



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Expresión de las proteínas actina, Arp2 y Profilina a
diferentes tiempos de infección por *Escherichia coli*
Enteropatógena (REPEC) en células RK13**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

RUBÉN ARTURO TORRES LEÓN

TUTOR:

DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

COMITÉ TUTORAL:

DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO

DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA



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 alumno Rubén Arturo Torres León

Recibió apoyo de Beca durante sus estudios de Maestría por parte de:

CONACYT

No. De registro. CVU 225603

Becario. 210648

El presente Trabajo recibió el apoyo de:

PROYECTO PACIVE. Morfología Veterinaria y Biología Celular. (GVC-10)

PROYECTO PAPIIT. Estudio comparativo de los rearrreglos del citoesqueleto en células RK13 y enterocitos de conejo durante la infección de *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC). (IN203106-3)

PROYECTO PAPIIT. Evaluación de la actividad micótica de compuestos sintéticos y naturales sobre la estructura de las células micóticas. (IN211008-3)

AGRADECIMIENTOS

Siempre resulta difícil agradecer públicamente a aquellas personas que han colaborado con un proceso, con una creación, con un éxito, por cuanto nunca alcanza el tiempo, el papel o la memoria para mencionar y dar, con justicia, todos los créditos y méritos a quienes lo merecen. Partiendo de esa limitación y diciendo de antemano MUCHAS GRACIAS a todas las personas que de una u otra manera formaron parte de este proyecto, con sus aportes, entrega, compromiso, seriedad y responsabilidad fueron definitivamente un valor agregado para este proceso, para mi experiencia personal y para todo lo que esté próximo. Porque sin la complicidad y solidaridad de ustedes, esto no hubiera sido posible:

DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO

DRA. MARIA DE LOURDES JUAREZ MOSQUEDA

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

DR. JOSE ANGEL GUTIERREZ PABELLO

DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

DRA. CECILIA ROSARIO CORTES

DR. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE

DRA. LEONOR QUINTERO MORA

M EN F GERMAN ISAURO GARRIDO FARIÑA

M EN C CRISÓFORO MERCADO MARQUEZ (Responsable de la unidad de
Aislamiento de la FES-C)

MVZ MA. REYES PICHARDO MOLINERO

M EN C MISAEL RUBEN OLIVER GONZALEZ

MVZ ULISES GERMAN CORTEZ NERI

MVZ INGRID PATRICIA GARRIDO BECERRIL

QFB BEATRÍZ ADRIANA BAUTISTA RAMÍREZ

DR. TONATIUH A CRUZ SÁNCHEZ

DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUEIRA

DR. ROBERTO DÍAZ TORRES

MVZ ANDRES CARDONA LEIJA

MVZ SALVADOR FLORES PEINADO

MVZ ALFREDO GARCÍA SALAZAR

SRA. NORMA ANGÉLICA CUEVAS ROMERO

DRA. ROCÍO MONTOYA

DR. FERNANDO NAVARRO GARCÍA (Jefe del Departamento de Biología
Molecular del CINVESTAV IPN)

M EN C ARMANDO PÉREZ RANGEL (Auxiliar de Investigador del Departamento
de Biología Molecular del CINVESTAV IPN)

M EN C JUANA ORTEGA MONDRAGÓN

M EN C JAVIER F LAZCANO REYES

MVZ PATROCINIO CRUZ ARELLANO

MVZ JUAN RAÚL AGUILAR TOVAR

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	1
Introducción.....	2
I. El citoesqueleto.....	2
a) Generalidades.....	2
II. La molécula de actina.....	2
a) Generalidades.....	2
b) Proceso de polimerización de actina.....	4
c) Proteínas de unión a actina.....	5
d) Nucleación de actina: ARP2/3.....	6
III. El complejo Arp2/3.....	6
a) Generalidades.....	6
IV. La familia de proteínas WASP.....	7
a) Generalidades.....	7
b) Mecanismo de acción WASP-Arp2/3.....	8
V. Profilina.....	8
a) Generalidades.....	8
VI. <i>Escherichia coli</i>	9
a) Generalidades.....	9
b) <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	10
c) Sistema de secreción tipo III.....	11

