxis se utilizaron cámaras de Boyden de doble filtro (Neuro-probe Inc, Gaithersburg MD, USA), se empleo para la cámara superior un filtro de policarbonato con un poro de 5 µm y 13 mm de diámetro (Neuro-probe Inc, Gaithersburg MD, USA), una membrana de nitrato de celulosa con poro de 8 µm (Sartorius Stedim biotech. Aubagne Cedex, Fance), fue colocada en la parte inferior que es la receptora de las células migratorias. Una suspensión de  $5 \times 10^6$  MN en solución Gey's-

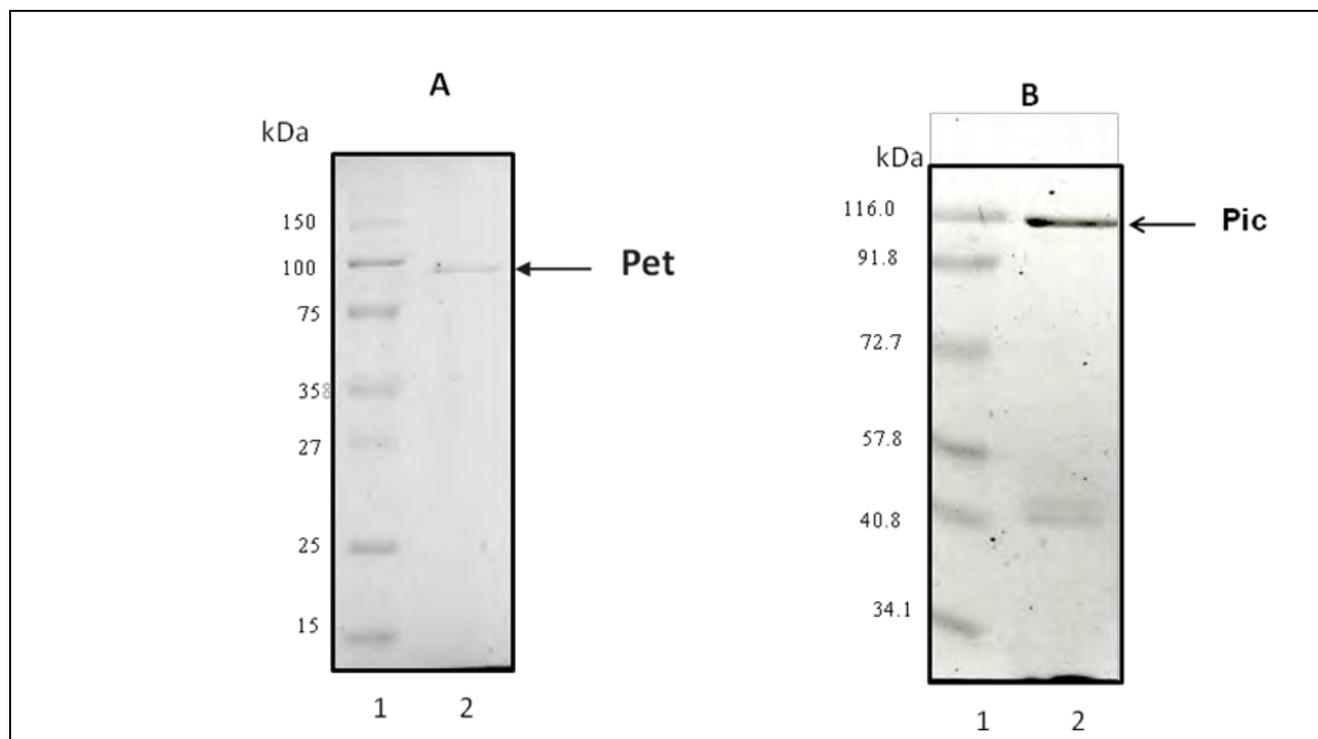
Albúmina (500  $\mu$ l), se colocaron en la parte superior de la cámara, en la parte baja de la misma se agregaron 20  $\mu$ g de Pet previamente neutralizada por tres horas a 37 °C con anticuerpos anti Pet o anti PDDSS (SPic-6) o PQ/HPxK (SP3-7) o PGxI/LN (SPet-1) (Tablas 3, 5 y 7).

Como control positivo se utilizaron suero activado con zimosan (SAZ) o Pet (20  $\mu$ g) y como control negativo la solución Gey's. La cámara se incubó 90 min a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%), después de este tiempo, se desmontó y los filtros fueron removidos. Las células que se unieron al filtro de la cámara baja se fijaron con etanol al 80% (v/v), se tiñeron con hematoxilina-eosina y se fijaron a un porta objeto con resina sintética 60% diluida en xilol (v/v). La migración de células MN fue evaluada por inspección visual utilizando un microscopio de luz a 400X. Se contaron diez campos por filtro y la movilidad se calculó como el número de células que migraron a la cámara baja. Las lecturas fueron hechas por dos observadores y el ensayo se realizó por duplicado, en experimentos por separado.

## VII. RESULTADOS

### VII.1 Purificación y Secuencia N-Terminal de Pet y Pic.

Para el estudio era importante trabajar con las proteínas puras (Pet y Pic). En el proceso de purificación con la columna de Q-sepharose, ambas proteínas (Pet y Pic) se recuperaron en el segundo pico de elución, con algunas proteínas de bajo peso molecular. Para obtener una proteína pura las fracciones de cada proteína se sometieron a otra cromatografía utilizando FPLC con una columna Mono S HR5/5, en ésta las proteínas (Pet o Pic), se retuvieron en la matriz de la columna y fueron liberadas aumentando la fuerza iónica. Las fracciones se analizaron por SDS PAGE, en este se observó la presencia de una sola banda correspondiente a las proteínas Pet ó Pic según el caso. Para confirmar la identidad de las proteínas se realizó un ensayo de Western blot utilizando anticuerpos policlonales de conejo (anti-Pet ó anti-Pic), el resultado mostró una reacción específica con las fracciones de 104 kDa ó 110 kDa correspondiente a cada proteína (Pet ó Pic) respectivamente (Fig. 4).



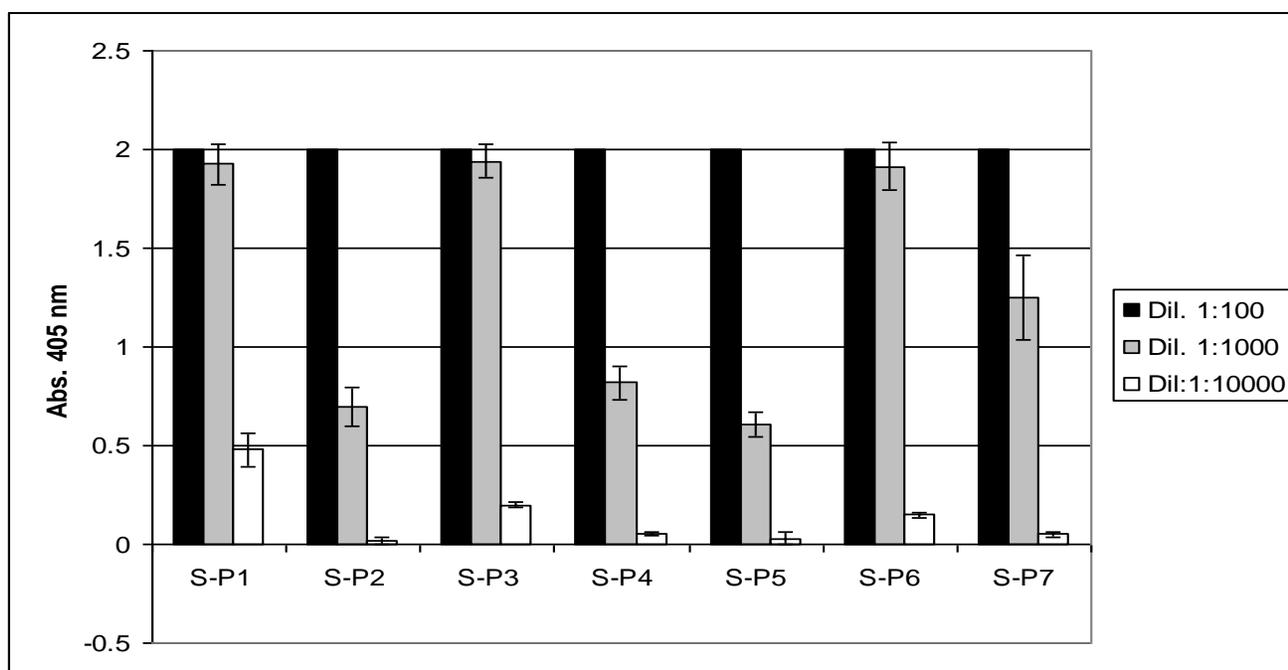
**Figura 4. Purificación de las Proteínas Pet y Pic, por FPLC.** Las proteínas Pet (A) y Pic (B) fueron purificadas del sobrenadante del cultivo de las clonas mínimas HB101 (pCEF1) y HB101 (P56) respectivamente. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio, esta fracción se pasó a través de una columna de Q-sepharose y la fracción enriquecida con la proteína Pet o Pic fue aplicada a una columna Mono S HR 5/5 en un sistema de FPLC. El perfil de elución fue analizado por un ensayo de Bradford y SDS-PAGE al 8%. En el carril 1. Marcador de pesos moleculares y en el carril 2 se presenta una fracción purificada por FPLC de Pet (A) o Pic (B).

La identidad de ambas proteínas se confirmó al obtener la secuencia de aminoácidos por el método de degradación de Edman. El resultado reportado mostró las secuencias ANMDISKAWARDYLDLAQN y AIVRSDIAYQIYRDFAXN que corresponden a las deducidas de las secuencias de bases reportada para Pet y Pic previamente (Eslava y cols. 1998; Henderson y cols. 1999).

## VII.2 Selección de Sueros de Niños Infectados

El primer paso para la bioselección de mimotopos de Pet y Pic, consistió en seleccionar sueros de pacientes infectados que mostraron mayor reactividad contra ambas toxinas. De las 21 muestras de suero analizadas, se encontró que en el ensayo de ELISA, nueve (43%) reaccionaron a Pet y Pic y 15 (74%) en el western blot. La correlación entre ambas pruebas, reportó siete sueros (S-P1, S-P2, S-P3,

S-P4, S-P5, S-P6 y S-P7) con reacción positiva. Al evaluar el nivel de respuesta de los siete sueros, se encontró en tres (S-P1, S-P3, S-P6) una lectura de 2.0 DO a la dilución de  $10^{-3}$  (Fig. 5), de los cuatro restantes uno (S-P7) dio una lectura de 1.2 DO a la misma dilución ( $10^{-3}$ ) y  $< 1.0$  DO los otros tres (S-P2, S-P4, S-P5). Con estos resultados se decidió utilizar para la bioselección los sueros S-P1, S-P3 y S-P7.

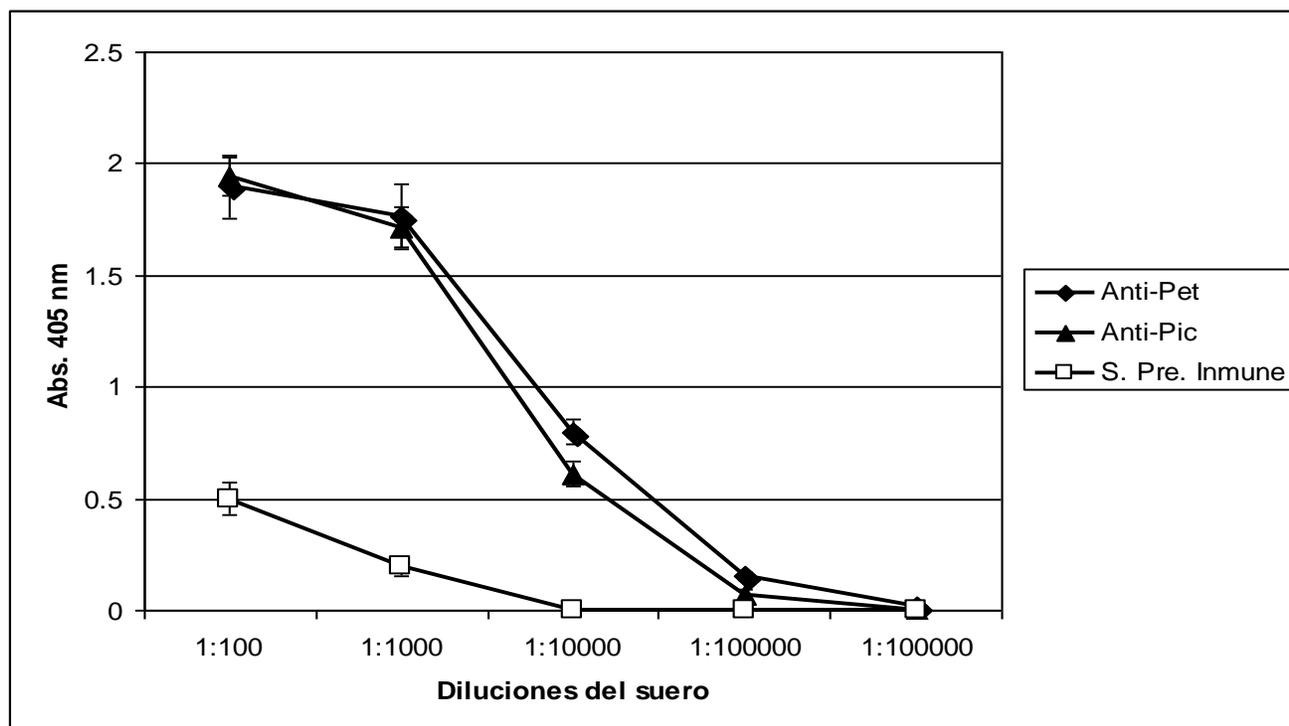


**Fig. 5. Reactividad de los Sueros de Niños Contra Pet.** Una placa de 96 pozos fue cubierta con  $0.8 \mu\text{g}$  de la proteína Pet. El suero de los niños a tres diferentes diluciones: 1:100 (barra negra), 1:1000 (barra gris) y 1:10000 (barra blanca) fue adicionada a los pozos, para evaluar la respuesta del suero contra la proteína Pet. La reacción fue visualizada utilizando un anticuerpo anti-IgG de humano marcado con peroxidasa.

### VII.3 Reactividad del Suero de Conejo

Para evaluar si la selección de mimotopos se daba de igual forma utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína nativa (Suero de pacientes), o contra la proteína desnaturalizada, se evaluó la reactividad de sueros de conejo inmunizados contra Pet y Pic. La respuesta en el ensayo de ELISA fue

similar a la que se observó con el suero de pacientes obteniendo lecturas de 1.8 DO a la dilución de  $10^3$ , aunque con lecturas de DO menores (0.8 con Pet y 0.6 con Pic) se observó respuesta a la dilución de  $10^4$  (Fig. 6). Con respecto al ensayo de western-blot la respuesta de ambos sueros fue positiva hasta una dilución 1:3200.



**Fig. 6. Reactividad de los Sueros de Conejo anti-Pet y anti- Pic.** En un ensayo de ELISA, utilizando una concentración de 0.8  $\mu$ g de Pet o Pic purificadas se colocó en una placa de 96 pozos, los sueros: anti-Pet ( $\blacklozenge$ ), anti Pic ( $\blacktriangle$ ) o el suero Preinmune ( $\square$ ) utilizando diluciones 1:100 hasta 1:1000000. Para visualizar la reacción se utilizó anti IgG de conejo marcada con peroxidasa.

#### VII.4 IgG de los Sueros de Pacientes y de Conejos

Debido a que se contaba con un volumen aproximado de 500  $\mu$ l de cada uno de los sueros S-P1, S-P3 y S-P6 solo se pasaron por la columna de afinidad (Proteína G-agarosa), obteniendo 0.7 mg, 0.56 mg y 0.57 mg de cada uno de los sueros respectivamente. En el caso de los sueros de conejo, se realizó primeramente la precipitación con sulfato de amonio y posteriormente se purificaron las IgG con la

columna de afinidad. El volumen de trabajo fue de 35 ml de suero y al final la concentración de IgG fue de 19.6 mg, con el suero anti-Pet (IgG-Pet) y 17.5 mg, con el de anti-Pic (IgG-Pic).

### **VII.5 Bioselección de Péptidos Mimotopos**

El propósito en nuestro estudio se dirigió a la identificación en las toxinas Pet y Pic, de algún sitio con características de inmunodominancia para lo que fueron utilizadas las IgGs previamente purificadas. Se realizaron tres o cuatro rondas de bioselección de acuerdo a la selección de fagos con secuencias consenso (mimotopos) de motivos inmunodominantes de Pet o Pic. Los eluatos obtenidos en la última bioselección mostraron títulos de aproximadamente  $10^5$  u.f.p. (unidades formadoras de placas). Del total de placas lisogénicas obtenidas, se seleccionaron 18 clonas, que se utilizaron para la identificación de la secuencia de aminoácidos de los péptidos mimotopos.

### **VII.6 Secuencia de Aminoácidos de los Péptidos Mimotopos**

De las 18 clonas seleccionadas con la IgG-P1 se obtuvo en un primer ensayo la secuencia de siete de ellas y ocho más en uno posterior. El análisis de las 15 secuencias mostró en tres (20%), la secuencia PPxPY, sin embargo, en las 12 restantes no se identificaron secuencias compartidas (Tabla 2). Por la baja frecuencia en la que se identificaron secuencias compartidas (20%) en los fagotopos seleccionados con la IgG del paciente 1, estas no corresponden a un sitio inmunodominante por lo que no fueron considerados para el resto del estudio.

**Tabla 2 Secuencia de Aminoácidos y Frecuencia de los Fagos Seleccionados por IgG-P1**

Clona	Secuencia de aminoácidos*											Frecuencia**	
P1-1	T	P	P	Y	P	Y	A	R	T	P	P	P	2/15
P1-2	H	P	P	F	P	Y	I	K	P	T	P	F	1/15
Secuencia común											3/15 (20%)		
	P	P	x	P	Y								
P1-3	W	H	W	S	L	W	R	P	P	Y	T	L	1/15
P1-4	N	W	T	T	W	W	Q	P	Q	M	P	R	1/15
P1-5	N	R	K	P	L	M	S	S	F	Y	T	R	1/15
P1-6	L	P	N	P	Y	P	Q	P	S	K	V	L	1/15
P1-7	H	H	Y	I	S	I	W	P	G	L	N	H	1/15
P1-8	A	V	F	D	Y	L	S	P	P	G	P	A	1/15
P1-9	S	P	H	T	T	P	M	Q	M	L	A	H	1/15
P1-10	A	V	F	D	Y	L	S	P	P	G	V	T	1/15
P1-11	A	E	F	P	S	L	K	K	P	M	R	L	1/15
P1-12	G	T	K	Y	L	Q	S	L	P	R	T	K	1/15
P1-13	V	H	W	R	W	W	D	Q	R	V	P	M	1/15
P1-14	S	D	L	Y	H	K	F	P	Q	I	I	M	1/15
Sin secuencia consenso											12/15 (80%)		

\*Las secuencias de aminoácidos se determino manualmente con el Kit T7 secuenaasa.

\*\* Número de clonas de fagos que presentan la secuencia.

En 10 de las clonas (56%) seleccionadas con la IgG-P3 se identifico la secuencia P<sub>x</sub>P<sub>x</sub>K, por el hecho de que la frecuencia de la misma se encontraba en los límites para ser considerada como mimotopo, se realizó la selección y secuenciación de otras 18 clonas, de ellas se obtuvo la secuencia de 16 (88 %). Al analizar la secuencias de las 26 clonas, 19 (73%) de ellas se obtuvo la secuencia PQ/HP<sub>x</sub>K, con la prolina como aminoácido común y glutamina en la siguiente posición (PQP<sub>x</sub>K), como se muestra en la tabla 3. Para verificar que IgG-P3 reconocía a los péptidos unidos al fago, cada una de las clonas seleccionadas se amplificó y en forma individual se evaluó su reactividad. Los resultados del ensayo de ELISA mostraron que las clonas con las secuencias consenso reaccionaron con mayor intensidad que las que no la presentaban (Tabla 3). Este resultado indica que los péptidos con la secuencia PQ/HP<sub>x</sub>K son mimotopos de Pet.

**Tabla 3 Secuencia de aminoácidos, frecuencia y afinidad de los fagotopos seleccionados por IgG-P3**

Clona	Secuencia de aminoácidos*														Frecuencia **	ELISA** *		
P3-1					I	L	L	P	Q	P	P	K	L	L	L	P	2/26	0.9 ± 0.05
P3-2		Q	L	T	V	P	T	P	Q	P	P	K	P				2/26	1.4 ± 0.02
P3-3	H	F	G	L	G	I	L	P	Q	P	P	K					2/26	0.7 ± 0.01
P3-4					S	V	E	P	Q	P	P	K	A	D	F	H	1/26	2.1 ± 0.06
P3-5					T	V	L	P	Q	P	S	K	A	L	P	L	1/26	1.8 ± 0.02
P3-6			L	P	N	P	Y	P	Q	P	S	K	V	L			1/26	1.7 ± 0.04
P3-7****					A	P	L	P	Q	P	N	K	P	H	L	F	2/26	1.9 ± 0.01
P3-8					W	S	D	P	Q	P	Q	K	P	A	Q	R	1/26	0.9 ± 0.009
P3-9					S	I	L	P	Q	P	A	K	P	N	S	E	1/26	0.7 ± 0.01
P3-10					Q	V	L	P	H	P	T	K	A	E	H	F	1/26	1.6 ± 0.04
P3-11					L	V	L	P	H	P	T	K	M	I	E	S	1/26	0.7 ± 0.02
P3-12			A		M	P	I	P	H	P	P	K	P	R	T		2/26	0.7 ± 0.01
P3-13					I	V	K	P	V	P	P	K	P	R	T		1/26	1.1 ± 0.01
Secuencia consenso											<b>P Q/H P x K</b>	19/26 (73%)						
P3-15					N	L	S	H	P	M	L	S	K	P	W	V	1/26	ND
P3-16		H	N	W	Y	T	H	L	L	P	P	K					1/26	0.9 ± 0.03
P3-14					S	Y	I	P	V	T	P	H	A	N	G	L	1/26	<0.01
P3-17		I	N	T	W	N	Y	P	T	A	N	P	H				1/26	<0.01
P3-18		S	W	Q	E	S	L	N	V	P	A	V	L				1/26	<0.01
P3-19		V	N	N	W	E	S	R	S	P	P	P	G				1/26	<0.01
P3-20		H	N	N	W	S	T	H	V	V	T	L	T				1/26	<0.01
P3-21		G	L	S	A	L	I	A	D	L	S	P					1/26	<0.01

\*Las secuencias de aminoácidos se determinó manualmente con el Kit T7 secuensa.

\*\* Número de clonas de fagos que presentan la secuencia.

\*\*\* Densidad óptica a 405nm ± Desviación estándar (Ensayo de ELISA por duplicado).

\*\*\*\* Fagotopos seleccionados para inmunizar ratones.

ND. No determinado.

El DNA de las 18 clonas seleccionadas con IgG-P6 fue secuenciado; en 15 de las clonas en un primer intento y en un segundo ensayo el de las tres restantes. El análisis mostró la secuencia P-x-x- K en 7 (39%) de las muestras ensayadas (Tabla 4). Debido a la baja frecuencia obtenida se decidió realizar una cuarta ronda de bioselección, en este nuevo ensayo se tomaron 14 clonas que se amplificaron y posteriormente su DNA fue secuenciado. El resultado obtenido nuevamente reportó la ausencia de secuencias comunes entre las 29 clonas estudiadas, aunque el análisis de aminoácidos mostró secuencias ricas con el aminoácido aromático triptófano.

**Tabla 4. Secuencia de Aminoácidos y Frecuencia de los Fagos Seleccionados por IgG-P6**

Clona	Secuencia de aminoácidos*	Frecuencia **
P6-1	E P A T P D W L T T W Q	1/18
P6-2	L E P W Q T F H P I H L	1/18
P6-3	F V M R T N D V P V Y L	1/18
P6-4	A P V P P W L T F G P V	1/18
P6-5	A V P P Y L S F L P V P	1/18
P6-6	L E P W Q T F H P I H L	2/18
Secuencia consenso		7/18 (38.8 %)
	<b>P x x L</b>	
P6-7	N H P H T N T Y Q R Y R	1/18
P6-8	K T D W T A Y S N A P F	1/18
P6-9	S K V M N P Q L I G P Y	1/18
P6-10	N A Y K P Y T T F I P I	1/18
P6-11	H H P Q H T L L L A W T	1/18
P6-12	W H Y H P W W S L P V T	1/18
P6-13	L P L T G N A P G L T P	1/18
P6-14	R R L H Y H S L N Y K H	1/18
P6-15	Y C Q P L F M A L C A R	1/18
P6-16	V S I Y P V Q G K A Y E	1/18
P6-17	S P P H L D L H P W S P	1/18
Sin secuencia consenso		11/18 (61.2 %)

\*Las secuencias de aminoácidos se determinó manualmente con el Kit T7 secuensa.

\*\* Número de clonas de fagos que presentan la secuencia.

### VII.7 Bioselección de Péptidos Mimotopos con IgG de Conejo

La bioselección de mimotopos con la IgG de conejo anti-Pet y anti-Pic, mostró que en la tercera ronda de selección cuentas de  $\sim 10^7$  u.f.p. De las placas obtenidas se seleccionaron al azar 18, para obtener las muestras de DNA y realizar su secuenciación. El resultado obtenido mostró la secuencia **P G x I/L/Y/V N** en 16 (89%) de las 18 clonas seleccionadas. La secuencia **PGxI/LN** con los aminoácidos isoleucina y leucina que presentan una cadena lateral apolar alifática se identificó en 11 (61 %) de las 16 clonas (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencia de aminoácidos, frecuencia, y afinidad de los fagotopos seleccionados por la IgG de conejo anti-Pet

Clona	Secuencia consenso*	Frecuencia **	ELISA***
Pet-1****	T Y P G Y I N H S K A S	2/18	0.5 ± 0.02
Pet-2	T I P G Y I N W R G G P	2/18	0.2 ± 0.01
Pet-3****	H H T W P G Y I N Y V	1/18	0.4 ± 0.07
Pet-4	Q G I H P Y P G Y I N H	1/18	0.6 ± 0.01
Pet-5	Q A P G W I N V P P I E	1/18	0.09 ± 0.04
Pet-6	N H Q Y Y Q V P G S I N	1/18	0.3 ± 0.06
Pet-7	T H H T S W P G Q I N S	1/18	0.1 ± 0.02
Pet-8	S H H Q N M V P G S L N	1/18	0.01 ± 0.002
Pet-9	E D Y R H S R P G R L N	1/18	0.01 ± 0.03
Pet-10	Q F P G F Y N S S P P Y	1/18	0.76 ± 0.01
Pet-11	S H T T G V P G S V N H	1/18	0.4 ± 0.04
Pet-12	M L P G W Y N S L Q S R	1/18	0.3 ± 0.02
Pet-13	T F F P S T P G P R Y T	2/18	0.3 ± 0.07
Secuencia consenso P G x I/L/Y/V N		16/18 (88.8%)	
Pet-14	H L N K D A N L S F A W	1/18	0.07 ± 0.04
Pet-15	Y L R A P P Q W L T N T	1/18	<0.01
Sin secuencia consenso		2/18 (11.2%)	

\*Las secuencias de aminoácidos se determinó manualmente con el Kit T7 secuenciadora.

\*\* Número de clonas de fagos que presentan la secuencia.

\*\*\* Densidad óptica a 405nm ± Desviación estándar (Ensayo de ELISA por duplicado).

\*\*\*\* Fagotopos seleccionados para inmunizar ratones.

La bioselección de fagotopos con mimotopos de Pic, se realizó con la IgG de conejo inmunizada con la proteína, en este ensayo de las 18 clonas de fagos seleccionadas en la tercera ronda de selección, 14 presentaban en común el aminoácido triptófano, sin embargo, ninguna mostró una secuencia compartida.

Para descartar la posibilidad de un error en el procedimiento al utilizar la biblioteca de 12 aminoácidos, se decidió utilizar una de siete aminoácidos. Esta tiene como características la presencia de cisteínas en los extremos (C7C), lo que da lugar a la formación de un asa. Después de la tercera ronda de bioselección con esta nueva biblioteca, la titulación del eluido de fagos mostró cuentas de  $\sim 10^7$  u.f.p. Los resultados de la secuenciación de las 11 de 18 clonas seleccionadas mostraron la secuencia

CxxDDSSxxC y en 7 (64 %) de ellas la secuencia CxPDDSSxC (Tabla 6). Para descartar la posibilidad de algún error en la construcción de la biblioteca de fagos, se realizó la secuencia de 9 clonas obtenidas en la segunda ronda de bioselección. En este nuevo análisis en siete (78%) de ellos se identificó la secuencia CxxDDSSxC, similar a la obtenida con los fagotopos de la tercera ronda (Tabla 6), con este resultado se confirmó que la biblioteca utilizada estaba bien construida.

**Tabla 6. Secuencia de Aminoácidos, Frecuencia, y Afinidad de los Fagotopos Seleccionados a la IgG-Pic**

Ronda	Clona	Secuencia consenso*								Frecuencia **	ELISA***		
III	Pic-1	C	N	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	M	C	1/11	1.6 ± 0.028	
III	Pic-2	C	S	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	M	C	1/11	1.4 ± 0.18	
III	Pic-3	C	S	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	T	C	3/11	0.6 ± 0.06	
III	Pic-4	C	S	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	A	C	1/11	ND	
III	Pic-5	C	V	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	T	C	1/11	0.77 ± 0.02	
III	Pic-6****	C	L	L	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	T	C	2/11	0.98 ± 0.07	
III	Pic-7	C	T	L	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	T	C	1/11	0.74 ± 0.04	
III	Pic-8	C	S	V	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	L	C	1/11	0.72 ± 0.03	
Secuencia consenso		C	x	<b>P/L/V</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	x	C	11/11 (100%)		
II	Pic-9	C	S	P	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	T	C	1/9	ND	
II	Pic-10	C	A	P	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	T	C	1/9	ND	
II	Pic-11	C	T	L	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	T	C	2/9	ND	
II	Pic-12	C	L	A	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	T	C	1/9	ND	
II	Pic-13		C	I	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	M	S	C	1/9	ND
II	Pic-14	C	A	H	R	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	C	1/9	ND	
Secuencia consenso		C	x	x	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	x	C	7/9 (77.7 %)		
II	Pic-15	C	T	Y	A	L	L	<b>S</b>	<b>S</b>	C	1/9	ND	
II	Pic-16	C	V	P	N	Y	K	N	Q	C	1/9	ND	
Sin secuencia consenso												2/9 (22.3 %)	

\*Las secuencias de aminoácidos se determinó manualmente con el Kit T7 secuencasa.

\*\* Número de clonas de fagos que presentan la secuencia.

\*\*\* Densidad óptica a 405nm ± Desviación estándar (Ensayo de ELISA por duplicado).

\*\*\*\* Fagotopos seleccionados para inmunizar ratones.

ND. No determinado.

## VII. 8 Alineamiento de las Secuencias Obtenidas con las Reportadas para Diferentes SPATEs

Se realizó el alineamiento de las secuencias consensos identificados contra las secuencias reportadas para diferentes SPATEs. El análisis con el programa Clustal W, mostró que las secuencias PGxxN y PDDSS presentes en los fagotopos seleccionados por IgG-Pet e IgG-Pic respectivamente, se localizan en la región aminoterminal de las proteasas Pet, Sat, Pic, Tsh, Hbp, SepA, SigA, EspC, EspP, Vat, AidA y Boa (Tabla 7).

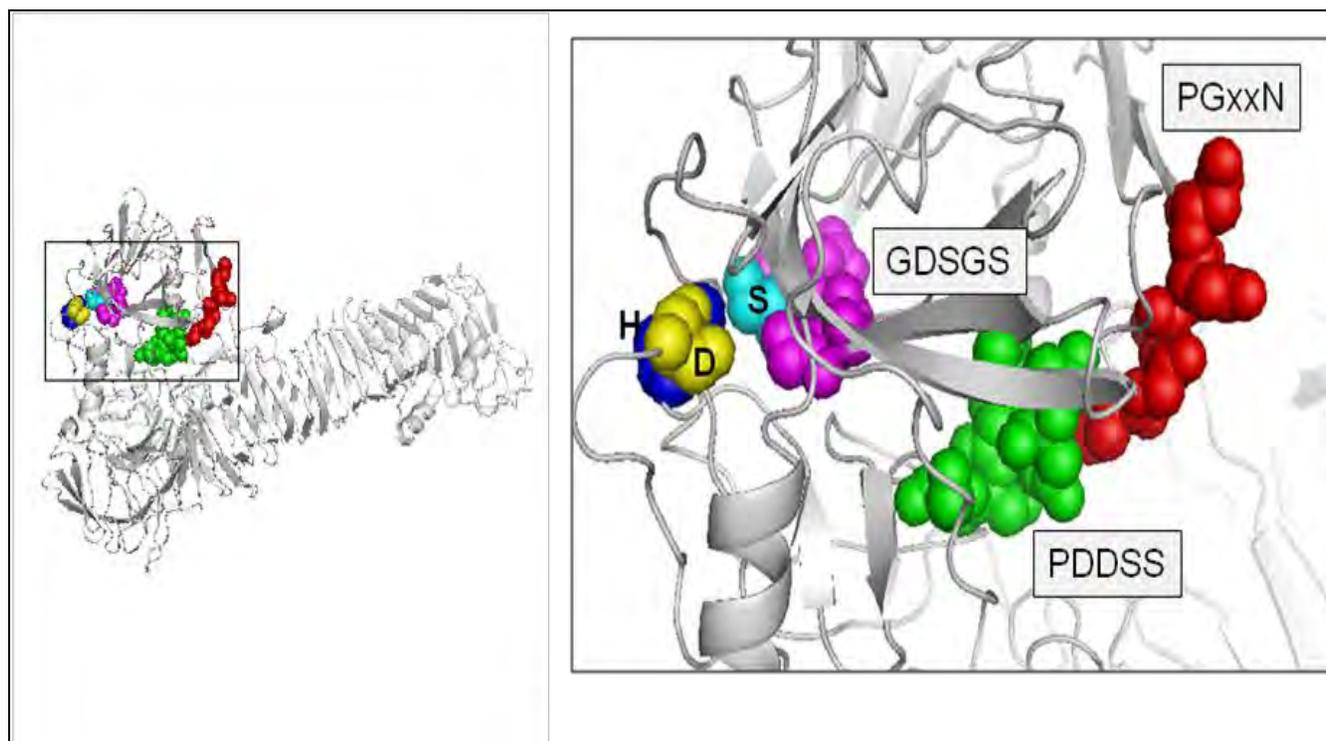
**Tabla 7. Presencia de los Motivos PGxxN y PDDSS en SPATEs de Diferentes Enterobacterias.**

SPATEs	Bacteria	Análisis de la secuencia de aminoácidos						No. de acceso NCBI
		P G X X N			P D D S S			
Pet	EAEC	73G V F Q	P G S T H	V K <sup>83</sup> .....	97L P V	P D F S S	A T A <sup>107</sup>	AAC26634
Sat	EAEC, UPEC	74G V F Q	P G S T D	V K <sup>84</sup> .....	98L P V	P D F S G	A T A <sup>108</sup>	AAN82067
Pic	EAEC <i>Shigella flexneri</i>	65G L F V	P G A N D	I P <sup>75</sup> .....	90A P M	A D F S S	V S S <sup>100</sup>	AFO97644
Tsh	UPEC, APEC	72G M F R	P G A T N	I A <sup>82</sup> .....	97A A M	P D F S A	V D S <sup>107</sup>	AAAN82067
Hbp	Human septic E. coli	62G M F R	P G A T N	I A <sup>72</sup> .....	87A A M	P D F S A	V D S <sup>97</sup>	CAA11507
SepA	<i>Shigella flexneri</i>	76G Q F T	P G T T N	I S <sup>86</sup> .....	101A P M	A D F S S	A T I <sup>111</sup>	AAL72309
SigA	<i>Shigella flexneri</i>	75G E F R	P G A T N	V Q <sup>85</sup> .....	99L P V	P D F S A	V S N <sup>109</sup>	AAP18272
EspC	EPEC	74G V F K	A G A T N	V S <sup>84</sup> .....	98V P I	P D F S P	A N K <sup>108</sup>	AAC44731
EspP	EHEC	76G I F Q	A G A T N	I E <sup>86</sup> .....	100V P F	P D F S P	V A N <sup>110</sup>	AAZ76514
Vat	APEC	65G Q F Q	A G A T N	I P <sup>75</sup> .....	90A P M	V D F S S	V N V <sup>100</sup>	ABI99757
AidA	ETEC	69G L F T	P G A T N	I A <sup>79</sup> .....	94A P M	A D F S S	A T I <sup>104</sup>	ZP_00714135
Boa	<i>Salmonella bolgori</i>	67G Q F T	P G S L N	I P <sup>77</sup> .....	92A P M	P D F S S	A N H <sup>102</sup>	AAW66606

En el análisis se identificó que la mayoría de las secuencias de SPATEs presentan prolina (PGxxN) como primer aminoácido con excepción de EspC y EspP, que tienen alanina, ambos aminoácidos hidrofóbicos. La glicina en la segunda posición fue común en todas las proteasas; la asparagina (hidrofílicos) que completa la secuencia, esta presente en la mayoría de las SPATEs con excepción de

Pet que muestra histidina y Sat al igual que Pic ácido aspártico. El mismo análisis pero con la secuencia del mimotopo PDDSS muestran nuevamente la prolina como primer aminoácido en Pet, Sat, Tsh, Hbp, SigA, EspC, EspP, Boa, alanina en Pic, SepA, AidA y valina en Vat; los tres siguientes aminoácidos ácido aspártico, fenilalanina y serina, son compartidos por todas las proteasas. El último de los aminoácidos que en el mimotopo corresponde a una serina, solo es compartido por Pet, Pic y SepA, en el resto de las proteasas es sustituido por un aminoácido hidrofóbico (prolina, glicina y alanina).

Tomando como molde la estructura descrita para Hbp (Otto y cols. 2005), se elaboro un modelo tridimensional de Pet, en este se identificó como ambas secuencias (PGxxN y PDDSS) se localizan dentro de la región globular de Pet ubicados a 11 Å del motivo GDSGSG, que es el sitio activo descrito para la enzima (Fig. 7).



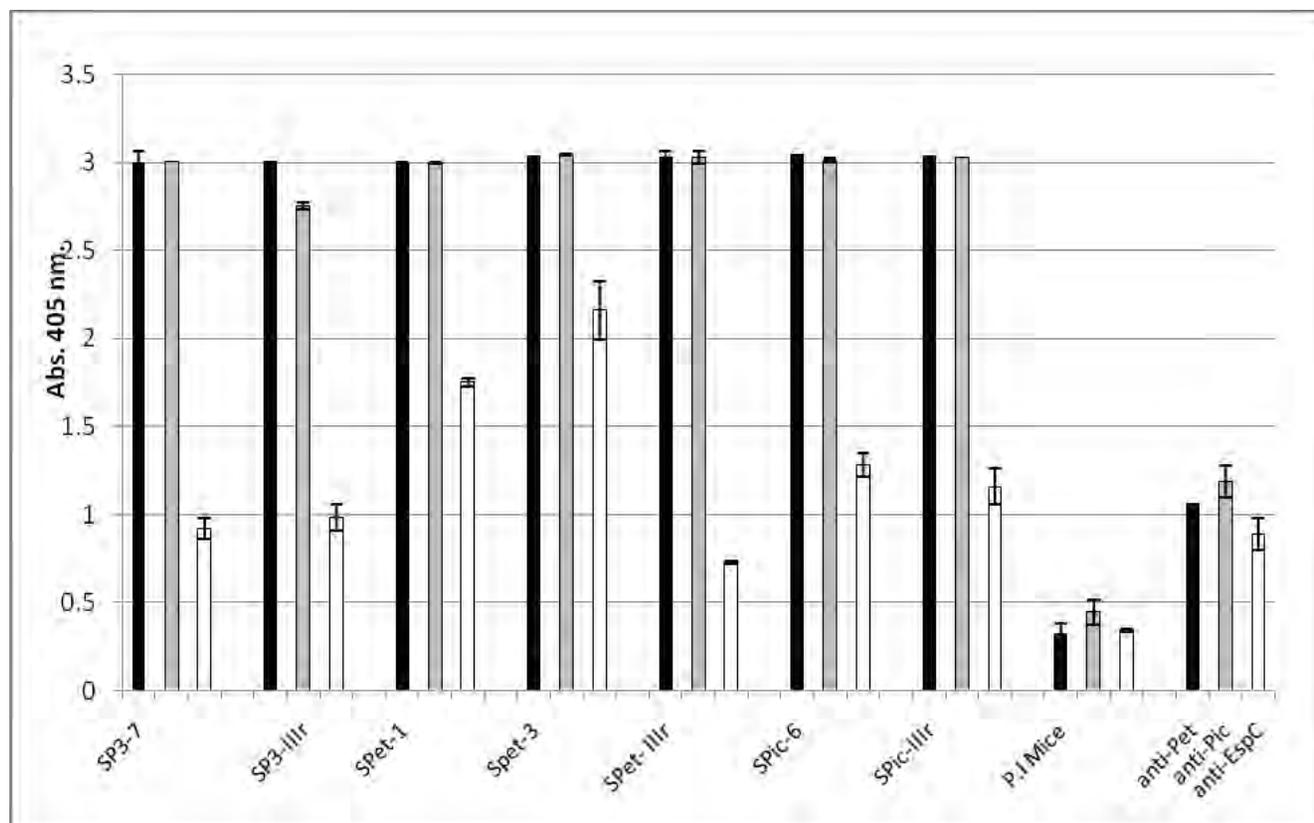
**Figura 7. Modelo Tridimensional de Pet.** Utilizando el programa Modeller 9v2 y la estructura descrita para Hbp, se obtuvo el modelo tridimensional de Pet en la que se localizaron los motivos inmunodominantes (mimotopos). Los motivos

<sup>77</sup>PGxxN<sup>81</sup> (rojo), <sup>100</sup>PDDSS<sup>104</sup> (verde) se localizaron a 11 Å de el sitio catalítico <sup>258</sup>DGSGSG<sup>262</sup> (violeta). El triad histidina<sup>124</sup> (azul), asparagina<sup>183</sup> (amarillo) y serina<sup>260</sup> (azul claro), también se muestran en el modelo.

## VII.9 Anticuerpos anti Mimotopos

Los sueros de ratones inmunizados con los fagotopos que presentaban las secuencia APLPQPKNKPHLF (clona P3-7), TYPGYINHSKAS (clona Pet-1), HHTWPGYINYV (clona Pet-3) y CLLDDSSTC (clona Pic-6) y de un ratón inmunizado con la mezcla de fagos seleccionados en la tercera ronda de bioselección, mostraron reactividad contra las proteínas Pet y Pic con una intensidad 3 veces mayor comparada a la que se obtuvo con los sueros de conejo inmunizados contra cada una de las dos proteínas (Fig. 8).

Los mismos sueros se evaluaron contra la proteína EspC, en este ensayo aunque la reactividad fue mayor que la obtenida con el suero de conejo anti EspC, no mostró los mismos niveles de intensidad observados contra las otras proteínas (Pet y Pic) (Fig. 8). El resultado obtenido confirmó que las secuencias de péptidos en los fagotopos seleccionados son mimotopos de una región inmunodominante presente en diferentes SPATEs.