d) Formaciones de lesiones A/E.....	12
Antecedentes.....	13
Justificación.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	17
a) Objetivo General.....	17
b) Objetivos particulares.....	17
Metodología.....	18
I. Cultivo celular.....	18
II. Cultivo de REPEC.....	18
III. Infección de las células RK13 con REPEC.....	19
IV. Anticuerpos.....	19
V. Ensayos de Inmunofluorescencia.....	19
Resultados.....	21
I. Las células RK13 infectadas con REPEC muestran estructuras ricas en acumulación de actina llamadas pedestales.....	21
II. Cinética de la formación de pedestales en células RK13 infectadas con REPEC.....	23
III. Reclutamiento a los pedestales y colocación de las proteínas Profilina, Complejo Arp2/3 y N-WASP con actina durante la infección por REPEC.....	25
IV. Uso de antibióticos y reinfección de cultivos de RK13 con REPEC, produce eliminación y formación de pedestales.....	29

V. Reclutamiento a los pedestales y localización de Profilina, en pedestales formados con actina con el tratamiento con antibióticos y reinfección de cultivos de RK13 con REPEC.....	29
Discusión.....	32
Conclusiones.....	36
Referencias bibliográficas.....	37

Resumen

Tres aspectos fundamentales en la vida celular son blanco frecuente de los patógenos; el citoesqueleto, las vías de señalización y la maquinaria genómica. *E coli enteropatogena* de conejo (REPEC) utiliza una variedad de proteínas efectoras para modificar la polimerización de actina, entre ellas, Profilina, Arp2/3 y N-WASP. El objetivo del trabajo fue reproducir un modelo “*in vitro*” que demuestre los eventos celulares que se presentan en un proceso de infección causado por REPEC, así como evaluar la expresión de actina, Arp2, N-WASP y profilina en los rearrreglos del citoesqueleto observados en la formación de pedestales. Para el modelo de infección, células RK13 fueron cultivadas sobre cubreobjetos, al siguiente día, se infectaron con el cultivo de toda la noche de REPEC con una concentración aproximada de 5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC), y se tomaron muestras a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 horas postinfección, posteriormente se trataron con antibiótico (Penicilina/Estreptomocina, 100UI/ml, Gibco) para eliminar la bacteria y se re infectaron con REPEC (5×10^8 UFC) para observar el crecimiento de pedestales nuevamente a las 3 horas. Mediante el modelo propuesto de infección en células RK13 detectamos la presencia de las proteínas: profilina, Arp2, N-WASP y actina durante la formación de pedestales. Después de la eliminación de los pedestales en los cultivos de células RK13 tratados con antibióticos y a la reinfección con REPEC, se logró la formación de nuevos pedestales en los cuales se identificaron a las proteínas profilina, Arp2, N-WASP y actina. Con base en los resultados demostramos la interacción y colocalización subcelular de Profilina, Arp2 y N-WASP que lleva a la polimerización de actina para la formación de los pedestales, lo cual permite un acercamiento y mayor comprensión de la dinámica del citoesqueleto de actina, lo cual se relaciona de manera importante con lo observado en modelos experimentales *in vivo* de conejos infectados con REPEC.