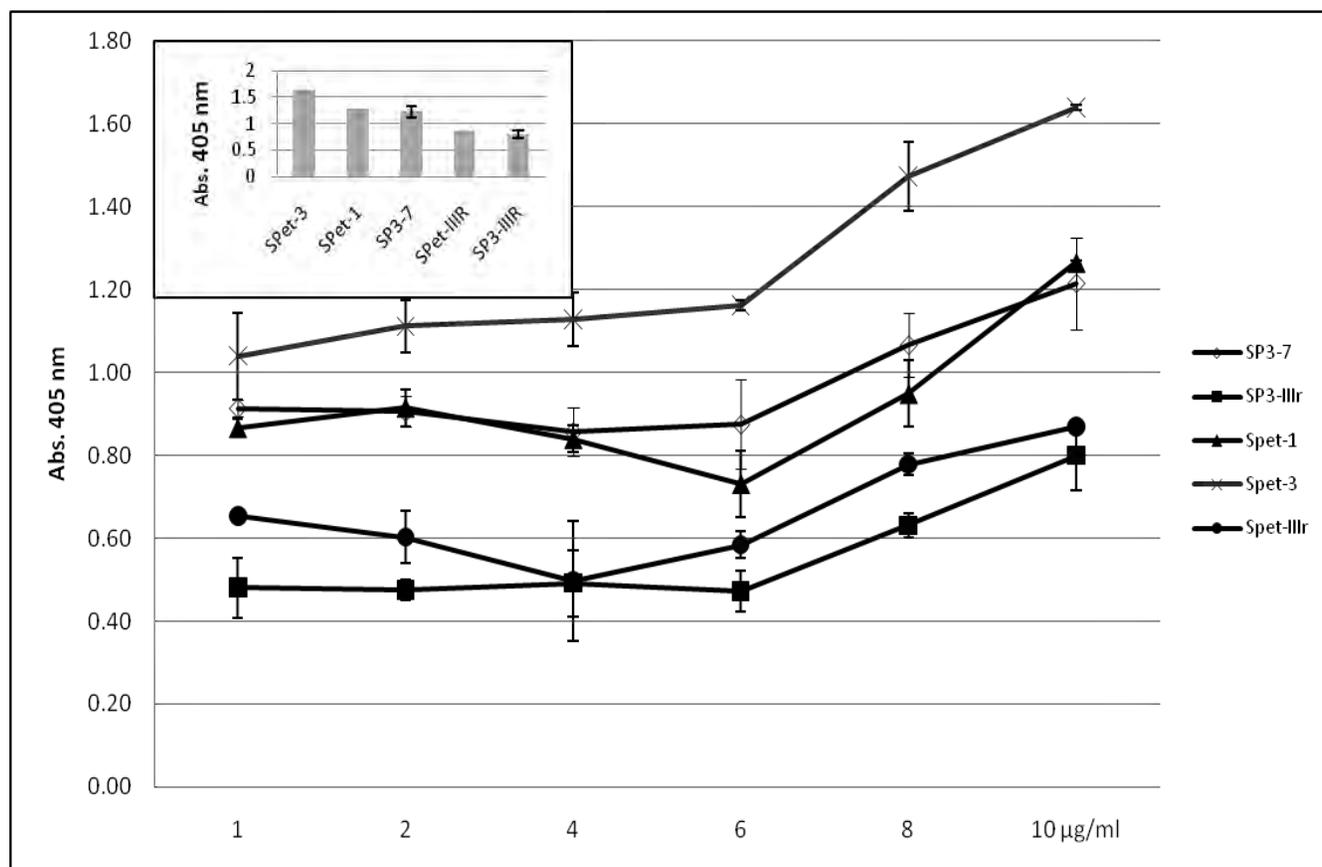
**Figura 8. Ensayo de ELISA. Reactividad de los Sueros de Ratones Inmunizados con Diferentes Fagotopos contra Pet, Pic y EspC.** Una microplaca de 96 pozos fue cubierta con 0.8  $\mu\text{g}$  de Pet (barra negra), Pic (barra gris) o EspC (barra blanca). El suero preinmune de ratón, anti-PQPxK (SP3-7, SP3-IIIr), anti-PGxI/LN (SPet-1, SPet-IIIr), anti-CxPDDSSxC (SPic-6, SPic-IIIr) obtenidos en ratón y los sueros policlonales de conejo anti-Pet, anti-Pic o anti-EspC, se adicionó a cada pozo para evaluar su reactividad con las diferentes SPATEs. La reacción antígeno-anticuerpo se evaluó con una anti-IgG de conejo o ratón marcada con peroxidasa.

#### VII.10 Reactividad de los Sueros Anti Mimotopos Contra Péptidos Sintéticos

En este ensayo, se evaluó la respuesta de los sueros de ratones inmunizados con los diferentes fagotopos contra los péptidos sintéticos TYPGYINHSKAS (P1) y LLPQPPKLLLP (P2), diseñados con la secuencia de los mismos fagotopos seleccionados (Tablas 3 y 5). El resultado mostró que los sueros SPet-1, SPet-3 y SPet-IIIr que se probaron contra el péptido P1 reaccionaban con poca intensidad a concentraciones bajas (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y hasta 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), sin embargo, en las concentraciones de 8 y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del péptido se observó incremento de la respuesta cinco veces mayor a la obtenida con el suero preinmune. Con respecto a los sueros SP3-7 y SP3-IIIr que se probaron contra el péptido P2, el

comportamiento fue similar al anterior con una respuesta discreta en las concentraciones de 1 a 6  $\mu\text{g}$  y un incremento de la misma a partir de los 8  $\mu\text{g}$  (Fig. 9).

Ambas observaciones indican que los anticuerpos generados en los ratones inmunizados con los diferentes fagotopos, reconocen al péptido que se encuentra fusionado a la proteína III y no a algún componente estructural del fago M13.

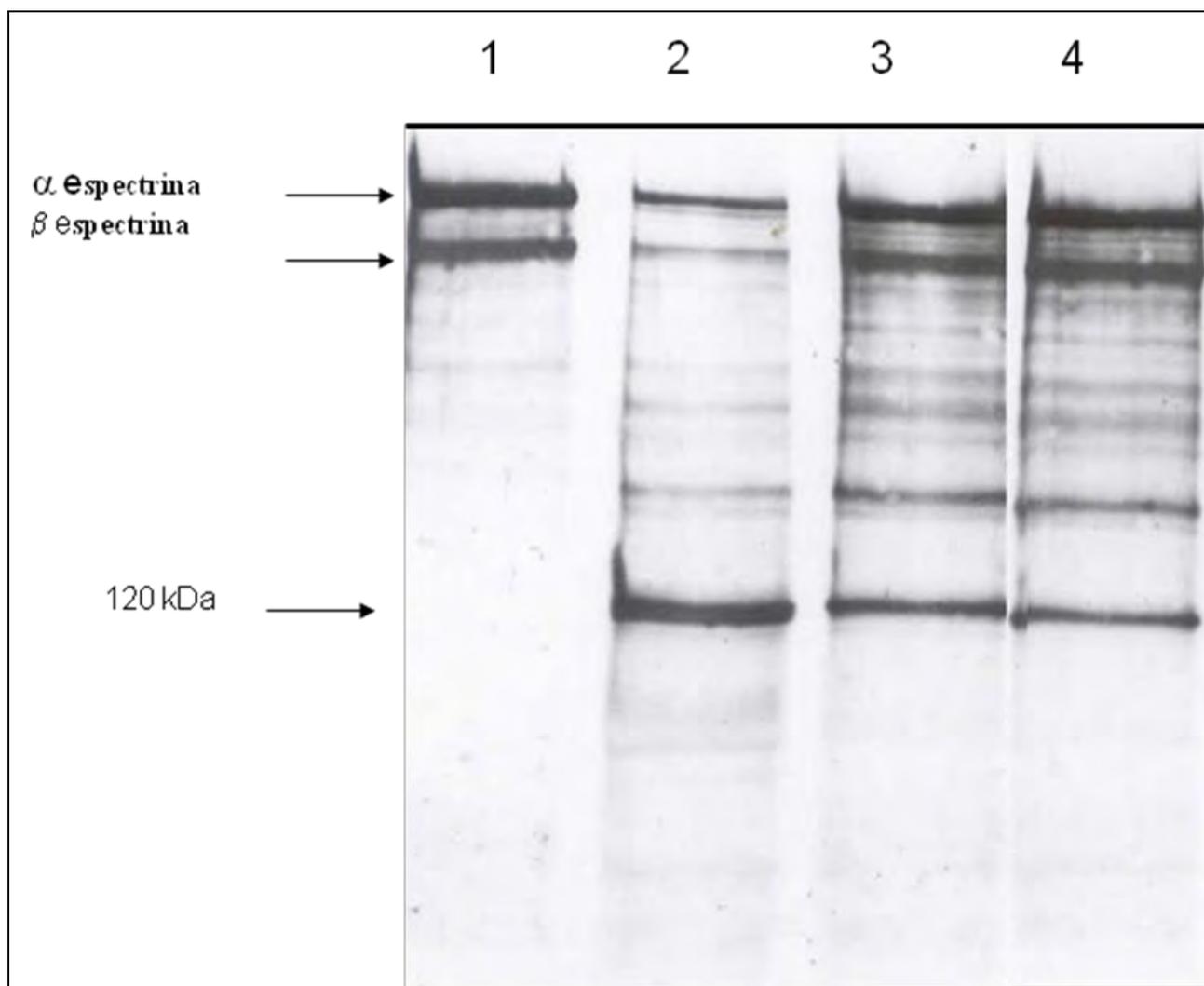


**Figura 9. Reactividad de los Sueros de Ratones Inmunizados con Diferentes Fagotopos contra dos Péptidos Sintéticos.** La reactividad de los sueros anti-PGxI/LN [SPet-1 (▲), SPet-3 (×), SPet-IIIr (●)] o anti-PQPxK [SP3-7 (◇), SP3-IIIr (■)] se evaluó contra diferentes concentraciones (1, 2, 4, 6, 8 o 10  $\mu\text{g/ml}$ ) de los péptidos sintéticos TYPGYINHSKAS (P1) o ILLPQPPKLLL (P2) respectivamente. La reactividad del suero fue homogénea a bajas concentraciones (2 a 6  $\mu\text{g/ml}$ ) y estas incrementan de 8 a 10  $\mu\text{g/ml}$  (A). SPet-3 (×) Fue el suero con la más alta reactividad a 10  $\mu\text{g/ml}$  del péptido (B). Los valores de DO del suero preinmune fueron ajustados a 0 en las diferentes lecturas

**VII.11 Participación de los Motivos PDDSS y PGxxN en la Actividad Biológica de Pet**

Por la cercanía entre los motivos PDDSS y PGxxN con GDSGSG, se consideró pertinente evaluar si uno o ambos contribuían en la actividad de degradación de la fodrina inducida por Pet.

El resultado mostró inhibición parcial de la degradación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ -espectrina (240 y 220 kDa respectivamente), el efecto se comparó contra el control de membranas sin tratar y las tratadas con Pet, en el ensayo se observó la formación de un subproducto de 120 kDa de la espectrina (Villaseca y cols. 2000), el cual mostró menor concentración en las muestras tratadas con los anticuerpos (Fig. 10).

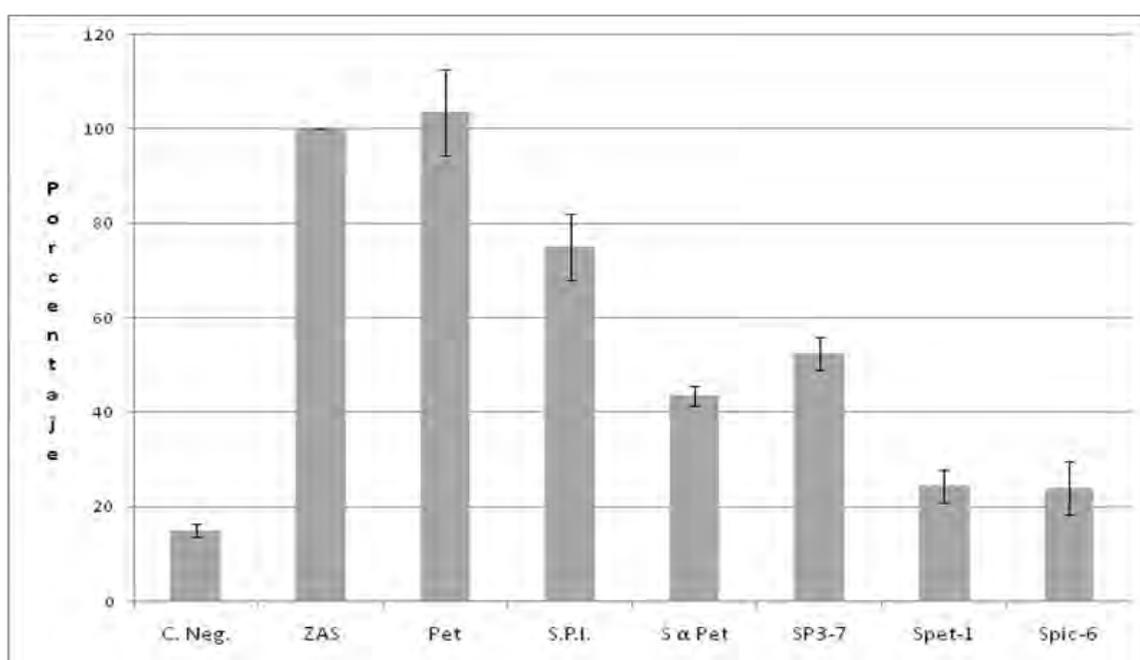


**Figura 10. Ensayo de Neutralización de la Actividad Degradante de Pet sobre Espectrina.** Inmunotransferencia de las membranas de eritrocitos tratadas con 5  $\mu$ g de Pet. La reacción fue visualizada con anti-alpha y anti-beta espectrina. Carriles: 1) Membranas de eritrocitos; 2) Membranas de eritrocitos tratadas con Pet; 3) Membranas de eritrocitos tratadas con Pet previamente incubadas con anticuerpos anti-CxPDDSSxC, 4) Membranas de eritrocitos tratadas con Pet previamente incubadas con anticuerpos anti-PGxI/LN. Un decrecimiento parcial de la degradación de  $\alpha$  y  $\beta$  espectrina es observada con ambos anticuerpos.

En un estudio preliminar (Eslava y cols. 2003), observaron que Pet induce quimiotaxis sobre macrófagos y polimorfonucleares, efecto no relacionado con el motivo de serin proteasa (GDSGSG).

En el ensayo de inhibición de la actividad quimioattractante inducida por Pet, se emplearon los sueros de los ratones inmunizados con los fagotopos que presentan los motivos PGxIN (SPet-1), PDDSS (SPic-6)

PQPxK (SP3-7) y el suero de conejo anti-Pet. Los resultados obtenidos indican que los motivos PDDSS y PGxIN son responsables de la actividad quimioattractante de Pet ya que los sueros obtenidos contra ambas secuencias inhibían en un 80 % la migración de las células mononucleares, efecto mayor al observado con el suero policlonal de conejo (55 %). Con respecto al suero SP3-7 (PQPxK) se observó una disminución de la quimiotaxis del 45%, lo que sugiere que dicho motivo no participa directamente en la actividad de Pet (Fig. 11).



**Figura 11. Ensayo de Inhibición de la Actividad Quimioattractante de Pet.** El movimiento de células mononucleares (MN) inducido por Pet (quimiotaxis) se analizó en un ensayo de cámara de Boyden. Se utilizaron suero activado con zimosan (ZAS) y solución Gey's como controles positivo y negativo respectivamente. La inhibición de la migración de MN fue de un 50% a 80% cuando Pet fue previamente incubado con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Pet o de ratones anti-PQPxK (SP3-7), anti-PGxI/LN (SPet-1), anti-PDDSS (Spic-6). Un valor de  $P < 0.05$  fue obtenido con SαPet, SPet-1 y Spic-6 comparándolo con los resultados obtenidos con el suero preinmune (S.P.I.).

## VIII. DISCUSIÓN

El grupo de proteasas conocidas como SPATEs son proteínas con diversas actividades que se han relacionado con la patogénesis de las bacterias que las secretan. Presentan un motivo de serina que esta involucrado en algunas de las actividades biológicas que se les han descrito. Pet la primera SPATE identificadas en cepas EAEC y Pic otra SPATE identificada en EAEC se ha reportado en *Shigella* y en cepas del grupo UPEC. Ambas proteasas presentan diferentes propiedades biológicas que se han relacionado con la patogénesis de las bacterias que las secretan (Eslava y cols. 1998; Henderson y cols. 1999; Guyer y cols. 2000).

Entre las diferentes propiedades que se han identificado en Pet, se incluye su actividad como enterotoxina y citotóxina, propiedades relacionadas con el motivo de serina (Navarro-García y cols. 1998, 1999; Villaseca y cols. 2000).

Otro efecto que se ha observado en Pet, es la de inducir una respuesta inflamatoria intensa. Esta propiedad de la proteína se ha identificado en modelos animales, como en ensayo *in vitro* con cámaras de Boyden (Eslava y cols. 1993,2003; Sainz y cols. 2000). Un hecho importante al respecto es el hecho que en esta actividad no participa el motivo de serina de la proteasa.

Pic, por su parte degrada la mucina y al hemoglobina, además se une al grupo hemo, hecho que contribuye a la colonización del epitelio intestinal por parte de la bacteria (Hernández-Chiñas y cols. 2002; Okeke y cols. 2004, Drago-Serrano y cols. 2006).

Ante el hecho de que en algunas de las propiedades biológicas identificadas en Pet no participa el motivo (GDSGS), es que diferentes investigadores con diferentes procedimientos han intentado identificar sitios funcionales de Pet. Al respecto Dutta y cols. (2003), analizaron el dominio pasajero de Pet por mutagénesis dirigida (scanning linker mutagénesis). Sus resultados mostraron que la proteína presenta una estructura con diferentes dominios relacionados a la biogénesis de la autosecreción de la proteína. Por su parte Yen y cols (2008), por análisis bioinformático, identificaron la presencia de secuencias de aminoácidos conservadas entre los diferentes integrantes de la familia SPATEs. Fink y cols (2001), realizaron mutaciones puntuales sobre el gen *hap* (serin proteasa de *Hemophilus influenzae*), identificaron que la actividad catalítica de estas enzimas está dada por los aminoácidos histidina, asparagina y la primera serina del motivo GDSGS, tres aminoácidos conservados dentro de la familia SPATEs. Finalmente Otto y cols. (2005), mediante el análisis de la estructura resuelta de la cristalografía de la proteasa de hemoglobina (Hbp), mostraron que los tres aminoácidos (H, D, S) se ubican en la región globular de la proteína (Fig. 7).

Para identificar y ubicar motivos inmunodominantes de Pet y Pic y de otras SPATEs relacionados con actividades biológicas. En el presente trabajo se utilizó el método de Phage display. Este procedimiento es una herramienta que permite identificar motivos inmunodominantes de proteínas y otros compuestos (Mertens y cols. 2001, Gevorkian y cols. 2005; Yip y cols. 1999, Königs y cols. 2000, Mertens y cols. 2001, Xu y cols. 2004, Rowley y cols. 2004; Smith an Petrenko y cols. 1997; Palacios-Rodríguez y cols. 2007; Gazarian y cols. 2000a, 2001). Con anticuerpos policlonales o monoclonales se seleccionan péptidos mimotopos del sitio inmunodominante, los cuales son expresados en la superficie de un fago filamentoso (M13) de una biblioteca de péptidos construida en el gen de la proteína III (Scout y cols. 1990, Devlin y cols. 1990, Cwirla y cols. 1990).

En el presente trabajo se utilizaron anticuerpos policlonales anti-Pet y anti-Pic obtenidos de niños infectados con una cepa EAEC productora de las dos proteínas y otros obtenidos de conejos inmunizados con cada una de las proteínas desnaturalizadas (ver material y métodos). Se utilizaron diferentes anticuerpos, para evaluar si cambios en las características de la proteína, influían en la capacidad de selección de mimotopos. La primera observación al respecto, mostró que, indistintamente del origen de los anticuerpos, al evaluar su reactividad en un ensayo de ELISA, todos reaccionaron con las dos proteínas. Sin embargo, la respuesta de los sueros de conejos (anti-Pet, anti-Pic) fue más intensa y los niveles de anticuerpos varias veces más altos (Fig. 6), que los obtenidos con los sueros de los niños (SP-1, SP-3 y SP-6) (Fig. 5). La explicación al respecto pudiera estar relacionada por un lado con el tiempo de almacenamiento (casi 15 años) de los sueros de los niños y por otro que probablemente durante la infección se montó una respuesta inmune contra epitopes de diferentes componentes de la bacteria.

A diferencia de lo anterior, los anticuerpos anti-Pet y anti-Pic de conejos, se obtuvieron después de administrar tres dosis del inmunógeno, el cual era una fracción purificada de las proteínas desnaturalizadas. Es importante mencionar que sueros que no contienen anticuerpos inducidos por epitopes inmunodominantes, pueden capturar péptidos, sin embargo, al realizar la secuencia de aminoácidos estas no muestran secuencia similares (como en IgG-P3, IgG-Pet ó IgG-Pic) en la mayoría de las clonas de fagos (Wang y Yu, 2004).

En el estudio observamos que la frecuencia en la que se pudo determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos seleccionados, varió con cada uno de los anticuerpos. Así tenemos que con IgG-P6, se obtuvo la secuencia de todas las clonas seleccionadas, mientras que en el caso de las clonas seleccionadas por la IgG-Pic, solo se pudo identificar la secuencia en el 62% (11 de 18) de las mismas

(Tablas 4 y 6). La diferencia en el número de clonas en las que se determinó la secuencia, puede estar relacionada con situaciones técnicas como puede ser la calidad del DNA molde, o deficiencias en la preparación de los reactivos para la reacción, o no seguir correctamente los tiempos y temperaturas señaladas en el protocolo del kit utilizado para la secuenciación.

El protocolo del Manual Ph.D.-12TM de New England BioLabs; sugiere para identificar una secuencia consenso utilizar DNAss de un mínimo. En este estudio se decidió seleccionar 18 clonas de fagos, con el propósito de asegurar el resultado ya que la secuencia del DNA se realizó manualmente.

El análisis de las secuencias de los fagotopos seleccionados con las diferentes inmunoglobulinas, mostró que la prolina se encontraba en más del 80% de las 111 secuencias de péptidos obtenidas. Estos resultados indican que la prolina es un aminoácido esencial para la unión al anticuerpo, lo anterior se apoya en las observaciones reportadas por investigadores, que han realizado el mapeo de epítopes conformacionales (O'Nuallain y cols. 2007, Gazarian, 2001) o con el mimetismo de carbohidratos (Gervokian y cols. 2005). La prolina es un aminoácido con el grupo amino y carboxilo terminal unidos, esta conformación da lugar a un ángulo estructural con un  $\Phi$  de  $\sim 65^\circ$ , esto restringe la conformación de los aminoácidos cercanos a la prolina, resultando preferentemente en la formación de plegamiento- $\beta$  (Kay y cols. 2000). Lee y cols. (2007) caracterizando un anticuerpo monoclonal contra alérgenos de serin proteasas, identificaron el epítipo conformacional EKNAPWGLA; al utilizar péptidos sintéticos con esta secuencia, observaron que al cambiar la prolina por adenina o glicina se afectaba la unión al anticuerpo, por lo tanto plantean que la prolina es necesaria para dar una conformación estructural óptima para la interacción proteína-proteína.

No obstante que el suero de diferentes niños reconocían las proteínas Pet y Pic, solo la IgG-P3 (paciente 3), selecciono fagos cuyos péptidos presentaban un motivo (secuencias consenso) en más del 50% de las clonas. Con respecto a la IgG de conejo anti-Pet y anti-Pic con ambas se obtuvieron secuencias consenso en una frecuencia superior al 50 %. Lo anterior probablemente por el hecho de haber utilizado como inmunógeno fracciones purificadas de las proteínas.

Se consideró que las secuencias de aminoácidos consenso presentes en los fagotopos seleccionados por las IgG (IgG-P3, IgG-Pet, IgG-Pic) corresponden a mimotopos antigénicos de Pet y Pic, debido a la reactividad de estas contra los anticuerpos que las seleccionaron (Tablas 3, 5 y 6).

El análisis del motivo PQ/HPxK seleccionado por la IgG-P3, mostró que está formado por aminoácidos de tipo hidrofóbico (prolina) e intercalado entre estos un aminoácido hidrofílicos (glutamina), o un aminoácido básico (histidina) seguido de un aminoácido ácido (lisina). Dicha composición lo hace un buen formador de puentes de hidrógeno, lo que probablemente favorece el contacto con el parotopo de la IgG y por lo mismo que hayan sido capturados con mayor facilidad.

Durante el análisis de las secuencias de los diferentes fagos, una de las clonas seleccionada por la IgG-P6 (paciente 6) presentó el motivo PQPxK seleccionado también pero en una proporción mayor por la IgG-P3 (Tabla 4). Esta observación confirma la respuesta policlonal de los pacientes durante la infección por EAEC, ya que ambos pacientes montaron una respuesta contra el mismo epitopo de la cepa EAEC productora de Pet y Pic. Sin embargo, al realizar la búsqueda de la secuencia (PQPxK) en la estructura primaria de las diferentes SPATEs no se encontró en ninguna de ellas. Este resultado pudiera estar relacionado con dos situaciones diferentes, por un lado que la población de anticuerpos presentes en el suero de los pacientes tres y seis es muy heterogénea y con niveles bajos contra Pet y

Pic, o por otro lado que se trate de anticuerpos dirigidos contra un epitopo conformacional\* de las toxinas.

\* Los epitopos conformacionales están formados en la mayoría de los casos por un pequeño número de aminoácidos dispersos a lo largo de la secuencia de la proteína, sin embargo, se encuentran juntos en la superficie de la misma. Con el empleo de métodos bioinformáticos, con es el programa EpiSearch (<http://curie.utmb.edu/episearch.html>) se puede realizar el análisis de epitopos conformacionales, que fueron obtenidos por la bioselección por Phage display (Negi 2009). Sin embargo, en el estudio no se desarrolló este análisis debido a que no se cuenta con una estructural del cristal de Pet, y para el desarrollo del análisis se requiere del número del PDB (Protein Data Bank).

En relación a la primera propuesta, Palacios-Rodríguez y cols. (2008), quienes utilizaron el método de Phage display para identificar motivos inmunodominantes del virus VIH, reportaron que con los sueros de pacientes utilizados, capturaron el motivo CxxKxxC de la glicoproteína gp41. Un ensayo posterior, con el suero de los pacientes en diferentes etapas de la enfermedad, mostró que la selección del mimotopo (CxxKxxC), así como la reactividad de los sueros contra el mismo, eran intensas solo cuando los pacientes presentaban una carga viral alta, pero disminuía o era negativa, cuando los pacientes habían recibido tratamiento. La explicación al respecto era que con el tratamiento la presencia del virus disminuía y por lo tanto los niveles de anticuerpos dirigidos a la glicoproteína.

La explicación de una posible reacción contra un mimotopo conformacional, se puede esclarecer con los resultados del estudio realizado por Da Silva y cols. (2010), los autores utilizaron una mezcla de diferentes sueros de pacientes con neurocisticercosis, seleccionaron 80 clonas de la tercera y cuarta ronda de la bioselección, con el propósito de capturar mimotopos inmunodominantes presentes en el parásito. Posteriormente, evaluaron la reactividad de un suero anti *Taenia solium* contra las 80 clonas

seleccionadas, el resultado observado mostró una reactividad alta contra 10 de ellas, aunque no presentaban una secuencia consenso.

Para validar que las secuencias de péptidos de las 10 clonas eran mimotopos de la *Taenia solium*, realizaron un ensayo de competencia con los sueros de pacientes con neurocisticercosis y las 10 clonas de fagos, el resultado mostró inhibición de la respuesta contra todos los sueros lo que confirmaba que eran epitopos probablemente conformacionales del parásito, aunque no fue posible definir de que parte del parásito.

Otro estudio, realizado por Gustafsson y cols. (2009) quienes utilizaron el método de Phage display para el mapeo de epitopos conformacionales de la proteína CHIPS (proteína inhibitoria de la quimiotaxis de *Staphylococcus aureus*), observaron que los anticuerpos de pacientes que reaccionaban contra CHIPS, lo hacían únicamente contra secuencias discontinuas lo que sugería que se trataba de epitopos conformacionales. En el caso del mimotopo PQPxK (seleccionado por la IgG de los pacientes tres y seis), utilizando los anticuerpos obtenidos en ratón contra el fagotopo portador de la secuencia analizados por ELISA y Western blot, mostraron reactividad para reconocer a Pet y Pic, lo que sugiere que pudiera tratarse de un epitopo conformacional. Sin embargo, se requiere realizar ensayos de competencia que no fue posible implementar debido a la cantidad limitada de anticuerpo contra dicho mimotopo.

Con la IgG de conejo anti-Pet, se identificó la secuencia consenso (PGxI/LN) en 16/18 (89%) de las clonas seleccionadas. Esta se conforma por aminoácidos hidrofóbicos (P, G, I, L) y un aminoácido básico (N). Este mimotopo se identificó en el motivo P<sup>77</sup>GSTH<sup>81</sup> que se localiza en la región amino terminal de Pet y de otras SPATEs. Fink y cols. (2001) al hacer un alineamiento sobre Hap (serin

proteasa de *Hemophilus influenzae*) y otras SPATEs identificaron la secuencia consenso PGATN, que corresponde a la identificada en nuestro estudio.

La prolina y la asparagina en algunas de las proteasas son sustituidas por aminoácidos con las mismas características físico-químicas (Tabla 7), esto confirma que la secuencia seleccionada (PGxI/LN) es un mimotopo del motivo P<sup>77</sup>GSTH<sup>81</sup>. Yen y cols. (2008), reportan que 173 de aproximadamente 1200 aminoácidos que forman el dominio pasajero de las SPATEs son conservados y sugieren que contribuyen a la estabilidad estructural y funcional de las serin proteasas. Dentro de estos 173 aminoácidos se encuentra la secuencia PGxxN, lo que apoya que se trata de un motivo funcional e inmunodominante de Pet y otros integrantes de las SPATEs. Por sus características es posible utilizar las secuencias de los péptidos identificados, para obtener anticuerpos y utilizarlos como reactivo para la detección de las SPATEs. Resultados preliminares al respecto utilizando un ensayo de dot blot, mostraron una reactividad intensa de los sueros contra Pet y Pic hasta una concentración de 1 µg/ml.

Con la IgG-anti Pic obtenida en conejo no se pudieron seleccionar fagos con péptidos mimotopos utilizando una biblioteca lineal de 12 aminoácidos, por lo que utilizamos una librería cíclica C7C. Con esta se identificó el mimotopo conformacional CxPDDSSxC, localizado en un loop o asa en la estructura terciaria de Pet (Fig. 7).

Previo a la obtención de las clonas portadoras de la secuencia, se hicieron algunas modificaciones al protocolo de bioselección (lavados con agitación) cambios con el propósito de eliminar en mayor proporción las clonas unidas inespecíficamente. Los resultados obtenidos mejoraron la selección de fagos con secuencias consensos (CxPDDSSxC), en siete de las 11 clonas seleccionadas. Los

aminoácidos DDSS se encontraron en todas las clonas, por lo que se puede afirmar que se identificó un mimotopo de Pic con alta antigenicidad (Tabla 6).

La alta frecuencia en la que se identificaron las secuencias consenso antes referidas y apoyados en los reportes que señalan que no es común encontrarlo en un porcentaje alto (Gazarian y cols. 2000b; Negi y cols. 2009). Se consideró la probabilidad algún error en la construcción de la biblioteca utilizada. Sin embargo, lo anterior se descartó cuando se analizó la secuencia de nueve clonas seleccionadas en la segunda ronda de la bioselección, en este ensayo se encontró que la secuencias DDSS estaba en siete (77%) de ellas y PDDSS en dos de las nueve clonas. Con este resultado se confirmó que no existían problemas en la construcción de la biblioteca

El motivo PDDSS presenta un aminoácido hidrofóbico (prolina), dos ácidos (ácido aspártico) y dos hidrofílicos (serina), este motivo se localizó en la secuencia lineal de Pic A<sup>93</sup>DFSS<sup>97</sup> y otras SPATEs (Tabla 7). De los aminoácidos presentes en el motivo, tres de ellos aspártico, fenilalanina y la primera serina (DFS), son conservados dentro de la familia SPATEs. Motivo (DFS) identificado por Yen y cols. (2008) al realizar un análisis bioinformático de las SPATEs, ellos proponen que esta secuencia conservada pudiera estar relacionada con la estabilidad estructural o funcional de las SPATEs. Los mismos autores después de generar modelos tridimensionales de diferentes SPATEs, identificaron que este motivo se localiza a 11 Å del motivo de serin proteasa GDSGS.

Como parte de nuestro estudio se elaboró un modelo de la estructura terciaria de Pet, al analizar la ubicación de los motivos PGxxN y PDFSS, ambos se localizaron en la porción globular de la proteína a la misma distancia (11 Å) del motivo GDSGS tal y como fue descrito por Yen y cols. (2008). Este

resultado sugiere la participación de ambos motivos (PGxxN y PDFSS), en la actividad catalítica de las SPATEs.

Para corroborar que los motivos antes referidos formaban parte de Pet y Pic se decidió evaluar por un ensayo de ELISA, si el suero de ratones inmunizados con los fagotopos que presentaban los motivos PQPxK (clonas P3-7, P3-IIIr), PGxI/LN (clonas Pet-1, Pet-3, Pet-IIIr) y PDFSS (clonas Pic-6, Pic-IIIr), reaccionaban contra las proteínas. El resultado mostró una reactividad tres veces más alta que la obtenida con los anticuerpos policlonales de conejo anti-Pet y anti-Pic (Fig. 8), aunque, esta observación pudiera parecer extraña por el hecho de estar utilizando anticuerpos obtenidos contra los mimotopo de la proteína, estos mimotopos representan un sitio específico del epitopo mimetizado, el cual se encuentra libre de otros elementos inmunotrópicos de la proteína algunos de los cuales tienen efectos inmunomodulatorios desarrollados por los patógenos para disminuir o silenciar los epitopos inmunodominantes.

Por otro lado la concentración de antígeno empleado para inmunizar es mayor que de proteína total. Esto porque los ratones fueron inoculados con  $10^{11}$  a  $10^{12}$  fagos que presentan al sistema inmune de tres a cinco péptidos lo que representa  $5 \times 10^{12}$  péptidos miméticos del epitopo conformando una estructura adecuada para las células presentadoras de antígeno.

Una evidencia que nos permitió confirmar la importancia que tienen algunos aminoácidos en las secuencias de los mimotopos, se obtuvo cuando se utilizó en el ensayo de ELISA la proteína EspC que es secretada por el grupo EPEC de *E. coli* y que presenta una alta identidad con Pet (Eslava y cols. 1998). Aunque los anticuerpos preparados contra los mimotopos con las secuencias PQPxK, PGxI/LN y PDFSS reconocieron a la proteína, la respuesta obtenida fue menor que la observada contra Pet y Pic,

con valores muy cercanos a los obtenidos con el suero policlonal de conejo anti-EspC (Fig. 8). Lo anterior puede estar relacionado con la secuencia de EspC (AGxxN), que muestra una alanina en lugar de la prolina de los motivos seleccionados. La estructura de estas cadenas laterales es diferente, ya que mientras una es cíclica (prolina) la otra es alifática (alanina), lo que marca diferencias estructurales entre ambas secuencias.

Para confirmar que la respuesta que se observa al emplear anticuerpos obtenidos en ratones contra los mimotopos seleccionados, estaba dirigida específicamente contra la secuencia del péptido, se evaluó la reactividad de los dos anticuerpos, contra los péptidos sintéticos TYPGYINHSKAS y ILLPQPPKLLLP diseñados con las secuencias de los mimotopos. El resultado mostró que ambos sueros reaccionaban contra diferentes concentraciones de los péptidos (Fig. 9), lo que permite asegurar que la respuesta observada contra los fagotopos pudiera deberse a una reactividad inespecífica relacionada con algún componente del fago.

Para evaluar si los motivos identificados estaban relacionados con alguna o algunas de las propiedades citadas para Pet, se decidió realizar ensayos de neutralización de la proteína con los anticuerpos obtenidos contra los mimotopos identificados. La degradación de la fodrina (espectrina de células eritroides) es una de las actividades reportadas para Pet (Villaseca y cols. 2000), dicha actividad se ha relacionado con el motivo de serin (GDSGS). Como se hizo referencia próxima a este sitio (11Å), se identificaron los motivos PGxI/LN y PDDSS. Esta última secuencia es un mimotopo del motivo DFS, que se ha propuesto pudiera participar en la actividad catalítica de la enzima (Yen y cols. 2008). Con los anticuerpos obtenidos contra el fagotopo portador de la secuencia PDDSS se inhibió en forma parcial la actividad de Pet para degradar la espectrina (Fig. 10). El resultado sugiere que el motivo no participa directamente en la degradación de dicho sustrato, pero es posible que los anticuerpos por

impedimento estérico interfieran con el sitio catalítico de Pet, responsable de la degradación de la espectrina.

Un efecto importante inducido por Pet y probablemente relacionado con el daño inducido por EAEC en el hospedero, es la respuesta inflamatoria (Eslava y cols. 2003; Sainz y cols. 2002).

El porque un microorganismo libera compuestos que activan la respuesta inflamatoria, es una pregunta que surge ante el hecho de que ésta última, puede interferir con su adecuado establecimiento en el hospedero. Lo anterior se ha tratado de explicar señalando que esta respuesta del hospedero, contribuye positivamente sobre el patógeno ya que es probable que por esta ruta, se eliminen algunos integrantes de la microbiota, lo que a la postre facilita la colonización por parte de las bacterias patógenas (Lupp y cols. 2007).

La respuesta inflamatoria inducida por Pet no esta relacionada con el motivo de serina (GDSGS), por lo que era necesario evaluar si alguno de los motivos identificados en este estudio, era responsable de inducir dicha actividad.

Con anticuerpos obtenidos de los ratones inmunizados con los fagotopos PGxI/LN y PDDSS, se realizó un ensayo de neutralización de Pet, la toxina se utilizó en ensayo de quimiotaxis El resultado mostró inhibición del 80 % de la movilidad de los macrófagos (Fig. 11), que comparada con la respuesta obtenida con el suero de conejo anti-Pet (45 %) y la del suero preinmune es altamente significativa. Por lo observado podemos considerar que ambos motivos (PGxI/LN y PDDSS) participan en la actividad quimioatrayente inducida por Pet. Ensayos preliminares utilizando los péptidos sintéticos diseñados

con ambas secuencias, muestran la inducción de un efecto attractante de estos sobre macrófagos, similar al inducido por la toxina purificada (Pet).

De confirmar este último resultado podríamos asegurar la participación de dichos motivos en una de las actividades biológicas de Pet, que al parecer participan en el daño intestinal asociado a la infección de EAEC productora de Pet.

• **IX. CONCLUSIONES.**

- El método de Phage display, fue útil para identificar sitios inmunodominantes en diferentes SPATEs.
- Al utilizar anticuerpos anti-Pet y anti-Pic generados de una infección natural o de animales inmunizados con las proteínas, se pudieron seleccionar mimotopos (PGxI/LN, PDDSS y PQPxK) con propiedades inmunogénicas, que facilitaron la obtención de anticuerpos altamente reactivos.
- Los motivos inmunodominantes identificados (PGxI/LN y PDDSS), son compartidos por diferentes SPATEs, por lo que anticuerpos generados contra estos pueden ser utilizados como reactivos para el diagnóstico de cepas bacterianas productoras de SPATEs.
- El trabajo desarrollado permitió corroborar que los motivos PGxI/LN y PDDSS, previamente reportados por procedimientos indirectos (mutagénesis, análisis bioinformático), se encuentran localizados en la región globular de diferentes miembros de la familia SPATEs.
- Los motivos PGxI/LN y PDDSS a pesar de encontrarse muy cerca del motivo de serin proteasas no participan en la actividad degradante de espectrina (fodrina) inducida por Pet.
- Los ensayos de neutralización con anticuerpos anti-PGxI/LN anti-PDDSS obtenidos en ratón, nos permiten proponer que estos motivos están involucrados en el efecto quimiotáctico inducido por Pet a células mononucleares.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Hasani K**, Henderson IR, Sakellaris H, Rajakumar K, Grant T, Nataro JP, Robins-Browne R, Adler B. The sigA Gene Which is Borne on the *she* Pathogenicity Island of *Shigella flexneri* 2a. Encodes an Exported Cytopathic Protease Involved in Intestinal Fluid Accumulation. *Infect. Immun.* **2000**; 68(5):2457-63.
- Al-Hasani K**, Rajakumar K, Bulach D, Robins-Browne R, Adler B, Sakellaris H. Genetic Organization of the *she* Pathogenicity Island in *Shigella flexneri* 2a. *Microb. Pathog.* **2001**; 30(1):1-8.
- Al-Hasani K**, Navarro-García F, Huerta J, Sakellaris H, Adler B. The Immunogenic SigA Enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a binds to HEP-2 Cells and Induces Fodrin Redistribution in Intoxicated Epithelial Cells. *PLoS One.* **2009**; 4(12):e8223.
- Backert S**, Meyer TF. Type IV Secretion Systems and Their Effectors in Bacterial Pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**; 9(2):207-17.
- Barnard TJ**, Dautin N, Lukacik P, Bernstein HD, Buchanan SK. Autotransporter Structure Reveals Intra-Barrel Cleavage Followed by Conformational Changes. *Natstruct. Mol. Biol.* **2007**; 14(12):1214-20.
- Barrett AJ**. The Possible Role of Neutrophil Proteinases in Damage to Articular Cartilage. 1978. *Agents. Actions.* **1994**; 43(3-4):194-200.
- Benjelloun-Touimi Z**, Sansonetti PJ, Parsot C. SepA, The Major Extracellular Protein of *Shigella flexneri*: Autonomous Secretion and Involvement in Tissue Invasion. *Mol. Microbiol.* **1995**; 17(1):123-35.
- Benjelloun-Touimi Z**, Si Tahar M, Montecucco C, Sansonetti PJ, Parsot C. SepA, the 110 kDa Protein Secreted by *Shigella flexneri*: two-domain Structure and Proteolytic Activity. *Microbiology.* **1998**; 144(Pt 7):1815-22.
- Betancourt-Sánchez M**, Navarro-García F. Pet Secretion, Internalization and Induction of Cell Death During Infection of Epithelial Cells by Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Microbiology.* **2009**; 155(Pt 9):2895-906.
- Binet R**, Létoffé S, Ghigo JM, Delepelaire P, Wandersman C. Protein Secretion by Gram-negative Bacterial ABC Exporters. *Gene.* **1997**; 192(1):7-11.
- Bingle LE**, Bailey CM, Pallen MJ. Type VI Secretion: a Beginner's Guide. *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**; 11(1):3-8.
- Boisen N**, Ruiz-Pérez F, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. Short Report: High Prevalence of Serine Protease Autotransporter Cytotoxins among Strains of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**; 80(2):294-301.
- Bradford MM**. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**; 7(72):248-54.
- Bratkovic T**. Progress in Phage display: Evolution of the Technique and its Application. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2010**; 67(5):749-67.
- Brunder W**, Schmidt H, and Karch H. EspP, a Novel Extracellular Serine Protease of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Cleaves Human Coagulation Factor V. *Mol. Microbiol.* **1997**; 24(4):767-78.
- Buchwald UK**, Lees A, Steinitz M, Pirofski LA. A Peptide Mimotope of Type 8 Pneumococcal Capsular Polysaccharide Induces a Protective Immune Response in Mice. *Infect. Immun.* **2005**; 73(1):325-33.
- Canizalez-Román A**, Navarro-García F. Fodrin CaM-binding Domain Cleavage by Pet from Enteroaggregative *Escherichia coli* Leads to Actin Cytoskeletal Disruption. *Mol. Microbiol.* **2003**; 48(4):947-58.
- Chan SW**, Nathan S. Epitope Mapping of *Burkholderia pseudomallei* Serine Metalloprotease: Identification of Derivative Protease Epitope Mimics. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2005**; 1,43(1):37-44.