Introducción

I. El citoesqueleto

a) Generalidades

El citoesqueleto es una red compleja de filamentos que permite a las células eucariotas organizarse espacialmente e interaccionar mecánicamente con su entorno, gracias a esta red, las células pueden cambiar de forma y desplazarse de un lugar a otro, así como reordenar sus componentes internos. El citoesqueleto interviene en la división celular, conduce y dirige el tráfico intracelular de organelos, transporta materiales desde un punto de la célula a otro; sostiene la frágil membrana plasmática y proporciona el sostén mecánico que permite a la célula soportar el estrés sin ser destruida por los cambios ambientales (Alberts et al, 2008). La gran variedad de funciones del citoesqueleto se deben al comportamiento de proteínas que se ensamblan formando tres tipos de principales de filamentos; los filamentos intermedios, los microtúbulos y los filamentos de actina. Cada tipo de filamento presenta distintas propiedades mecánicas y dinámicas, pero ciertos principios fundamentales son comunes a todos ellos. Los cuales proporcionan la base para la comprensión general sobre como trabaja el citoesqueleto (Alberts et al, 2008).

II. La molécula de actina

a) Generalidades

La actina es una proteína globular de 43 KD, es el componente principal del citoesqueleto de actina y la proteína más abundante en la mayoría de los tipos celulares. En vertebrados existen seis isoformas, cada una codificada por un gen diferente, de las cuales se desconocen sus implicaciones biológicas. Las distintas isoformas son específicas de tejido; así, las células del tejido muscular liso presentan las isoformas α y γ mientras que las células no musculares presentan mayoritariamente las isoformas β y γ (Alberts et al, 2008).

La actina puede existir en forma monomérica (G-actina del inglés *globular actin*) o bien, las diferentes subunidades se pueden ensamblar dando lugar a la formación de actina filamentosa también conocida como actina-F que cuenta con unas propiedades bioquímicas y biofísicas particulares. La transición de un estado a otro le confiere una gran flexibilidad y le permite participar de manera determinante en una gran cantidad de procesos celulares. Por esta razón, la célula ha de regular la actina que tiene disponible así como el estado (actina globular o actina-F) en que se encuentra. Para ello, además de las propiedades de la molécula de actina y de los filamentos que conforma, cuenta con la colaboración de las proteínas que se unen a la actina o ABPs (del inglés *actin-binding proteins*). (Alberts et al., 2008; Gouin et al., 2005; Welch and Mullins, 2002). Todas las células eucariotas contienen una red submembranal de filamentos de actina con el extremo (+) orientado hacia la membrana plasmática. La polimerización de actina en la zona cortical de la célula, genera la fuerza que provoca la protrusión de la membrana en la formación de las estructuras tales como las microespinas, filopodios y lamelipodios, estos últimos se observan durante el movimiento de una célula sobre un sustrato. La polimerización de actina también tiene que ver con la internalización de material extracelular por fagocitosis, a partir de protrusiones de membrana o pseudópodos que forman las copas de fagocitosis. Otros eventos celulares que requieren polimerización de actina son la formación de haces contráctiles en células no musculares como son las fibras de tensión y los anillos contráctiles. Los filamentos de actina también pueden ser estabilizados y formar haces paralelos que den soporte a estructuras celulares tales como las microvellosidades. (Welch and Mullins, 2002; Gruenheid and Finlay, 2003; Pollard and Borisy, 2003; Gouin et al., 2005).