- Clermont O**, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**; 66(10):4555-8.
- Cwirla SE**, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ. Peptides on Phage: a Vast Library of Peptides for Identifying Ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1990**; 87(16):6378-82.
- Czczulin JR**, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1999**; 67(6):2692-9.
- da Silva Ribeiro V**, Manhani MN, Cardoso R, Vieira CU, Goulart LR, Costa-Cruz JM. Selection of High Affinity Peptide Ligands for Detection of Circulating Antibodies in Neurocysticercosis. *Immunol. Lett.* **2010**; 129(2):94-9.
- Dautin N**, Barnard TJ, Anderson DE, Bernstein HD. Cleavage of a Bacterial Autotransporter by an Evolutionarily Convergent Autocatalytic Mechanism. *EMBO J.* **2007b**; 26(7):1942-52.
- Dautin N**, Bernstein HD. Protein Secretion in Gram-negative Bacteria Via the Autotransporter Pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* **2007a**; 61:89-112.
- d'Enfert C**, Chapon C, Pugsley AP. Export and Secretion of the Lipoprotein Pullulanase by *Klebsiella Pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **1987**; 1(1):107-16.
- Desvaux M**, Parham NJ, Henderson IR. The Autotransporter Secretion System. *Res. Microbiol.* **2004a**; 155(2):53-60.
- Desvaux M**, Parham NJ, Henderson IR. Type V Protein Secretion: Simplicity Gone Awry? *Curr Issues Mol. Biol.* **2004b**; 6(2):111-24.
- Desvaux M**, Khan A, Beatson SA, Scott-Tucker A, Henderson IR. Protein Secretion Systems in *Fusobacterium Nucleatum*: Genomic Identification of Type 4 Piliation and Complete Type V Pathways Brings New Insight Into Mechanisms of Pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**; 1713(2):92-112.
- Desvaux M**, Cooper LM, Filenko NA, Scott-Tucker A, Turner SM, Cole JA, Henderson IR. The Unusual Extended Signal Peptide Region of the Type V Secretion System is Phylogenetically Restricted. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**; 264(1):22-30.
- Desvaux M**, Scott-Tucker A, Turner SM, Cooper LM, Huber D, Nataro JP, Henderson IR. A Conserved Extended Signal Peptide Region Directs Posttranslational Protein Translocation Via a Novel Mechanism. *Microbiology.* **2007**; 153(Pt 1):59-70.
- Devlin JJ**, Panganiban LC, Devlin PE. Random Peptide Libraries a Source of Specific Protein Binding Molecules. *Science.* **1990**, 27.249(4967):404-6.
- Djafari S**, Ebel F, Deibel C, Krämer S, Hudel M, Chakraborty T. Characterization of an Exported Protease from Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **1997**; 25(4):771-84.
- Dower WJ**, Cwirla SE, **1994**. Epitope Mapping Using Libraries of Random Peptide Displayed on Phage. In: Wisdom GB, Editor. *Peptide Antigens: A Practical Approach*, Ed IRL Press, Oxford Univ Press New York, 219-43.
- Drago-Serrano ME**, Parra SG, Manjarrez-Hernández HA. EspC, an Autotransporter Protein Secreted by Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Displays Protease Activity on Human Hemoglobin. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**; 265(1):35-40.
- Dutta PR**, Cappello R, Navarro-García F, Nataro JP. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* **2002**; 70(12):7105-13.
- Dutta PR**, Sui BQ, Nataro JP. Structure-function Analysis of the Enteroaggregative *Escherichia coli* Plasmid-Encoded Toxin Autotransporter Using Scanning Linker Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278(41):39912-20.
- Dybwad A**, Bogen B, Natvig JB, Forre O, Sioud M. Peptide Phage Libraries Can be an Efficient Tool for Identifying Antibody Ligands for Polyclonal Antisera. *Clin. Exp. Immunol.* **1995**; 102(2):438-42.

- Economou A**, Christie PJ, Fernández RC, Palmer T, Plano GV, Pugsley AP. Secretion by Numbers: Protein Traffic in Prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **2006**; 62(2):308-19.
- Escobar-Páramo P**, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Le Bouguéne C, Denamur E. A Specific Genetic Background is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **2004**; 21(6):1085-94.
- Eslava C.**, J. Villaseca, R. Morales, A. Navarro, and A. Cravioto. 1993. Identification of a Protein with Toxigenic Activity Produced by Enteroaggregative *Escherichia coli*, Abstr. B-105. In Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology **1993**. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Eslava C**, Navarro-García F, Czeczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. Pet, an Autotransporter Enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1998**; 66(7):3155-63.
- Eslava C.**, Villaseca J, Rico G, Molina J, Hernández-Chiñas U, Kreshmer R, Vázquez S, Cravioto A. Pet Toxin from Enteroaggregative *Escherichia coli* Induce the Expression of Different Interlukins from Macrophages. **2003**. 103 General Meeting, Washington, D.C.
- Fekkes P**, Driessen AJ. Protein Targeting to the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**; 63(1):161-73.
- Filloux A**, Hachani A, Bleves S. The Bacterial Type VI Secretion Machine: yet Another Player for Protein Transport Cross Membranes. *Microbiology.* **2008**; 154(Pt 6):1570-83.
- Fink DL**, Buscher AZ, Green B, Fernsten P, St Geme JW 3rd. The *Haemophilus influenzae* Hap Autotransporter Mediates Microcolony Formation and Adherence to Epithelial Cells and Extracellular Matrix via Binding Regions in the C-terminal end of the Passenger Domain. *Cell. Microbiol.* **2003**; 5(3):175-86.
- Fink DL**, Cope LD, Hansen EJ, Geme JW 3rd. The *Hemophilus influenzae* Hap Autotransporter is a Chymotrypsin clan Serine Protease and Undergoes Autoproteolysis via an Intermolecular Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2001**; 276(42):39492-500.
- Folgori A**, Tafi R, Meola A, Felici F, Galfré G, Cortese R, Monaci P, Nicosia A. General Strategy to Identify Mimotopes of Pathological Antigens Using Only Random Peptide Libraries and Human sera. *EMBO J.* **1994**, 13(9):2236-43.
- Galán JE**. Common Themes in the Design and Function of Bacterial Effectors. *Cell Host Microbe.* **2009**; 8;5(6):571-9.
- Galfré G**, Monaci P, Nicosia A, Luzzago A, Felici F, Cortese R. Immunization with Phage-displayed Mimotopes. *Methods. Enzymol.* **1996**; 267:109-15.
- Gazarian KG**, Gazarian TG, Solís CF, Hernández R, Shoemaker CB, Laclette JP. Epitope Mapping on N-terminal Region of *Taenia solium* Paramyosin. *Immunol. Lett.* **2000a**; 72(3):191-5.
- Gazarian T**, Selisko B, Hérion P, Gazarian K. Isolation and Structure-functional Characterization of Phage display Library-derived Mimotopes of Noxiustoxin, a Neurotoxin of the *Scorpion centrurioides* Noxius Hoffmann. *Mol. Immunol.* **2000b**; 37(12-13):755-66.
- Gazarian KG**, Rowley MJ, Gazarian TG, Sotelo J, García-Mendoza E, Hernández R. Post-panning Computer-aided Analysis of Phagotopes Collections Selected with Neurocysticercosis Patient Polyclonal Antibodies: Separation of Disease-relevant and Irrelevant Peptide Sequences. *Comb. Chem. High. Throughput. Screen.* **2001**; 4(3):221-35.
- Gazarian KG**, Gazarian T, Hernández R, Possani LD. Immunology of Scorpion Toxins and Perspectives for Generation of Anti-venom Vaccines. *Vaccine.* **2005**; 23(26):3357-68.
- Gevorkian G**, Segura E, Acero G, Palma JP, Espitia C, Manoutcharian K, López-Marín LM. Peptide Mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* Carbohydrate Immunodeterminants. *Biochem. J.* **2005**; 387(Pt 2):411-7.

- Gustafsson E**, Haas PJ, Walse B, Hijnen M, Furebring C, Ohlin M, van Strijp JA, van Kessel KP. Identification of Conformational Epitopes for Human IgG on Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus*. *BMC Immunol.* **2009**; 10:13.
- Gutiérrez-Jiménez J**, Arciniega I, Navarro-García F. The Serine Protease Motif of Pic Mediates a Dose-dependent Mucolytic Activity After Binding to Sugar Constituents of the Mucin Substrate. *Microb. Pathog.* **2008**; 45(2):115-23.
- Guyer DM**, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HL. Identification of Sat, an Autotransporter Toxin Produced by Uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2000**; 38(1):53-66.
- Guyer DM**, Radulovic S, Jones FE, Mobley HL. Sat, the Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli* is a Vacuolating Cytotoxin for Bladder and Kidney Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **2002**; 70(8):4539-46.
- Harrington SM**, Sheikh J, Henderson IR, Ruiz-Pérez F, Cohen PS, Nataro JP. The Pic Protease of Enteroggregative *Escherichia coli* Promotes Intestinal Colonization and Growth in the Presence of Mucin. *Infect. Immun.* **2009**; 77(6):2465-73.
- Hedstrom L**. An Overview of Serine Proteases. *Curr Protoc Protein Sci.* **2002**; Chapter 21: Unit 21.10.
- Heimer SR**, Rasko DA, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HL. Autotransporter Genes *pic* and *tsh* are Associated with *Escherichia coli* Strains that Cause Acute Pyelonephritis and are Expressed During Urinary tract Infection. *Infect. Immun.* **2004**; 72(1):593-7.
- Henderson IR**, Navarro-García F, Nataro JP. The Great Escape: Structure and Function of the Autotransporter Proteins. *Trends Microbiol.* **1998**; 6(9):370-8.
- Henderson IR**, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1999**; 67(11):5587-96.
- Henderson IR**, Nataro JP. Virulence Functions of Autotransporter Proteins. *Infect Immun.* **2001**; 69(3):1231-43.
- Henderson IR**, Hicks S, Navarro-García, Henderson IR, Navarro-García F, Desvaux M, Fernández RC, Ala'Aldeen D. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**; 68(4):692-744.
- Hernández-Chiñas U**, J. M. Villaseca, J. Molina, C. A. Eslava. Pic Protease from Enteroggregative *Escherichia coli* Induce Hemoglobin Disruption. **2002**. Salt Lake City Utah.
- Hernández-Chiñas U**. Sr. J. Lama-Plata, M. Solano, A. Navarro. T. Sainz, C. González, C. Eslava. Correlation Between the Presence of *pet*, *pic* and *sat* Genes and their Expression in Enteroggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Children With and Without Diarrhea. <sup>108</sup>American Society for Microbiology **2008**. Boston Mass USA.
- Herzer PJ**, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic Distribution of Branched RNA-linked Multicopy Single-Stranded DNA Among Natural Isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1990**; 172(11):6175-81.
- Hritonenko V, Kostakioti M, Stathopoulos C. Quaternary Structure of a SPATE Autotransporter Protein. *Mol. Membr. Biol.* **2006**; 23(6):466-74.
- Jacob-Dubuisson F**, Loch C, Antoine R. Two-partner Secretion in Gram-negative Bacteria: a Thrifty, Specific Pathway for Large Virulence Proteins. *Mol. Microbiol.* **2001**;40(2):306-13.
- Jarvis KG**, Girón JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli* Contains a Putative type III Secretion System Necessary for the Export of Proteins Involved in Attaching and Effacing Lesion Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1995**; 92(17):7996-8000.
- Kay BK**, Williamson MP, Sudol M. The Importance of Being Proline: the Interaction of Proline-rich Motifs in Signaling Proteins With Their Cognate Domains. *FASEB J.* **2000**; 14(2):231-41.

- Kostakioti M**, Stathopoulos C. Role of the Alpha-helical Linker of the C-terminal Translocator in the Biogenesis of the Serine Protease Subfamily of Autotransporters. *Infect. Immun.* **2006**; 74(9):4961-9.
- Laemli UK**. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* **1970**; 227(5259):680-5.
- Lee LH**, Tam MF, Chou H, Tai HY, Shen HD. Lys, Pro and Trp are Critical Core Amino Acid Residues Recognized by FUM20, a Monoclonal Antibody Against Serine Protease Pan-fungal Allergens. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **2007**; 143(3):194-200.
- Létoffé S**, Ghigo JM, Wandersman C. Secretion of the *Serratia marcescens* HasA Protein by an ABC Transporter. *J. Bacteriol.* **1994**;176(17):5372-7.
- Leva R**, Bernstein HD. Interaction of an Autotransporter Passenger Domain with BamA During its Translocation Across the Bacterial Outer Membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2009**; 10.106(45):19120-5.
- Leyton DL**, Sloan J, Hill RE, Doughty S, Hartland EL. Transfer Region of pO113 from Eterohemorrhagic *Escherichia coli*: Smilarity with R64 and Identification of a Novel Plasmid-Encoded Autotransporter, EpeA. *Infect. Immun.* **2003**; 71(11):6307-19.
- Lupp C**, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, Finlay BB. Host-mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell. Host. Microbe.* **2007**; 2(3):204.
- Mallik I**, Smith MA, Flower AM. Recognition of Secretory Proteins in *Escherichia coli* Requires Signals in Addition to the Signal Sequence and Slow Folding. *BMC Microbiol.* **2002**; 11;2:32.
- Manjarrez-Hernández HA**, Gavilanes-Parra S, Chávez-Berrocal E, Navarro-Ocaña A, Cravioto A. Antigen Detection in Enteropathogenic *Escherichia coli* Using Secretory Immunoglobulin A Antibodies Isolated from Human Breast Milk. *Infect. Immun.* **2000**; 68(9):5030-6.
- Mertens P**, Walgraffe D, Laurent T, Deschrevel N, Letesson JJ, De Bolle X. Selection of Phage-displayed Peptides Recognised by Monoclonal Antibodies Directed Against the Lipopolysaccharide of *Brucella*. *Int. Rev. Immunol.* **2001**; 20(2):181-99
- Maroncle NM**, Sivick KE, Brady R, Stokes FE, Mobley HL. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **2006**;74(11):6124-34.
- Navarro-García F**, Eslava C, Villaseca JM, López-Revilla R, Czczulin JR, Srinivas S, Nataro JP, Cravioto A. *in vitro* Effects of a High-Molecular-Weight Heat-labile Enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1998**; 66(7):3149-54.
- Navarro-García F**, Sears C, Eslava C, Cravioto A, Nataro JP. Cytoskeletal Effects Induced by Pet, the Serine Protease Enterotoxin of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1999**; 67(5):2184-92.
- Navarro-García F**, Canizalez-Román A, Luna J, Sears C, Nataro JP. Plasmid-encoded Toxin of Enteroaggregative *Escherichia coli* is Internalized by Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **2001**; 69(2):1053-60.
- Navarro-García F**, Canizalez-Román A, Sui BQ, Nataro JP, Azamar Y. The Serine Protease Motif of EspC from Enteropathogenic *Escherichia coli* produces Epithelial Damage by a Mechanism Different from that of Pet Toxin from Enteroaggregative *E. coli*. *Infect. Immun.* **2004**; 72(6):3609-21.
- Navarro-García F**, Canizalez-Román A, Vidal JE, Salazar MI. Intoxication of Epithelial Cells by Plasmid-Encoded Toxin Requires Clathrin-mediated Endocytosis. *Microbiology.* **2007a**; 153(Pt 9):2828-38.
- Navarro-García F**, Canizalez-Román A, Burlingame KE, Teter K, Vidal JE. Pet, a Non-AB Toxin, is Transported and Translocated into Epithelial Cells by a Retrograde Trafficking Pathway. *Infect. Immun.* **2007b**; 75(5):2101-9.

- Negi SS**, Braun W. Automated Detection of Conformational Epitopes Using Phage display Peptide Sequences. *Bioinform. Biol. Insights*. **2009**; 3:71-81.
- Niyogi SK**, Vargas M, Vila J. Prevalence of the *sat*, *set* and *sen* genes Among Diverse Serotypes of *Shigella flexneri* Strains Isolated from Patients with Acute Diarrhoea. *Clin Microbiol Infect*. **2004**;10(6):574-6.
- Okeke IN**, Lamikanra A, Czeczulin J, Dubovsky F, Kaper JB, Nataro JP. Heterogeneous Virulence of Enteroggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Children in Southwest Nigeria. *J. Infect. Dis*. **2000**; 181(1):252-60.
- Okeke IN**, Scaletsky IC, Soars EH, Macfarlane LR, Torres AG. Molecular Epidemiology of the Iron Utilization Genes of Enteroggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol*. **2004**; 42(1):36-44.
- Oliver DC**, Huang G, Fernández RC. Identification of Secretion Determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA Autotransporter. *J. Bacteriol*. **2003**; 185(2):489-95.
- O'Nuallain B**, Allen A, Ataman D, Weiss DT, Solomon A, Wall JS. Phage display and Peptide Mapping of an Immunoglobulin Light Chain Fibril-related Conformational Epitope. *Biochemistry*. **2007**; 46(45):13049-58.
- Otto BR**, van Dooren SJ, Nuijens JH, Luirink J, Oudega B. Characterization of a Hemoglobin Protease Secreted by the Pathogenic *Escherichia coli* Strain EB1. *J. Exp. Med*. **1998**; 188(6):1091-1103.
- Otto BR**, Sijbrandi R, Luirink J, Oudega B, Heddle JG, Mizutani K, Park SY, Tame JR. Crystal Structure of Hemoglobin Protease, a Heme Binding Autotransporter Protein from Pathogenic *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. **2005**; 280(17):17339-45.
- Palacios-Rodríguez Y**, Gazarian T, Rowley M, Majluf-Cruz A, Gazarian K. Collection of Phage-Peptide Probes for HIV-1 Immunodominant Loop-Epitope. *J. Microbiol. Methods*. **2007**; 68(2):225-35.
- Pallen MJ**, Beatson SA, Bailey CM. Bioinformatics, Genomics and Evolution of Non-flagellar type-III Secretion Systems: a Darwinian Perspective. *FEMS Microbiol. Rev*. **2005**; 29(2):201-29.
- Parham NJ**, Srinivasan U, Desvaux M, Foxman B, Marrs CF, Henderson IR. PicU, a Second Serine Protease Autotransporter of Uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett*. **2004**; 230(1):73-83.
- Parham NJ**, Pollard SJ, Desvaux M, Scott-Tucker A, Liu C, Fivian A, Henderson IR. Distribution of the Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae Among Extraintestinal Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol*. **2005**; 43(8):4076-82.
- Parreira VR**, Gyles CL. A Novel Pathogenicity Island Integrated Adjacent to the *thrW* tRNA Gene of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Encodes a Vacuolating Autotransporter Toxin. *Infect. Immun*. **2003**; 71(9):5087-96.
- Patel SK**, Dotson J, Allen KP, Fleckenstein JM. Identification and Molecular Characterization of EatA, an Autotransporter Protein of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. **2004**; 72(3):1786-94.
- Pereira AL**, Ferraz LR, Silva RS, Giugliano LG. Enteroggregative *Escherichia coli* Virulence Markers: Positive Association with Distinct Clinical Characteristics and Segregation into 3 Enteropathogenic *E. coli* Serogroups. *J. Infect. Dis*. **2007**; 195(3):366-74.
- Pohlner J**, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF. Gene Structure and Extracellular Secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA Protease. *Nature*. **1987**; 325(6103):458-62.
- Provence DL**, Curtiss R 3rd. Isolation and Characterization of a Gene Involved in Hemagglutination by an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. *Infect. Immun*. **1994**; 62(4):1369-80.
- Rajakumar K**, Sasakawa C, Adler B. Use of a Novel Approach, Termed Island Probing, Identifies the *Shigella flexneri* she Pathogenicity Island Which Encodes a Homolog of the Immunoglobulin A Protease-like Family of Proteins. *Infect. Immun*. **1997**; 65(11):4606-14.

- Rodi DJ**, Makowski L. Phage-display Technology-finding a Needle in a Vast Molecular Haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**; 10(1):87-93.
- Rowley MJ**, O'Connor K, Wijeyewickrema L. Phage display for Epitope Determination: a Paradigm for Identifying Receptor-ligand Interactions. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2004**; 10:151-88.
- Roy S, Thanasekaran K, Dutta Roy AR, Sehgal SC. Distribution of *Shigella* Enterotoxin Genes and Secreted Autotransporter Toxin Gene Among Diverse Species and Serotypes of *Shigella* Isolated from Andaman Islands, India. *Trop. Med. Int. Health.* 2006; 11(11):1694-8.
- Ruiz-Pérez F**, Henderson IR, Leyton DL, Rossiter AE, Zhang Y, Nataro JP. Roles of Periplasmic Chaperone Proteins in the Biogenesis of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* **2009**; 191(21):6571-83.
- Sainz T.**, Pérez J., Fresan M. C., Flores V., Jiménez L., Hernández U., Herrera I., and Eslava C. Histological Alterations and Immune Response Induced by Pet Toxin During Colonization with Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EAEC) in a Mouse Model Infection. *J. Microbiol.* **2002**; 40:91-97.
- Sali A**, Overington JP. Derivation of Rules for Comparative Protein Modeling from a Database of Protein Structure Alignments. *Protein. Sci.* **1994**; 3(9):1582-96.
- Salvadori MR, Yano T, Carvalho HE, Parreira VR, Gyles CL. Vacuolating Cytotoxin Produced by Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 2001; 45(1):43-51.
- Sambrook J.** and Russell DW, **2001**. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York,
- Sandkvist M.** Biology of type II Secretion. *Mol. Microbiol.* **2001a**; 40(2):271-83.
- Sandkvist M.** Type II Secretion and Pathogenesis. *Infect. Immun.* **2001b**; 69(6):3523-35.
- Sandt CH**, Hill CW. Four Different Genes Responsible for Nonimmune Immunoglobulin-Binding Activities within a Single Strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **2000**; 68(4):2205-14.
- Schmidt H**, Zhang WL, Hemmrich U, Jelacic S, Brunder W, Tarr PI, Dobrindt U, Hacker J, Karch H. Identification and Characterization of a Novel Genomic Island Integrated at selC in Locus of Enterocyte Effacement-negative, Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **2001**; 69(11):6863-73.
- Scott JK**, Smith GP. Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library, *Science.* **1990**, 249(4967):386-90.
- Serruto D**, Adu-Bobie J, Scarselli M, Veggi D, Pizza M, Rappuoli R, Aricò B. *Neisseria meningitidis* App, a New Adhesin with Autocatalytic Serine Protease Activity. *Mol. Microbiol.* **2003**; 48(2):323-34.
- Sijbrandi R**, Urbanus ML, Ten Hagen-Jongman CM, Bernstein HD, Oudega B, Otto BR, Luirink J. Signal Recognition Particle (SRP)-mediated Targeting and Sec-dependent Translocation of an Extracellular *Escherichia coli* Protein. *J. Biol. Chem.* **2003**; 278(7):4654-9.
- Smith GP.** Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors that Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science.* **1985**; 228(4705):1315-7.
- Smith GP**, Scott JK. Libraries of Peptides and Proteins Displayed on Filamentous Phage. *Methods Enzymol.* **1993**; 217:228-57.
- Smith GP**, Petrenko VA. Phage display. *Chem. Rev.* **1997**, 97(2):391-410.
- Stathopoulos C**, Provence DL, Curtiss R 3rd. Characterization of the Avian Pathogenic *Escherichia coli* Hemagglutinin Tsh, a Member of the Immunoglobulin A protease-type Family of Autotransporters. *Infect. Immun.* **1999**; 67(2):772-81.