b) Proceso de polimerización de actina

Los filamentos de actina, también conocidos como microfilamentos, forman una estructura muy dinámica; miden de 5 a 9 nm de ancho y están formados por la unión no covalente de subunidades de G-actina dispuestas en una hélice de 7 monómeros por vuelta. Cuando las cadenas pesadas de la miosina se unen al filamento crean un patrón que recuerda a una punta de flecha. Con base en esto, se puede diferenciar el extremo “+” ó cola de la flecha (*barbed end*) del extremo “-” o punta de la flecha (*pointed end*). Esta estructura polarizada de los filamentos aporta una vía a lo largo de la cual las miosinas pueden generar fuerza en la dirección adecuada (del extremo “-” al “+”). Los monómeros de actina presentan una hendidura hacia el centro de la molécula a la que se une ATP o ADP. Asimismo, la molécula de actina puede hidrolizar el ATP o intercambiar el ADP por el ATP. La conformación de la molécula difiere según esté unida a uno u otro nucleótido. Cuando la G-actina está unida a ATP es cuando se favorece su incorporación al filamento. Los monómeros unidos a ATP se incorporan en el extremo “+” del filamento, mientras que en el extremo opuesto o extremo “-”, los monómeros hidrolizan el ATP a ADP+Pi, este último es disociado pero el ADP es retenido en el monómero de actina que como consecuencia sufre un cambio de conformación y es eliminado del filamento. Una vez libre puede intercambiar ADP por ATP cuya concentración es más alta en el citoplasma celular y volver a unirse al extremo “+”. Las células en condiciones fisiológicas mantienen relativamente constante el tamaño de los filamentos de actina mediante un proceso cíclico de intercambio (*treadmilling*) de monómeros de actina (Pollard .y Borisy. 2003). En estas condiciones fisiológicas la célula tiene una concentración estándar de actina (Cs), que permite la adición de monómeros de actina en el extremo “+” y la eliminación en el extremo “-”, por lo que no se produce polimerización neta ya que ambos fenómenos quedan compensados. Para que se produzca la polimerización neta ha de existir una concentración de actina superior a la concentración crítica o mínima (CC). Como la CC del extremo “+” es menor que la CC del extremo “-“, la adición de monómeros de ATP-actina ocurre mayoritariamente por el extremo “+” y

la despolimerización por el extremo “-” Por tanto, la tasa de polimerización está en función de la cantidad de actina monomérica libre y de los extremos “+” libres. (Alberts et al., 2008; Pollard and Cooper, 1986).

c) Proteínas de unión a actina

Para explicar el comportamiento fisiológico de la dinámica de la actina es necesario recurrir a las proteínas de unión a actina o ABPs. La tasa de elongación del filamento depende de la concentración de G-actina en el medio por tanto, un papel clave de las ABPs es mantener una concentración alta de monómeros de actina libres, mientras que otras unen monómeros de actina. Para regular la polimerización de actina, algunas ABPs, secuestran monómeros de actina evitando la nucleación de nuevos filamentos, mientras que otras unen monómeros de actina-ATP creando una reserva de actina lista para polimerizar. La timosina β -4 une a ADP-actina y bloquea todas las reacciones que implican ensamblaje de actina ya sea, nucleación o elongación del filamento. La profilina puede desplazar a la timosina de su unión al monómero favoreciendo el intercambio de ADP por ATP y de esta forma crea una reserva de actina lista para polimerizar. La profilina permite a la célula tener una reserva de actina disponible para elongar los extremos “+” de los filamentos mientras que la timosina mantiene el resto de monómeros en reserva (Pollard y Borisy, 2003). Otro factor a tener en cuenta es que el rápido crecimiento de los extremos “+” de los filamentos acabaría rápidamente con el reservorio de ATP-actina. Por ello existen dos mecanismos que compensarían este efecto. El primero de ellos está regulado por las proteínas de *capping* que se unen al extremo “+” de los filamentos de actina e impiden su elongación (Alberts et al., 2008). El segundo mecanismo está mediado por la cofilina, un miembro de la familia de proteínas ADF (del inglés *actin-depolymerizing factor*) que favorece la despolimerización de actina.

d) Nucleación de actina: ARP2/3

La creación de nuevos filamentos de actina puede acontecer de dos formas diferentes: mediante la formación *de novo* de un filamento, o bien a partir de filamentos de actina preexistentes. En el primer caso ha de tener lugar la formación de un oligómero de actina G de una longitud mínima para que se favorezca su elongación en lugar de su despolimerización. Una vez constituido ese núcleo, tendría lugar el proceso de elongación mediante el cual el polímero crece bidireccionalmente a partir del núcleo formado. Debido a que las cinéticas de polimerización son diferentes para ambos lados, el extremo “+” crece más rápidamente que el extremo “-” donde está favorecido el proceso de despolimerización. Como indicábamos antes, el nuevo filamento también se puede generar a partir de la elongación de filamentos preexistentes. Para ello, es necesario o bien desplazar a las proteínas que bloquean los extremos “+” (proteínas de *capping*), o que la cofilina rompa dichos filamentos generándose así nuevos extremos de crecimiento libres para la incorporación de monómeros de ATP-actina (Pollard y Borisy, 2003). El descubrimiento del complejo proteico Arp2/3 permitió un gran avance en el conocimiento de la regulación del proceso de polimerización de actina. Más recientemente, las forminas han aparecido como una segunda familia de proteínas con la misma capacidad para iniciar la formación de filamentos de actina que Arp2/3 (Evangelista et al., 2003; Harris et al, 2006; Kovar, 2006).

III. El complejo Arp2/3

a) Generalidades

Este complejo multiproteico fue purificado por primera vez en *Acanthamoeba catellanii* y posteriormente, ha sido encontrado en todas las células eucariotas. Consta de siete polipéptidos: dos proteínas relacionadas con actina; (Arps del inglés *actin related proteins*) Arp2 y Arp3 y cinco subunidades; (ARPCs del inglés *Arp2/3 complex component*) p40-ARPC1, p34-ARPC2, p21-ARPC3, p20- ARPC4,

p16-ARPC5 (Kovar, 2006). Los modelos moleculares sugieren que el dímero estable, compuesto por las subunidades Arp2 y Arp3, se une y bloquea al extremo “-” del filamento e inicia el crecimiento en la dirección del extremo “+” con una orientación constante de 70° (Alberts et al., 2008). Mediante el marcaje con anticuerpos frente a subunidades del complejo Arp2/3 se observa que dicho complejo se localiza justo en el punto de bifurcación de esa rama, lo que indica que Arp2/3 funciona como nucleador de la polimerización de actina sobre filamentos preexistentes y que permanece unido al extremo “-” del filamento. Actualmente está aceptado que el complejo Arp2/3 es intrínsecamente inactivo y que su actividad depende de factores extrínsecos (Robinson et al., 2001).

IV. La familia de proteínas WASP

a) Generalidades

Los miembros de esta familia de proteínas son los principales activadores del complejo proteico Arp2/3 aunque actualmente y como describiremos a continuación, existen evidencias bioquímicas y genéticas que muestran la existencia de otros factores con capacidad de promover la actividad nucleadora de este complejo proteico. La proteína WASP (del inglés *Wiscott-Aldrich syndrome protein*) fue identificada como una proteína que se encontraba mutada en individuos con el síndrome de Wiscott-Aldrich, una enfermedad genética que se caracteriza por defectos en el citoesqueleto de actina de las células hematopoiéticas, lo que clínicamente se traduce en trombocitopenia, eczema e inmunodeficiencia (Derry et al., 1994). La restricción de WASP a células hematopoiéticas hizo pensar que podría existir otra proteína de expresión más generalizada. Así, posteriormente se encontró la proteína NWASP (del inglés *Neural-Wiscott-Aldrich syndrome protein*) aislada inicialmente en cerebro de rata y que presenta una homología del 50% con WASP pero su expresión es mucho más ubicua (Miki et. al, 1996)