- Stein M**, Kenny B, Stein MA, Finlay BB. Characterization of EspC, a 110-kilodalton Protein Secreted by Enteropathogenic *Escherichia coli* which is Homologous to Members of the Immunoglobulin A Protease-like Family of Secreted Proteins. *J. Bacteriol.* **1996**; 178(22):6546-54.
- Szabady RL**, Peterson JH, Skillman KM, Bernstein HD. An Unusual Signal Peptide Facilitates Late Steps in the Biogenesis of a Bacterial Autotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2005**; 102(1):221-6.
- Thanassi DG**, Hultgren SJ. Multiple Pathways Allow Protein Secretion Across the Bacterial Outer Membrane. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2000**; 12(4):420-30.
- Thompson JD**, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**; 22(22):4673-80.
- Towbin H**, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1979**; 76(9):4350-4.
- Troisfontaines P, Cornelis GR. Type III Secretion: More Systems Than you Think. *Physiology (Bethesda).* **2005**; 20:326-39.
- Velarde JJ**, Nataro JP. Hydrophobic Residues of the Autotransporter EspP Linker Domain are Important for Outer Membrane Translocation of its Passenger. *J. Biol. Chem.* **2004**; 279(30):31495-504.
- Vidal JE**, Navarro-García F. EspC Translocation into Epithelial Cells by Enteropathogenic *Escherichia coli* Requires a Concerted Participation of type V and III Secretion Systems. *Cell. Microbiol.* **2008**; 10(10):1975-86.
- Villaseca JM**, Navarro-García F, Mendoza-Hernández G, Nataro JP, Cravioto A, Eslava C. Pet Toxin from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Produces Cellular Damage Associated with Fodrin Disruption. *Infect. Immun.* **2000**; 68(10):5920-7.
- Villaseca JM**, Hernández U, Sainz-Espuñes TR, Rosario C, Eslava C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* an Emergent Pathogen with Different Virulence Properties. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **2005**; 47(3-4):140-59.
- Voulhoux R**, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J. Role of a Highly Conserved Bacterial Protein in Outer Membrane Protein Assembly. *Science.* **2003**; 299(5604):262-5.
- Wang LF**, Yu M. Epitope Identification and Discovery Using Phage display Libraries: Applications in Vaccine Development and Diagnostics. *Curr. Drug. Targets.* **2004**; 5(1):1-15.
- Xu Y**, Ramsland PA, Davies JM, Scealy M, Nandakumar KS, Holmdahl R, Rowley MJ. Two Monoclonal Antibodies to Precisely the Same Epitope of Type II Collagen Select Non-crossreactive Phage Clones by Phage display: Implications for Autoimmunity and Molecular Mimicry. *Mol. Immunol.* **2004**; 41(4):411-9.
- Yang JY**, Kim K, Jayaram M, Harshey RM. A Domain Sharing Model for Active Site Assembly Within the Mu A Tetramer During Transposition: the Enhancer may Specify Domain Contributions. *EMBO J.* **1995**; 14(10):2374-84. 596.
- Yao ZJ**, Kao MC, Loh KC, Chung MC. A Serotype-specific Epitope of Dengue Virus 1 Identified by Phage displayed Random Peptide Library. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**; 127(1-2):93-8.
- Yen YT**, Kostakioti M, Henderson IR, Stathopoulos C. Common Themes and Variations in Serine Protease Autotransporters. *Trends Microbiol.* **2008**; 16(8):370-9.
- Yip YL**, Ward RL. Epitope Discovery Using Monoclonal Antibodies and Phage Peptide Libraries. *Comb. Chem. High. Throughput. Screen.* **1999**; 2(3):125-38.



## Peptide sequences identified by phage display are immunodominant functional motifs of Pet and Pic serine proteases secreted by *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*

Hernández-Chiñas Ulises<sup>a</sup>, Gazarian Tatiana<sup>b</sup>, Gazarian Karlen<sup>b</sup>, Mendoza-Hernández Guillermo<sup>c</sup>, Xicohtencatl-Cortes Juan<sup>d</sup>, Eslava Carlos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Posgrado, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Infectología, Hospital Infantil de México, Federico Gómez, México D.F., Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 May 2009

Received in revised form 14 September 2009

Accepted 15 September 2009

Available online 20 September 2009

#### Keywords:

*Escherichia coli*

*Shigella*

SPATEs

Phage display

Immunodominant epitopes

Mimotopes

### ABSTRACT

Plasmid-encoded toxin (Pet) and protein involved in colonization (Pic), are serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs) secreted by enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), which display the GDSGSG sequence or the serine motif. Our research was directed to localize functional sites in both proteins using the phage display method. From a 12mer linear and a 7mer cysteine-constrained (C7C) libraries displayed on the M13 phage pIII protein we selected different mimotopes using IgG purified from sera of children naturally infected with EAEC producing Pet and Pic proteins, and anti-Pet and anti-Pic IgG purified from rabbits immunized with each one of these proteins. Children IgG selected a homologous group of sequences forming the consensus sequence, motif, PQPxK, and the motifs PGxI/LN and CxPDDSSxC were selected by the rabbit anti-Pet and anti-Pic IgGs, respectively. Analysis of the amino terminal region of a panel of SPATEs showed the presence in all of them of sequences matching the PGxI/LN or CxPDDSSxC motifs, and in a three-dimensional model (Modeller 9v2) designed for Pet, both these motifs were found in the globular portion of the protein, close to the protease active site GDSGSG. Antibodies induced in mice by mimotopes carrying the three aforementioned motifs were reactive with Pet, Pic, and with synthetic peptides carrying the immunogenic mimotope sequences **TYPGYIN**HSKA and **LLPQPPK**LLLP, thus confirming that the peptide moiety of the selected phages induced the antibodies specific for the toxins. The antibodies induced in mice to the PGxI/LN and CxPDDSSxC mimotopes inhibited fodrin proteolysis and macrophage chemotaxis biological activities of Pet. Our results showed that we were able to generate, by a phage display procedure, mimotopes with sequence motifs PGxI/LN and CxPDDSSxC, and to identify them as functional motifs of the Pet, Pic and other SPATEs involved in their biological activities.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Serine proteases constitute one-third of all reported proteases. Studies on the activity of these enzymes show different effects of serine proteases on eukaryotic cells. According to their structural similarities, serine proteases have been classified into 36 families, which are in turn grouped into 15 clans (<http://merops.sanger.ac.uk>). The serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*

(SPATEs) which have been defined as virulence factors, use the Type V system of secretion, are integrants of the subfamily of IgA serine protease family from the chymotrypsin-like clan. *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp. and *Citrobacter* sp. are some of the bacteria which produce these proteases [30,44,46]. Their common characteristics are: (i) the translocation to periplasmic space is associated to a signal sequence in the amino terminal portion and related with the *secA* secretion apparatus; (ii) their enzyme active site is located in the middle of the passenger domain, and formed by the amino acids: histidine (catalytic base) asparagine (electrophilic) and the first serine of the GDSGSG motif (nucleophilic), similar to that described for the chymotrypsin clan [11]; in addition, this active site has been related to the different properties described to the SPATEs [7,20,46]; (iii) the third domain or  $\beta$ -barrel is located in the C-terminal region of the protein and is

\* Corresponding author at: Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Post Office Box 70-228, P.C. 04510, México D.F., Mexico.

E-mail addresses: [eslava@servidor.unam.mx](mailto:eslava@servidor.unam.mx), [carlos\\_01eslava@yahoo.com.mx](mailto:carlos_01eslava@yahoo.com.mx) (E. Carlos).

functionally implicated, together with some factors of the external membrane proteins (YaeT/Omp85), in SPATEs secretion [21].

Plasmid-encoded toxin (Pet) and protein involved in colonization (Pic) identified in enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and *Shigella flexneri* are members of the SPATEs [10,19], both with different biological properties. Pet shows enterotoxic and cytotoxic activity, and a fodrin-degrading effect [26,43]. Histological studies of mice intestine samples challenged with EAEC and from rat ileal loops inoculated with Pet, showed a strong inflammatory response [10,32]. It was recently shown that Pet induces a chemotaxis effect on mononuclear cells (preliminary data). Pic has been described as a protein that contributes to intestinal colonization, and induces mucine degradation, serum resistance [18,19], and hemoglobin disruption [27].

Dutta et al. [8], using random mutation assays on the passenger domain of Pet, identified the existence of domains to bind and internalize the protein into eukaryotic cells, and described their association with the bacterial secretion protein. Yen et al. [46], in a bioinformatic study of the SPATEs' structure, described conserved amino acid sequences in the passenger domain of these proteases, which seem to contribute to the structural and functional stability of SPATEs. Despite the large number of studies available on SPATEs, when we started this work, the literature lacked information on both, immunologically active epitopes and structural motifs associated with their biochemical and physiological properties [7,19,43,46].

Peptide selection from random libraries displayed on filamentous phage surface proteins pIII or pVIII, proposed by Smith and other researches from his group [31,35,37,38], is successfully employed for mimotope selection by means of antibodies and their use for localization of immunologically active sites (epitopes) in proteins, carbohydrates, lipids, and as individual epitope-mimicking antigens and immunogens [14,17,29]. In addition, phage display is a powerful high throughput methodology for drug design, discovery of peptide-mimetics of receptor ligands with agonistic and antagonistic activity [1,14], scaffold-based protein engineering [36], discovery of novel substrates [3], development of mimotope-based vaccines [16,23,39], and for research purposes and clinical applications [2].

In the present report we describe the identification by phage display of functional motifs of Pet and Pic, which we tentatively assigned to the N-terminal of the amino acid sequence of Pet, Pic and of other SPATE members. Once the three-dimensional model of the Pet molecule was obtained, these motifs were located in the globular region I, near the serine protease active site. Experiments with antibodies raised against the generated mimotopes displaying the motifs, showed that the mimicked protein sites may be implicated in the regulation of Pet biological functions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Pet and Pic purification

Pet and Pic toxins were purified from supernatants of the HB101(pCEF1) and HB101(p56) clones cultured in Luria (LB) medium as described by Villaseca et al. [43]. The EspC protein was provided by Dr. Angel Manjarrez; the protein concentration was determined by the Bradford method [43].

### 2.2. Serum preparation

Sera prepared from blood samples of 21 children (less than 5 years old) naturally infected with an EAEC (O? is a somatic antigen non determined (ND):H10) strain, and sera of rabbits (New Zealand) inoculated with Pet and Pic toxins, were prepared by standard procedure and analyzed by ELISA to select those showing a highest reactivity with Pet and Pic proteins. Briefly, Pet or Pic

(7 µg/ml in 100 µl PBS) was incubated overnight at 4 °C in a well of 96-well microplate, the surface of the well containing the bound protein was blocked with 2% (w/v) BSA–0.5% (w/v) dry milk in 100 µl PBS and incubated with serum 1:100 dilution. Anti-human or anti-rabbit second antibodies conjugated with alkaline phosphatase (Zymed, USA) at 1:1000 dilution and *p*-nitrophenylphosphate (Sigma–Aldrich, USA) were used to detect bound antibody in an ELISA Reader (MR 580; Dynatech) at 405 nm.

### 2.3. IgG purification

IgG was obtained from sera of patients and rabbits immunized with Pet or Pic that showed highest reactivity with these proteins. Protein G-agarose affinity chromatography was used as previously done [13]. Briefly, 250 µl of Protein G-agarose (Invitrogen, USA) were mixed with 500 µl of each serum, incubated for 20 min at room temperature (RT), mixing gently every 2 min, centrifuged for 30 s at 500 × *g* (Sorvall RC5), the supernatant was discarded and the IgG–Protein G-agarose complex washed five times by 0.1 M glycine, pH 9.0. After the last wash, the complex was dispersed in 750 µl of elution buffer (0.1 M glycine–HCl, pH 2.2) and centrifuged at 500 × *g* for 30 s. The supernatant containing purified IgG fraction was adjusted to pH 7.0 with 2 M Tris base. Protein concentration was determined by Bradford procedure.

### 2.4. Phage display libraries, biopanning, cloning and characterization of mimotopes

Peptide libraries, 12mer linear, and 7mer cysteine-constrained were purchased from New England BioLabs Inc. (Beverly, MA, USA). In each of them, random peptides (approximately  $2.7 \times 10^9$  electroporated sequences) are fused to a minor coat protein (pIII) of M13 phage and expressed at its N-terminus separated by Gly-Gly-Gly-Ser spacer. Shortly before use, libraries were amplified to have about 20 copies of each sequence per 10 µl, the amount used in single biopanning experiment.

Biopanning procedure as described in [6,38] with minor adjustments [29] was used. Two wells in a 96-well polystyrene microtiter plate (Immulon 4 flat bottom plates, Dynatech Lab Inc., USA) were coated with IgG fraction affinity purified from each serum. For this, one well was filled with 150 µg/ml IgG, the second one with 75 µg/ml IgG, each in 100 µl PBS, and the plate was kept overnight at 4 °C with gentle rocking. Unbound IgG was removed and wells were washed 6 times with 0.1% (v/v) Tween 20 in PBS (PBS-T) and blocked 1 h at 4 °C with blocking buffer (PBS–1% BSA), followed by five consecutive washing steps using PBS-T. For affinity selection, 10 µl of the library ( $2 \times 10^{10}$  plaque-forming units, p.f.u.) were added to 190 µl of PBS-T and the mixture distributed in the two wells (100 µl per well) with immobilized and blocked IgGs; the wells were incubated 1 h at RT while rocking gently to allow phage to bind. The unbound phage was pipetted out and wells were washed 10 times with PBS-T at RT. Bound phage was eluted from each well by stirring with 100 µl of elution buffer (0.1N HCl–glycine, pH 2.2). Eluted phage (designated further as “eluate”) from two wells was combined and quickly neutralized by addition of 35 µl of 2 M Tris base. Phage was grown on lag-phase *E. coli* ER2738 (BioLabs) on LB plates and the number of plaques was quantified to estimate the phage titer in p.f.u.; about 3/4th of the eluate was amplified in 30 ml of 2 × YT for 4 h. After pelleting the cells by centrifugation, PEG/NaCl (20%/40%) was added to supernatant (4 °C), the precipitated phage centrifuged at 6000 × *g*, 10 min, 4 °C (Sorvall RC), the pellet re-suspended in PBS and clarified by centrifugation at 6000 × *g*, 2 min, 4 °C (Sorvall RC); the supernatant was transferred to a fresh centrifuge tube for repeated phage precipitation with PEG/NaCl as described. The recovered phage was tittered as indicated above, re-suspended in PBS at

concentration  $10^{12}$ – $10^{13}$  p.f.u. per ml and used in the second and then in the third rounds of biopanning as described, with the difference that in the third round the stringency conditions in the washing with PBS-T were increased by using 0.5% (v/v) Tween-20 in PBS (instead of 0.1% used in the first two rounds) and that the eluted phage was not amplified and stored for short periods at 4 °C and for longer, in 50% glycerol at –70 °C.

### 2.5. Analysis of sequences and reactivity of cloned phage-peptides

An aliquot containing around 100 p.f.u. was taken from the third round eluate used to infect *E. coli* ER 2738 strain and plated in a Luria agar dish with Xgal-IPTG. After overnight growth at 37 °C individual plaques were randomly picked and amplified in 3 ml of 2× YT medium as described for the amplification of eluates in second and third rounds of biopanning. Amplified single-plaque phage ( $10^{12}$ – $10^{13}$  p.f.u.) representing individual clones (phagotopes) were used for further analysis. Two small samples were taken from each clone, one for purification of single-strand (ss) phage genomic DNA [34], the second for assessment of reactivity with selecting IgG. The rest of the clone was stored. The phage maintained viability for 3–4 months at 4 °C in PBS and for more than a year in 50% glycerol at –70 °C.

Using ssDNA isolated from each clone, we sequenced the 5'-region of the pIII gene with the inserted oligonucleotide using S<sup>35</sup>-labeled di-deoxy-nucleotide, primer (5'-CCAGACGTTAGTAAATG-3') and T7 sequenase (Amersham, Life Science, Cleveland, OH, USA); the amino acids were deduced from the nucleotide codons to obtain the sequence of the selected peptide.

For reactivity assessment, 96-well microtitration plates (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp F96, NUNC Broad Products, Roskilde, Denmark) were coated with 5 µg/ml of IgG (used for library screening) in 0.2% (w/v) BSA in PBS-T. The plates were incubated overnight at 4 °C, washed with PBS-T and blocked with 200 µl 1% (w/v) BSA in PBS during 2 h at RT. Plates were washed five times with PBS-T, then amplified phage clone ( $10^9$ – $10^{10}$  p.f.u.), in 200 µl, was added to bind to IgG. The IgG-phage reactivity was detected by adding an anti-M13-mAb-peroxydase conjugate, 1:5000 dilution (New England BioLabs, USA). The amount of the antibody-bound phage particles was estimated by adding 2',2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Sigma-Aldrich USA) substrate, incubation for 20 min at 37 °C, and reading of absorbance at 405 nm in an ELISA Reader (MR580, Dynatech). Phage clones, phagotopes, positive with the selecting IgG were investigated further to prove that they are mimics of Pet or Pic epitopes, mimotopes.

### 2.6. Antibody induction in mice by mimotopes

Female 3–4 weeks old C57BL mice were immunized as described initially by [12] and later on in our publications [14,19]. Briefly,  $10^{11}$ – $10^{12}$  p.f.u. of individual mimotopes or their combinations were administered intraperitoneally three times with 15-day intervals; then 12 days after the last booster, anaesthetized mice were used for blood collected by hart puncture. Sera prepared prior to (to serve as a control) and after the immunization were stored in aliquots at –20 °C until used. Experiments with animals were performed in accordance with the Mexican official standard NOM-062-ZOO-1999 (specific techniques to production, care, and use of laboratory animals). The specificity of the mice generated antibodies against the proteins Pet and Pic was analyzed by ELISA as was described previously (Section 2.2) with the next modifications. In this assay was included the EspC toxin and the mouse serum (100 µl) diluted 1:100 with 0.2% (w/v) BSA in PBS-T. As positive controls were used anti Pet, anti Pic or anti EspC rabbit antibodies also diluted 1:100. To identify the reaction, the wells were washed 3 times with PBS-T and then incubated with anti-

mouse or anti rabbit IgG (1:1000) alkaline phosphatase labeled. The reaction was visualized as previously was described.

### 2.7. Synthetic peptides

Two synthetic peptides carrying amino acid sequences of mimotopes (LLPQPPKLLLP, designated P1) and (PTYPGYINHASKAS, designated P2) were custom prepared (Bio-Synthesis, Lewisville, TX, USA). Reactivity against the peptides of sera from mice immunized with mimotopes (see above) was determined by ELISA as was described previously. For this, the peptides were dissolved in H<sub>2</sub>O and transferred into wells of a microplate plate (in concentration varying from 1 to 10 µg/ml) containing 0.2 M carbonate buffer, pH 9.5 in final volume of 100 µl, incubated overnight at 4 °C, and, after blocking with 2% (w/v) BSA–0.5% (w/v) dry milk in PBS, the plastic-bound peptide was incubated with mouse 1:100 dilution of either pre-immune or the immune mouse serum, followed by the Ab–Ag complex detection procedure described for the Pet and Pic proteins (see Section 2.2).

### 2.8. Computing procedures

With the Clustal W 1.83 program [40], the sequences of selected peptides were aligned with sequences of Pet, Pic and other SPATES for homology search. To determine the sites mimicked by peptide sequences on the tertiary structure level, a tri-dimensional model of Pet molecule was generated (Modeller 9v2) [33].

### 2.9. Fodrin degradation inhibition by sera

Sera of mice immunized with the mimotopes (see above) carrying the PDDSS or PGxl/LN motif sequences, were used to test their ability to neutralize the proteolysis caused by Pet on spectrin. The procedure was as previously described by Villaseca et al. [43]. Briefly, Pet (50 µg/ml) was first incubated in either PBS or PBS containing anti-PDDSS or anti-PGxl/LN IgGs for 3 h at 37 °C, and spectrin obtained from goat erythrocytes membrane was added for additional 6 h at 37 °C. Probes were separated by SDS-PAGE on 6% acrylamide gels [22], transferred to a nitrocellulose membrane (BioRad Laboratories, USA) and processed as described by Towin et al. [41]. The spectrin degradation was evaluated using rabbit antibodies (0.58 mg/ml) directed against to alfa and beta spectrin chains (Sigma-Aldrich, USA). The bound antibody was visualized by adding goat anti-rabbit antibodies conjugated to alkaline phosphatase and the substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitro blue tetrazolium liquid substrate system (BCIP/NBT).