b) Mecanismo de acción WASP-Arp2/3

El modelo mejor conocido y aceptado para explicar la actuación conjunta de las proteínas WASP y Arp2/3 es el modelo de nucleación dendrítica que tiene lugar en el frente de avance de células en migración (Pollard et al., 2000). Estímulos extracelulares como factores quimiotácticos, se unen a sus correspondientes receptores de membrana plasmática y activan moléculas de señalización como las RhoGTPasas. La unión de PI(4,5) P₂ y GTP-Cdc42 a las proteínas N-WASP/WASP provoca la activación de las mismas. Una vez activas, N-WASP/WASP colaboran con Arp2/3 y con monómeros de actina para estimular la formación de nuevos extremos “+” en un proceso que incluye tanto nucleación como formación de estructuras ramificadas (Pollard et al., 2000, Pollard et al., 2001). Bajo condiciones de activación óptimas cada complejo Arp2/3 inicia la nucleación de un filamento o rama individual. Existen dos hipótesis que explican dónde ocurre inicialmente la nucleación del nuevo filamento. Pantaloni et al. (2001) proponen que las ramas se forman preferentemente en los extremos “+” de filamentos de actina ya formados. Sin embargo, imágenes de microscopía a tiempo real muestran que las ramas se forman en el lateral de filamentos preexistentes (Pollard et al., 2001; Fujiwara et al., 2002). Tras iniciar la formación de un nuevo filamento o rama, el papel de las proteínas WASPs no está del todo claro. Los filamentos crecen hasta que sus extremos “+” son bloqueados por la unión de proteínas de *capping*. (Uruno et al., 2003).

V. Profilina

a) Generalidades

Estas proteínas deben su nombre a su propiedad y función de mantener a la actina en pro-filamentos de actina (PRO-FILamentous actIN) (Carlsson et al, 1977). A pesar de su descubrimiento en células eucariontes y su función importante, principalmente en el dinamismo de la actina, se han reportado profilinas provenientes de virus y se propone que su función es similar a la reportada en los vertebrados sugiriéndose que los virus pueden utilizar esta

proteína como ligando del fosfatidil inositol (PIP2) para tener contacto con las células de mamíferos (Burke et al., 2000). Las profilinas juegan un papel crucial en la formación de tejidos de mamíferos y en algunos organismos como animales y plantas superiores pueden expresarse de manera tejido-específica (Braun et al., 2002 Witke et al., 1998). Profilina está concentrada en sitios dinámicos de ensamble y desensamble de actina, participa en la regulación de la polimerización uniéndose a actina-G en un punto opuesto a donde se une con otro monómero para formar actina-F. Profilina provoca cambios conformacionales lo que hace que la hendidura de actina se abra hacia el citosol y además cataliza el intercambio de ADP por ATP, resultando en un aumento de la concentración de monómeros activos para la polimerización. Profilina compite con Timosina 4, una pequeña proteína que secuestra monómeros de actina para evitar su polimerización, pero como profilina se une de una manera más fuerte, libera actina-G de Timosina, mantiene la cantidad necesaria de monómeros que pueden polimerizarse y además trasloca monómeros de actina al sitio de crecimiento de filamentos. Como la profilina se localiza submembranalmente, puede recibir señales extracelulares y acelerar la polimerización de actina en estos sitios (Alberts et al., 2008; Pollard and Borisy, 2003).

VI. *Escherichia coli*

a) Generalidades

Escherichia coli es la bacteria Gram-negativa no invasiva, no toxigénica, anaerobia facultativa, más abundante de la microflora intestinal, que coloniza de manera natural la mucosa del colon. Tanto las cepas comensales como patogénicas tienen una estructura genómica común que les permite sobrevivir bajo las condiciones competitivas del intestino, así como en el medio ambiente al pasar de un individuo a otro. Las principales categorías de cepas patógenas (diarreogénicas) de *E. coli* incluyen *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* adherente difusa (DAEC). EPEC es una causa de diarrea aguda y persistente en niños, presenta alta morbilidad y mortalidad en países en desarrollo

y además de humanos afecta animales como el conejo, perro, porcinos, ovinos, bovinos y ratón. En México se ha reportado que un 16% de muestras asociadas a infecciones asintomáticas y diarrea aguda eran originadas por patotipos diarreogénicos de *E. coli* (Aktan et al., 2004; Nakazato et al, 2004; Chen and Frankel, 2005; Krause et al, 2005; Vidal et al, 2007; Frankel and Phillips, 2008; Estrada-García et al, 2009).