### 2.10. Chemotaxis Inhibition

Morales et al. [24] described a procedure for chemotaxis via registering migration of inflammatory cells in a two-chamber (upper and lower) device. We (unpublished) adopted this system for Pet-induced chemotaxis of mononuclear (MN) cells and used to test the ability of mouse anti-mimotope sera to inhibit this activity. Ten ml blood was drawn from a healthy non-smoker adult donors (either gender), diluted two-fold with PBS, and 10 ml layered on 4 ml Ficoll-Hypaque gradient ( $\delta = 1.077$ , Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). After centrifugation (500 × g, 30 min, 18 °C), MN cells were collected from the gradient's interface, washed 3 times with PBS, examined microscopically. Preparations containing 92% ± 2% monocytes (the rest being lymphocytes) with viability ≥95% as determined by trypan blue exclusion stain were adjusted to have  $\sim 1 \times 10^6$  cells/ml and used in chemotaxis assay. Boyden double-filter chambers (Neuroprobe Corp., Bethesda, MD, USA), with polycarbonate filters (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA, USA) of 5.0 µm in the upper chamber and cellulose nitrate filters of 8.0 µm

**Table 1**  
Peptide sequences, frequency and binding of the selected phage clones to IgG-P3.

Clone	Amino acid sequence	Frequency (%)	ELISA <sup>a</sup>
P3-1	I L L P Q P P K L L L P	2 (7.2)	0.9 ± 0.05
P3-2	Q L T V P T P Q P P K P	2 (7.2)	1.4 ± 0.02
P3-3	H F G L G I L P Q P P K	2 (7.2)	0.7 ± 0.01
P3-4	S V E P Q P P K A D F H	1 (3.8)	2.1 ± 0.06
P3-5	T V L P Q P S K A L P L	1 (3.8)	1.8 ± 0.02
P3-6	L P N P Y P Q P S K V L	1 (3.8)	1.7 ± 0.04
P3-7 <sup>b</sup>	A P L P Q P N K P H L F	2 (7.2)	1.9 ± 0.01
P3-8	W s D P Q P Q K P A Q R	1 (3.8)	0.9 ± 0.009
P3-9	S I L P Q P A K P N s E	1 (3.8)	0.7 ± 0.01
P3-10	Q V L P H P T K A E H F	1 (3.8)	1.6 ± 0.04
P3-11	L V L P H P T K M I E S	1 (3.8)	0.7 ± 0.02
P3-12	A M p I P H P P K P R T	1 (3.8)	0.7 ± 0.01
P3-13	I V K P V P P K P R T	2 (7.2)	1.1 ± 0.01
Consensus sequence	<b>P Q/H P X K</b>	18 (69.2)	
P3-15	N L S H P M L S K P W V	1 (3.8)	ND
P3-16	H N W Y T H L L P P K	1 (3.8)	0.9 ± 0.03
P3-14	S Y I P V T P H A N G L	1 (3.8)	0.01
P3-17	I N T W N Y P T A N P H	1 (3.8)	0.01
P3-18	S W Q E S L N V P A V L	1 (3.8)	0.01
P3-19	V N N W E S R S P P P G	1 (3.8)	0.01
P3-20	H N N W S T H V V T L T	1 (3.8)	0.01
P3-21	G L S A L I A D L S P	1 (3.8)	0.01
Non-consensus sequences		8 (30.8)	

The binding reactivity of phage clones with IgG-P3 was evaluated by a capture ELISA assay as was described in Section 2. Frequency indicates the number of times as each sequence was independently isolated  $N=26$ . Consensus amino acid residues are highlighted in bold. ND: Non-determined.

<sup>a</sup> The ELISA  $A_{405}$  values are means ± S.D.

<sup>b</sup> Selected phagotopes for mice immunization.

(Sartorius GMBH, Gottingen, Germany) were used in the lower chamber as receptors of migrating cells. A suspension of approximately  $8 \times 10^5$  MN cells in 0.5 ml of Gey-Albumin (Gey's-A) was placed in the upper chamber. The lower chamber was filled with 20  $\mu$ g of Pet in 1.7 ml Gey's-A previously incubated during 3 h at 37 °C with 40  $\mu$ g of either rabbit anti-Pet serum or mice IgG obtained against mimotopes with motifs: PDDSS (Pic-6), or PQ/HPxK (P3-7) and PGxI/LN (Pet-1) shown in Tables 1 and 2. As positive controls, the chemo-attractant ZAS (Zymosan activated serum) or Pet (20  $\mu$ g) were used, and as negative control served Gey's-A alone. Chambers were incubated 90 min at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, the compartments were emptied and the filters removed. Cells attached to the lower compartment filters were fixed with 80% (v/v) ethanol, stained with Harris Hematoxylin–eosine and adhered on a glass slide with 60% (v/v) synthetic resin in xylol (Sigma Chemical Co.). Migration of MN was evaluated through visual inspection in a light microscope at 400× magnification. Two perpendicular diameters 10 camps were counted per filter. Cell's mobility was estimated as the mean number of MN cells that migrated to the lower chamber. The lectures were done independently by two observers; the assays were in duplicates, each run in a separate experiment.

### 2.11. Statistics

A Student's *t* test was used for confidence calculation taking probability of  $P < 0.05$  as a significant difference.

## 3. Results

### 3.1. Motifs selection

Serum IgG samples from three child patients and from Pet- and Pic-immunized rabbits were used for phage selection. After three biopanning rounds with the IgG preparations, 58 phagotopes clones

were obtained. Among these, 14 were selected by IgG-P1, 26 by IgG-P3 and 18 by IgG-P6. With the rabbit IgG, a total of 29 clones were obtained: 18 selected by IgG-Pet and 11 by IgG-Pic. In these biopanning experiments, only the IgG of patient 3 (IgG-P3) and the two rabbit IgGs (anti-Pet and anti-Pic) selected phages with similar amino acids forming motifs. Thus, of the 26 phagotopes sequences derived by patient IgG-P3, 18 of them (69.2%) presented the PQ/HPxK motif; the remaining 8 sequences showed no similarity to any other (Table 1). And, of the 18 phagotopes selected by the rabbit anti-Pet IgG, 14 (77.7%) presented the motif PGxI/L/Y/VN, and the other 4 sequences showed no homology (Table 2A). The panning of the same 12mer linear library with IgG-Pic yielded no motif, by contrast with the C7C mer-constrained library the sequences of 11 peptides from the third round panning showed all of them, albeit differing in three amino acid positions CxxDDSSxC. (marked with "x") to contain four identical amino acids, To validate this interesting finding, we sequenced 9 phage clones from the second biopanning round and found 7 (77.7%) to contain the same CxxDDSSxC insert (Table 2B), consistent with the previous data.

The ability of the phagotopes to react with the selected IgGs was tested by ELISA, and only clones carrying a motif sequence (PQ/HPxK, PGxI/L/Y/VN, or CxP/L/VDDSSxC) were found to be positive, permitting to regard them as mimotopes, peptide mimics of Pet or Pic epitopes that induced selected them antibodies in the patient and in the rabbits.

### 3.2. Peptide sequences are SPATEs motifs

Homology analysis with the Clustal W program of mimotopes and SPATEs amino acid sequences revealed that the PGxxN and PDDSS match sites in the amino terminal region of several members of the SPATEs family (Table 3), where the glycine of PGxxN is conserved in and the proline and asparagine are shared by most proteins except for the following "substitutions": in the EspC, EspP and Vat proteins P → A, in Pet N → H, in Pic and Sat N → D (Table 3). In the SPATEs sites mimicked by the mimotope PDDSS, the first aspartic acid and the first serine were conserved in all analyzed proteases, while the second aspartic acid was "substituted" by phenylalanine; the second serine was present in Pet, Pic, SepA, Vat, AidA, and Boa, but were "substituted" by hydrophobic amino acids proline, glycine or alanine in the other analyzed proteases.

With the Modeller 9v2 program, and using as a starting model the tertiary structure described for Hbp protease [28], we designed the three-dimensional structure version of Pet. In this model, the sequences PGxxN and PDDSS were identified in the globular region I of the molecule, just 11 Å apart from the serine protease active site GDSGSG.

### 3.3. Motif immunogenicity

To test whether the motif-bearing phages mimic Pet and Pic epitopes not only antigenically but immunogenically as well, C57Black mice were immunized with the mimotope clones: P3-7 displaying the sequence APLPQPNKPHLF, Pet-1 carrying the sequence TYPGYINHASKAS (Table 1), Pet-3 sequence HHTWPGYI-NYV (Table 2A) and Pic-6 CLLDSSSTC (Table 2B). Also we used the third round selection phages (P3-IIIr, Pet-IIIr and Pic-IIIr). After three immunizing inoculations, mouse sera were tested for reactivity with Pet and Pic proteins. The mimotopes induced in mice antibodies which reacted with both proteins three or more fold better than did the polyclonal (anti-Pet, anti-Pic) rabbit antibodies (Fig. 1). These results were interpreted as an indication that, even though the epitope(s) discovered by means of mimotopes in Pet and Pic are immunodominant (see Section 4), the mimicking them peptides-on-phage selected by their induced

**Table 2**

Peptide sequences, frequency and binding of the selected phage clones for IgG rabbit anti-Pet and anti-Pic.

Clone	Amino acid sequence	Frequency (%)	ELISA <sup>a</sup>	
(A) The binding reactivity of phage clones with anti-Pet antibodies was evaluated by a capture ELISA assay as described in Section 2. Frequency indicates the number of times as each sequence was independently isolated $N=18$ . Consensus amino acid residues are highlighted in bold				
Pet-1 <sup>b</sup>	T Y <b>P G Y I N</b> H S K A S	2 (11.7)	0.5 ± 0.02	
Pet-2	T I <b>P G Y I N</b> W R G G P	2 (11.7)	0.2 ± 0.01	
Pet-3 <sup>b</sup>	H H T W <b>P G Y I N</b> Y V	1 (5.8)	0.4 ± 0.07	
Pet-4	Q G I H P Y <b>P G Y I N</b> H	1 (5.8)	0.6 ± 0.01	
Pet-5	Q A <b>P G W I N</b> V P P I E	1 (5.8)	0.09 ± 0.04	
Pet-6	N H Q Y Y Q V <b>P G S I N</b>	1 (5.8)	0.3 ± 0.06	
Pet-7	T H H T S W <b>P G Q I N</b> S	1 (5.8)	0.1 ± 0.02	
Pet-8	S H H Q N M V <b>P G S L N</b>	1 (5.8)	0.01 ± 0.002	
Pet-9	E D Y R H S R <b>P G R L N</b>	1 (5.8)	0.01 ± 0.03	
Pet-10	Q F <b>P G F Y N</b> S S P P Y	1 (5.8)	0.76 ± 0.01	
Pet-11	S H T T G V <b>P G S V N</b> H	1 (5.8)	0.4 ± 0.04	
Pet-12	M L <b>P G W Y N</b> S L Q S R	1 (5.8)	0.3 ± 0.02	
Consensus sequence	<b>P G</b> x I/L/Y/V <b>N</b>	14 (77.7)		
Pet-13	T F F P S T P G P R Y T	2 (11.7)	0.3 ± 0.07	
Pet-14	H L N K D A N L S F A W	1 (5.8)	0.07 ± 0.04	
Pet-15	Y L R A P P Q W L T N T	1 (5.8)	0.01	
Non-consensus sequences		4 (23.3)		
Round	Clone	Amino acid sequence	Frequency (%)	ELISA <sup>a</sup>
(B) Phage clones selected for IgG anti-Pic in II and III biopanning round. The binding reactivity of phage clones with anti-Pic antibodies was evaluated by a capture ELISA assay as was described in Section 2. Frequency indicates the number of time as each sequence was independently isolates. $N=11$ for III round and $N=9$ for II round, consensus amino acid residues are highlighted in bold. ND: Non-determined				
III	Pic-1	C N <b>P D D S S</b> M C	1 (9.0)	1.6 ± 0.028
III	Pic-2	C S <b>P D D S S</b> M C	1 (9.0)	1.4 ± 0.18
III	Pic-3	C S <b>P D D S S</b> T C	3 (27.2)	0.6 ± 0.06
III	Pic-4	C S <b>P D D S S</b> A C	1 (9.0)	ND
III	Pic-5	C V <b>P D D S S</b> T C	1 (9.0)	0.77 ± 0.02
III	Pic-6 <sup>b</sup>	C L L <b>D D S S</b> T C	2 (18.1)	0.98 ± 0.07
III	Pic-7	C T L <b>D D S S</b> T C	1 (9.0)	0.74 ± 0.04
III	Pic-8	C S V <b>D D S S</b> L C	1 (9.0)	0.72 ± 0.03
Consensus sequence		<b>C x P/L/V D D S S x C</b>	11 (100)	
II	Pic-9	C S P <b>D D S S</b> T C	1	ND
II	Pic-10	C A P <b>D D S S</b> T C	1	ND
II	Pic-11	C T L <b>D D S S</b> T C	2	ND
II	Pic-12	C L A <b>D D S S</b> T C	1	ND
II	Pic-13	C I <b>D D S S</b> M S C	1	ND
II	Pic-14	C A H R <b>D D S S</b> C	1	ND
Consensus sequence		<b>C x x D D S S x C</b>	7 (77.7)	
II		C T Y A L L S S C	1	ND
II		C V P N Y K N Q C	1	ND
Non-consensus sequence			2 (22.3)	

<sup>a</sup> The ELISA  $A_{405}$  values are means ± S.D.<sup>b</sup> Selected phagotopes for mice immunization.

antibodies were even more immunogenic. Notably, when the same mouse antibodies were tested for reactivity with EspC protease, highly homologous to Pet [10], reactivity of the mouse sera was significantly lower ( $P < 0.05$ ) than with the anti-Pet and anti-Pic sera (Fig. 1). These results demonstrated that the phage display mimotopes identified antigenically and immunogenically active epitopes on Pet and Pic.

### 3.4. Antibodies induced in mice by mimotopes recognized synthetic peptides carrying their sequences

Synthetic peptides with the sequences LLPQPPKLLLP (P1) and PTYPGYINHSKAS (P2) of two mimotopes used for immunization in the above experiments were prepared to test whether they would be recognized by the sera SPet-1, SPet-3 and SPet-IIIr (raised against mimotopes of the motif group PGxI/LN), by the sera SP3-7 or SP3-IIIr (against mimotopes PGPxK). All these sera recognized peptides P1 and P2 much better than did the pooled preimmune sera. Synthetic peptides at growing concentrations (1, 2, 4, 6, 8 and 10  $\mu\text{g/ml}$ ) were permitted to interact with the above mice sera (dilution: 1:100) in a

standard direct ELISA format (see Section 2). With the 10  $\mu\text{g/ml}$  peptide concentration, the OD values of the five tested sera were equal or above 0.8, while they showed a two-fold lower level with the preimmune serum (Fig. 2). These levels were maintained along concentrations up to 6  $\mu\text{g/ml}$ . Subsequently, the OD values of the immune sera increased to double the initial difference from the control. Given the two-to-four-fold higher reactivity shown by all anti-mimotope mouse (immune) sera compared to the preimmune serum, we reached the tentative conclusion that sera of mice immunized with mimotopes recognized the synthetic peptides carrying their sequences, indicating that the peptide moiety of the mimotopes and not phage proteins were the immunogens that induced these antibodies in mice. These mouse sera were then tested for the ability to neutralize the two known biological activities of Pet, fodrin degradation and chemotaxis.

### 3.5. Neutralization assays

Fodrin degradation is a biological activity described for Pet and has been associated to the presence in the protein of the serine

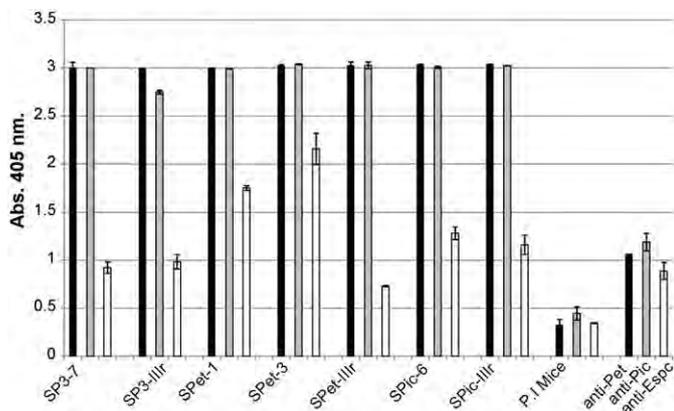
**Table 3**  
Homology of the identified motifs in different SPATEs.

SPATEs	Bacteria	Amino acid sequence analysis										Catalytic Triad	Reference <sup>a</sup>														
		P G X X N					P D D S S																				
Pet	EAEC	73	G	V	F	Q	P	G	S	T	H	V	K <sup>83</sup>	97	L	P	V	P	D	F	S	S	A	T	A <sup>107</sup>	H <sup>124</sup> D <sup>153</sup> GDS <sup>260</sup> GS	AAC26634
Sat	EAEC, UPEC	74	G	V	F	Q	P	G	S	T	D	V	K <sup>84</sup>	98	L	P	V	P	D	F	S	G	A	T	A <sup>108</sup>	H <sup>125</sup> D <sup>153</sup> GDS <sup>260</sup> GS	AAN82067
Pic	EAEC <i>Shigella flexneri</i>	65	G	L	F	V	P	G	A	N	D	I	P <sup>75</sup>	90	A	P	M	A	D	F	S	S	V	S	S <sup>100</sup>	H <sup>127</sup> D <sup>155</sup> GDS <sup>258</sup> GS	AFO97644
Tsh	UPEC, APEC	72	G	M	F	R	P	G	A	T	N	I	A <sup>82</sup>	97	A	A	M	P	D	F	S	A	V	D	S <sup>107</sup>	H <sup>125</sup> D <sup>153</sup> GDS <sup>259</sup> GS	AAAN82067
Hbp	Human septic <i>E. coli</i>	62	G	M	F	R	P	G	A	T	N	I	A <sup>72</sup>	87	A	A	M	P	D	F	S	A	V	D	S <sup>97</sup>	H <sup>125</sup> D <sup>153</sup> GDS <sup>259</sup> GS	CAA11507
SepA	<i>Shigella flexneri</i>	76	G	Q	F	T	P	G	T	T	N	I	S <sup>86</sup>	101	A	P	M	A	D	F	S	S	A	T	I <sup>111</sup>	H <sup>134</sup> D <sup>162</sup> GDS <sup>268</sup> GS	AAL72309
SigA	<i>Shigella flexneri</i>	75	G	E	F	R	P	G	A	T	N	V	Q <sup>85</sup>	99	L	P	V	P	D	F	S	A	V	S	N <sup>109</sup>	H <sup>126</sup> D <sup>154</sup> GDS <sup>258</sup> GS	AAP18272
EspC	EPEC	74	G	V	F	K	A	G	A	T	N	V	S <sup>84</sup>	98	V	P	I	P	D	F	S	P	A	N	K <sup>108</sup>	H <sup>125</sup> D <sup>153</sup> GDS <sup>256</sup> GS	AAC44731
EspP	EHEC	76	G	I	F	Q	A	G	A	T	N	I	E <sup>86</sup>	100	V	P	F	P	D	F	S	P	V	A	N <sup>110</sup>	H <sup>127</sup> D <sup>156</sup> GDS <sup>263</sup> GS	AAZ76514
Vat	APEC	65	G	Q	F	Q	A	G	A	T	N	I	P <sup>75</sup>	90	A	P	M	V	D	F	S	S	V	N	V <sup>100</sup>	H <sup>129</sup> D <sup>150</sup> GDS <sup>260</sup> GS	ABI99757
AidA	ETEC	69	G	L	F	T	P	G	A	T	N	I	A <sup>79</sup>	94	A	P	M	A	D	F	S	S	A	T	I <sup>104</sup>	H <sup>124</sup> D <sup>165</sup> GDS <sup>270</sup> GS	ZP_00714135
Boa	<i>Salmonella bolgori</i>	67	G	Q	F	T	P	G	S	L	N	I	P <sup>77</sup>	92	A	P	M	P	D	F	S	S	A	N	H <sup>102</sup>	H <sup>112</sup> D <sup>158</sup> GDS <sup>264</sup> GS	AAW66606

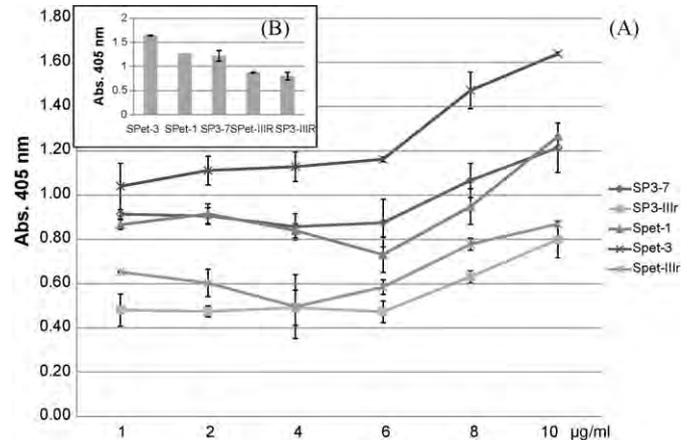
With the clustal W program, the obtained consensus sequences were searched within the linear sequences of different SPATEs. Bacteria, specific SPATE and the amino acid position within each sequence are shown. Abbreviations: EAEC, Enteroaggregative *E. coli*; UPEC, uropathogenic *E. coli*; APEC, avian pathogenic *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*; EHEC, enterohemorrhagic *E. coli*; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*. <sup>a</sup>No. of access NCBI.

protease GDSGSG motif [8]. In the performed assay, the IgG obtained from mice immunized with the phage clones expressing motifs CxPDDSSxC and PGxI/LN, partially inhibited fodrin degradation by Pet (Fig. 3). This suggests inhibition via a spatial impediment that may be due to the location of both, the epitope(s) and the active enzyme center represented by the GDSGSG, in the same globular region I of the protein, which are very close to each other (Fig. 4).

The second biological activity of Pet, the induction of macrophage chemotaxis currently under the study, was also affected by antibodies of sera (SPet-1 and SPic-4) of mimotope-immunized mice. In this a chemotaxis inhibition of 80% of macrophage migration was observed with both antibodies



**Fig. 1.** Serum reactivity of immunized mice with different phagotopes against Pet, Pic and EspC analyzed by ELISA test. Microtitre 96-well plates were coated with 0.8 µg of Pet (black bars), Pic (grey bars) and EspC (white bars). Mice serum anti-PQPxK (SP3-7, SP3-IIIr), anti-PGxI/LN (SPet-1, SPet-3, SPet-IIIr), anti-CxPDDSSxC (SPic-6, SPic-IIIr), preimmune (P.I.), or polyclonal rabbit serum anti-Pet, anti-Pic or anti-EspC, were added to each well to evaluate the serum reactivity against the different SPATEs. The reaction was developed with mice or rabbit anti-IgG peroxidase labeled.

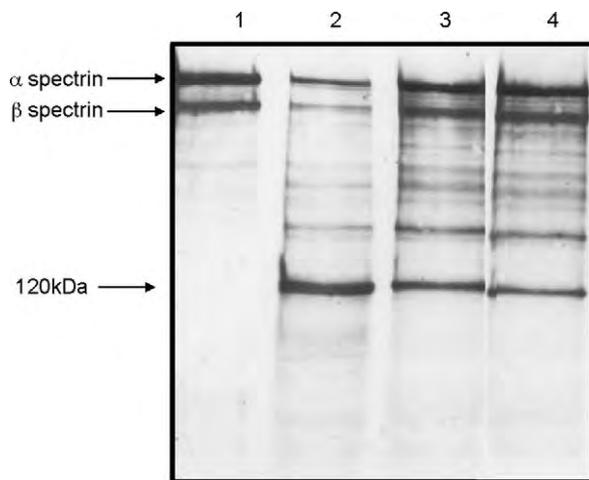


**Fig. 2.** Reactivity of serum samples from immunized mice with different phagotopes against two designed synthetic peptides. Serum reactivity of anti-PGxI/LN [SPet-1 (▲), SPet-3 (×), SPet-IIIr (\*)] or anti-PQPxK [SP3-7 (◇), SP3-IIIr (■)] was evaluated against different concentrations (1, 2, 4, 6, 8 or 10 µg/ml) of the synthetic peptides TYPGYINHSKAS (P1) or ILLPQPPKLLLP (P2) respectively. The serum reactivity was homogeneous at low peptide concentrations (2–6 µg/ml) and it is increasing from 8 to 10 µg/ml (A). SPet-3 (×) was the serum with the high reactivity at 10 µg/ml of peptide concentration (B). The preimmune serum response was adjusted to 0 in the different lectures.

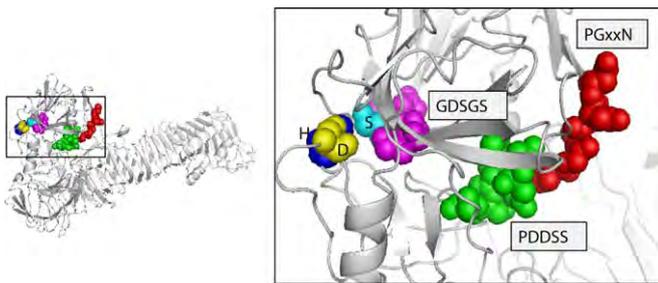
(Fig. 5). On the other hand under similar conditions, the anti PQPxK (SP3-7) serum only diminished the chemotaxis by about 45%. The inhibition percentage was compared considering the effect induced by Pet alone (taken as 100%).

**4. Discussion**

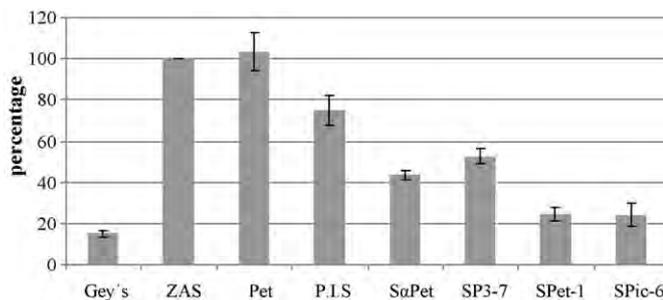
SPATEs are a class of proteins secreted by the type V secretion system. Most of these proteins are virulence factors involved in bacterial pathogenesis [10,20,43,46]. Their synthesis, pathways of



**Fig. 3.** Neutralization assay of Pet induced spectrin degradation using mice antibodies anti-CxPDDSSxC or anti-PGxl/LN motifs. Western blot of erythrocyte membranes treated with 5  $\mu$ g of Pet protein. The reaction was visualized with mouse anti-alpha and anti-beta spectrin. Lanes (1) erythrocyte membranes; (2) erythrocyte membranes Pet treated; (3) erythrocyte membranes treated with Pet previously incubated with anti-CxPDDSSxC antibodies; (4) erythrocyte membrane treated with Pet previously incubated with anti-PGxl/LN. A partial decrease of  $\alpha$  and  $\beta$  fodrin chains degradation is observed with both antibodies.



**Fig. 4.** Tri-dimensional structure designed for Pet and localization of PDDSS and PGXXN motifs. Using the Modeller 9v2 program and Hbp described structure, the tri-dimensional Pet structure was designed. The motifs  $^{77}$ PGxxN $^{81}$  (red),  $^{100}$ PDDSS $^{104}$  (green) were localized at 11 Å from the catalytic site  $^{258}$ DGSGSG $^{262}$  (magenta). The triad histidine $^{124}$  (blue), asparagine $^{183}$  (yellow) and serine $^{260}$  (cyan), is also showed in the model. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)



**Fig. 5.** Mice antibodies obtained against PQPxK, PGxl/LN or CxPDDSSxC motifs, caused inhibition of macrophages chemotaxis induced by Pet. Mononuclear cells (MN) chemotaxis induced by Pet was analyzed by Boyden chambers assay, as negative and positive controls were used Gay's solution and Zymosan respectively. MN migration inhibition from 50% to 80% was observed when Pet was previously incubated with rabbit polyclonal anti-Pet (SαPet) or from mice anti-PQPxK (SP3-7), anti-PGxl/LN (SPet-1), anti-CxPDDSSxC (SPic-6). A  $P < 0.05$  value was obtained with SαPet, SPet-1 and Spic-6 comparing the obtained results with the pre immune serum (P.I.S.).

secretion, and cytopathogenic effects on intestinal mucosa, molecular structure, localization of the serine protease active center, and their involvement in the bacterial toxicity have been subjects of study in the course of last two decades. Dutta et al. [8],

studying the effects of random mutations, revealed in the Pet passenger domain, three functionally different regions: protease activity, cellular internalization and secretion. Yen et al. [46] performed a comprehensive comparative bioinformatic analysis of the amino acids in the same passenger domain, and determined that 14% of them are highly conserved along evolution, a property that usually marks functionally important structural protein sites. Fink et al. [11], in a study based on point mutations of the gene *hap* (serine protease from *Hemophilus influenzae*), proposed that the catalytic triad formed by histidine, asparagine and serine confers to SPATEs their proteolytic capacity, and Otto et al. [28] showed in the tertiary structure of another SPATE the Hbp (hemoglobine protease), that this catalytic triad is located on the globular portion (I) of the passenger domain. With these and other data [7,10,19,21,32,43], the structure-function relationships in the SPATEs molecules have been basically elucidated.

Since 1998, after the discovery of Pet [10] and Pic [19], information obtained by Eslava and co-workers [32,43,44], and by other groups [26], has contributed to the better understanding of the biology and pathogenic potential of these and other serine proteases [7,21,25,30]. In the present study, a previously used [14,15,17,29,36] phage display mimotope generation approach was applied for the first time to Pet and Pic, with the objective of identifying novel functional elements in these molecules. The rationale for the present work emerged from our knowledge that sera from EAEC (Pet and Pic producers) infected children suffering from diarrhea, were found to be reactive to Pet and Pic in various ELISA and Western blot settings [10]. This was the first observation of this kind, indicating that Pet and Pic, which are thought to be associated to the pathogenesis of EAEC, are themselves immunogenic, and that the antibodies they elicit can be detected in sera. Therefore, we decided to explore the possibility of selection by means of these serum antibodies peptide mimics of the putative Pet and Pic epitopes from phage-displayed random peptide libraries. In order to ensure that the Pet and Pic toxins are potent immunogens, and that antibodies against them can be detected under experimental immunization conditions, we inoculated rabbits with purified Pet and Pic preparations. Sera from patients and immunized rabbits tested by ELISA and Western blotting repeatedly demonstrated the existence of antibodies against Pet and Pic. The fact that reactivity was detected in the IgG immunoglobulin fraction purified from sera, and that this reactivity was clearly detectable in Western blot assay, indicated that the interaction between Pet and Pic with serum antibodies, and no other substances, emitted the signals in those assays. This amounts to a demonstration of immunogenicity of these two SPATE family representatives, opening an avenue for the exploration of this property with various purposes, such as the identification of novel functional sites on these molecules and the search for diagnostic and protective peptides among mimotopes selected by anti-Pet and/or anti-Pic serum antibodies from phage/peptide libraries.

Importantly, the phage display method permits the selection of single epitope-mimicking peptides by library screening not only with monoclonal [14] but also with polyclonal [4,5,9,17,29,42,45] antibodies, as was done here with anti-Pet and anti-Pic IgGs and elsewhere. On this respect, in a previous study with IgG purified from sera of HIV-1-infected patients, we selected a family of 21 CxxKxxC motif mimotopes of the most immunodominant viral epitope, GSGKLLIC, located on the apex of the envelope gp41 transmembrane protein [29]. Obtaining single-epitope-representative mimotopes from a random library by means of polyclonal serum is conditioned by the limited sample analysis of the selected library (less than 100 phages i.e. <0.0001%) of the whole population of the  $\sim 10^8$  phages recovered after three biopanning rounds. In such small portion of selected library only peptides

selected by antibody of the most immunodominant epitope is normally found. In another study, using IgG purified from serum of rabbits immunized with *Fasciola hepatica*-produced cathepsin L, a single motif-bearing mimotopes were selected, which, when injected into sheep and challenged with the parasite, led to decreased infection [42]. Non-immune serum does not usually contain antibodies elicited by immunodominant epitopes; they are normally induced by pathogen epitope whose antibodies dominate in serum above levels of non-immunodominant and steady-state immunoglobulins. Peptides selected by such non-prevalent antibodies do not appear in the small sample that is sequenced. Besides even pathogen-induced antibodies may be inefficient in the mimotope selection requiring a preliminary testing of panels of sera for reactivity with pathogen or its purified protein(s) and chose those with highest reactivity [38]. Such pre-chosen reactive sera are efficient selectors of families of homologous sequences that present motif(s) matching the epitope sequence. In our study were used to mimotopes selection the 12mer linear and a C7Cmer-constrained libraries. The latter presents all peptides in cyclic configuration able to mimic conformation-prone epitopes. Depending on the type of the epitope (discontinuous, semi-conformational, highly conformational), one of the libraries becomes more suitable in yielding its mimics (in some our biopanning experiments), both types of libraries may derive epitope mimics [13]. In the present experiments, the 12mer library yielded meaningful motif sequences only with the anti-Pet IgG and the C7Cmer-constrained library worked well with the anti-Pic IgG. Some patient sera, despite showing significant reactivity with both Pet and Pic in the preliminary assays, did not select mimotope groups and were not described.

Different families of homologous sequences or motifs, were selected by each one of the three different IgGs used: with patient IgG P3 and rabbit anti-Pet IgG we selected the PQPxK and the PGxI/LN respectively, both for the Pet protein (Tables 1 and 2A). With rabbit anti-Pic IgG we selected another sequence (CxPDDSSxC) (Table 2B). The frequent presence of prolines in mimotopes should be emphasized and prompts further comments. Prolines that occur in mimotopes either, because they are critical epitope residues and frequently occurs when the epitopes are located in  $\alpha$ -helix or  $\beta$ -folding termini [5], or because the epitope contains a kink; the antibody searches for peptides with prolines (known to break the linearity of the main chain) simulating the epitope structure. Then such prolines despite not being involved in the binding function and may enhance the mimotope reactivity [9].

Another observation which needs an explanation is the observed three-fold higher reactivity of the sera of mice immunized with the mimotopes PQPxK, PGxI/LN and CxPDDSSxC as compared to the obtained with the patient and rabbit sera containing anti-Pet and anti-Pic antibodies. In fact, this is not usual for mimotopes, but, in theory, it may be expected because mimotopes represent a pure preparation of protein epitope mimics, free of many other immunotropic protein elements, some of which have immunomodulatory effects developed by pathogens to diminish or silence the immunodominant neutralizing epitopes. The great advantage of mimotopes as immunogens is that the epitope doses with them can be very high compared to the proteins. Mice are usually inoculated with  $10^{11}$ – $10^{12}$  phages each presenting to the immune system 3–5 peptides, i.e. up to  $5 \times 10^{12}$  pure epitope mimics, which being short peptides are already suitable structures for antigen-presenting cells.

Likewise using synthetic peptides with the mimotope sequences TYPGYINHASKAS and ILLPQPPKLLLP as pure antigens devoid of phage proteins, we observed that the mouse anti-mimotope sera reacted with them four-fold better than did the pre-immune serum. At the lowest used protein concentration of 10  $\mu$ g/ml, we observed a two-fold difference between the immune

and pre-immune sera (Fig. 2) pointing to the high affinity of the serum antibody for the synthetic peptides (with lower protein concentrations the difference is distorted due to enhanced variability of the O.D. measurements).

The final item we would like to discuss is the possible importance of the described mimotopes and their putative epitope(s) for neutralization of the Pet and Pic pathogenic effects. The presently described location of the epitopes mimicked by them in the globular region of Pet, near the active serine protease center marked by the DGSGS sequence, coincides well with the description by Yen et al. [46] of the conserved DFS motif in this region, both of them at the distance of about 11 Å from the DGSGS. The latter authors suggest that the DFS motif influences enzyme catalytic activity and in our study we show that sera of mice immunized with mimotopes were able to weaken both the Pet's proteolytic function (fodrin degradation) and the chemotactic attraction of mononuclear cells (Eslava et al., unpublished observations in ongoing experiments).

These concurring data allow the suggestion that the DFS and the motif(s) indicated by mimotopes in this study are parts of the same SPATEs structure, which may be involved in modulation of the serine protease function (e.g. by a yet unknown ligand), which, in addition, is recognized by the immune system as a most immunodominant epitope in the protein whose antibody can attack the protease active centre.

The importance of this site, either for the structural maintenance or the function, is stressed by the conservation in SPATEs of amino acid residues corresponding to the mimotope-presented motifs. Therefore, antibodies that can be induced by mimotopes in an organism infected with bacteria producing Pet and/or Pic (or other SPATEs in which the site is conserved) can behave as tools for immunoneutralization of toxin pathological effects.

## Acknowledgments

We thank Dr. Angel Manjarrez from the Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for donating the EspC. We acknowledge the valuable technical assistance by Guadalupe Rico and Sandoval-Eslava Victoria. This project was supported by PAPIIT IN202709 and CONACYT 82755 grants. Ulises Hernández thank to Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina UNAM.

## References

- [1] Adda CG, Anders RF, Tilley L, Foley M. Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 2002;5:1–14.
- [2] Azzazy HM, Highsmith WE. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 2002;35:425–45.
- [3] Barbas III CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. Phage display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
- [4] Chan SW, Nathan S. Epitope mapping of *Burkholderia pseudomallei* serine metalloprotease: identification of serine protease epitope mimics. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;43:37–44.
- [5] Deroo S, Kasmí KC, Fournier P, Theisen D, Brons NHC, Herrman M, et al. Enhanced antigenicity of a four-contact-residue epitope of the measles virus hemagglutinin protein by phage display libraries: evidence of a helical structure of putative active site. *Mol Immunol* 1998;35:435–43.
- [6] Dower WJ, Cwirla SE. Epitope mapping using libraries of random peptides displayed on phage. In: Wisdom GB, editor. Peptide antigens. A practical approach. New York: Oxford University Press; 1994. p. 219–43.
- [7] Dutta PR, Capello R, Navarro-García F, Nataro JP. Functional comparison of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *Infect Immun* 2002;70:7105–13.
- [8] Dutta PR, Sui BQ, Nataro JP. Structure analysis of the Enterotoxigenic *Escherichia coli* pasmid-encoded toxin autotransporter using scanning linker mutagenesis. *J Biol Chem* 2003;278:39912–20.
- [9] Eshaghi M, Tan WS, Ong ST, Yusoff K. Purification and characterization of Nipah virus nucleocapsid protein produced in insect cells. *J Clin Microbiol* 2005;43:3172–7.

- [10] Eslava C, Navarro-García F, Czeczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1998;66:3155–63.
- [11] Fink D, Cope LD, Hansen EJ, Geme JW. The *Hemophilus influenzae* Hap autotransporter is a chymotrypsin clan serine protease and undergoes autoproteolysis via an intermolecular mechanism. *J Biol Chem* 2001;276:39492–500.
- [12] Galfré G, Monaci A, Nicosia A, Luzzago F, Felici F, Cortes R. Immunization with phage-displayed mimotopes. *Methods Enzymol* 1996;109:267.
- [13] Gazarian KG, Gazarian TG, Solís CF, Hernández R, Shoemaker CB, Lalette JP. Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin. *Immunol Lett* 2000;72:191–5.
- [14] Gazarian TG, Selisko B, Gurrola GB, Hernández R, Possani LD, Gazarian KG. Potencial of peptides selected from random phage displayed libraries to mimic conformational epitopes a study on scorpion toxin Cn2 and the neutralizing monoclonal antibody BCF2. *Comb Chem High Throughput Screen* 2003;6:119–32.
- [15] Gazarian K. Drug discovery and design high throughput screening of combinatorial phage display protein–protein libraries. In: Caldwell G, Springer B, Atta-u-Rahman, editors. *Frontiers in drug design and discovery*, vol. 1. Bentham Science Publishers; 2005. p. 29–67.
- [16] Gazarian KG, Gazarian T, Hernández R, Possani LD. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine* 2005;23:3357–68.
- [17] Gevorkian G, Segura E, Acero G, Palma J, Espitia C, Manoutcharian K, et al. Mimotopes of *Micobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. *Biochem J* 2005;387:411–7.
- [18] Harrington SM, Sheikh J, Henderson IR, Ruiz-Perez F, Cohen P, Nataro JP. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun* 2009;77:2465–73.
- [19] Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999;67:5587–96.
- [20] Henderson IR, Navarro-García F, Desvaux M, Fernandez RC, AláAldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:692–744.
- [21] Jong WSP, Hagen Jongman CM, Blaauwen T, Slotboom DJ, Tame JRH, Wickstrom D, et al. Limited tolerance towards folded elements during secretion of the autotransporter Hpb. *Mol Microbiol* 2007;65:1524–36.
- [22] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;22:680–3.
- [23] Meola A, Delmastro P, Monaci P, Luzzago A, Nicosia A, Felici F, et al. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J Immunol* 1995;154:3162–72.
- [24] Morales ME, Rico G, Gomez JL, Alonso R, Cortés R, Silva R, et al. Could the homologous sequence of anti-inflammatory pentapeptide (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* in the N protein of rabies virus affect the inflammatory process? *Parasitol Res* 2006;98:232–6.
- [25] Navarro-García F, Canizales-Roman A, Quan Sui B, Nataro JP, Azamar Y. The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from Enteroaggregative *E. coli*. *Infect Immun* 2004;72:3609–21.
- [26] Navarro-García F, Canizales Roman A, Vidal JE, Salazar MI. Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis. *Microbiology* 2007;153:2828–38.
- [27] Okeke IN, Scaletsky IC, Soars EH, Macfarlane LR, Torres AG. Molecular epidemiology of the iron utilization genes of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2004;42:36–44.
- [28] Otto BR, Sijbrandi R, Luirink J, Oudega B, Heddele JG, Mizutani K, et al. Crystal structure of hemoglobin protease, a hem binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2005;280:17339–45.
- [29] Palacios-Rodríguez Y, Gazarian T, Rowley M, Mailuf-Cruz A, Gazarian K. Collection of phage-peptide probes for HIV-1 immunodominant loop-epitope. *J Microbiol Methods* 2006;68:225–35.
- [30] Parham NJ, Pollard SJ, Desvaux M, Scott-Tucker A, Liu C, Fivian A, et al. Distribution of the serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2005;43:4076–82.
- [31] Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988;73:305–18.
- [32] Sainz T, Pérez J, Fresan MC, Flores V, Jimenez L, Hernández U, et al. Histological alterations and immune response induced by Pet toxin during colonization with enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) in a mouse model infection. *J Microbiol* 2002;40:91–7.
- [33] Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993;234:779–815.
- [34] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Small-scale preparation of single-stranded bacteriophage M13 DNA. In: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, editors. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p. 4.29–30.
- [35] Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1990;249:386–90.
- [36] Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, Arap W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:1622–54.
- [37] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985;228:1315–7.
- [38] Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 1993;217:228–57.
- [39] Szalai K, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. Vaccination strategies based on the mimotope concept. *G Ital Dermatol Venereol* 2008;143:95–104.
- [40] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weighting matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;11:4673–80.
- [41] Towin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4530–4.
- [42] Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, Ibarra F, Reyes-Pérez M, Reyes-Vivas H, et al. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology* 2008;135:1437–45.
- [43] Villaseca JM, Navarro-García F, Mendoza-Hernandez G, Nataro JP, Cravioto A, Eslava C. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infect Immun* 2000;68:5920–7.
- [44] Villaseca JM, Hernandez U, Sainz-Espuñes TR, Rosario C, Eslava C. Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence. *Rev Latinoam Microbiol* 2005;47:140–59.
- [45] Yang WJ, Lai JF, Peng KC, Chiang HJ, Weng CN, Shiuam D. Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. *J Immunol Methods* 2005;304:15–29.
- [46] Yen YY, Kostakioti M, Henderson IR, Stathopoulos C. Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends Microbiol* 2008;16:370–9.