b) *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Dentro de la competencia entre organismos y patógenos, se ha visto que muchas bacterias manipulan el citoesqueleto de actina para su propio beneficio. Utilizando a la actina como molécula blanco, estos patógenos reprograman rápida y radicalmente a la célula hospedera controlando la polimerización y despolimerización de los filamentos de actina con el fin de poder adherirse o internalizarse en las células, moverse dentro de ellas y pasar a otras contiguas. Otras bacterias cuentan con mecanismos moleculares para exportar proteínas efectoras al citoplasma de la célula y manipular el citoesqueleto de actina para interactuar extracelularmente (Deng and Finlay, 2000; McCallum and Theriot, 2000; Gruenheid and Finlay, 2003; Gouin et al., 2005; Marjomäki and Schaibe, 2005).

La virulencia de EPEC depende primordialmente de la inducción de una lesión característica en la cual la bacteria hace contacto íntimo con la membrana plasmática del enterocito, ocasionando destrucción localizada de las microvellosidades y distorsión de la membrana. Este contacto resulta en rearreglos del citoesqueleto, en especial la formación de elevaciones de la membrana ricas en actina, denominadas pedestales, en el sitio de contacto bacteriano, proceso denominado como lesión de adherencia y destrucción (A/E, del inglés attaching and effacing). De esta forma, EPEC es una de las bacterias que, desde una situación extracelular, dirige la polimerización de actina de la célula hospedera para formar los pedestales, que constituyen el sitio de su asiento

(Moon et al., 1983; Knutton and McNeish, 1987; Kenny and Finlay, 1997; Sekiya et al., 2001; Gruenheid and Finlay, 2003; Chen and Frankel, 2005).

c) Sistema de secreción tipo III

Para producir la lesión A/E, EPEC cuenta con un sistema que le permite translocar proteínas efectoras directamente en el citosol del enterocito, mediante el sistema de secreción tipo III (TTSS, por su siglas en inglés), el cual es un importante mediador de interacción de muchas bacterias Gram-negativas con las células de animales y plantas. El TTSS forma un organelo semejante al flagelo bacteriano pero con una estructura tubular que inserta en la membrana de la célula blanco, a través de la cual la bacteria secreta sus proteínas directamente al citosol de dicha célula (de ahí que se le denomine complejo aguja). (Tampakaki et al., 2004). Entre las proteínas secretadas está EspA que forma una prolongación filamentosa del complejo aguja constituyendo un tubo de translocación. La extensión filamentosa hueca del complejo aguja del TTSS formada por EspA (sobre los 0.7 micrómetros de largo), define una nueva clase de TTSS denominado sistema de secreción tipo III filamentoso (FTTSS, por sus siglas en inglés). Otras proteínas secretadas son EspB y EspD involucradas en la formación de un poro de translocación insertado en la membrana del enterocito y situado en el extremo del filamento de EspA, completando así el conducto llamado TTSS-translocón, a través del cual las proteínas efectoras son liberadas al citosol de la célula blanco (Marches et al, 2000; Chen and Frankel, 2005; Dean et al, 2005; Vidal et al, 2007). EPEC también posee un sistema de secreción tipo II, aunque poco se sabe acerca de su papel en la virulencia (Dean et al 2005; Vidal et al, 2007; Frankel and Phillips, 2008;).

d) Formaciones de lesiones A/E

La formación de la lesión A/E es un proceso que se puede dividir en 4 estadios:

- 1.- Expresión del pili formador de haces (Bfp, por las siglas en inglés), de la adhesina íntima y del FTTSS.
- 2.- Adherencia localizada a través del Bfp y EspA, activación del FTTSS y liberación de Tir y otras moléculas efectoras al citosol de la célula blanco. Tir es fosforilada y se inserta en la membrana plasmática y se activan vías de señalización causando alteraciones en el citoesqueleto.
- 3.- Se pierden los filamentos de EspA de la superficie bacteriana, la íntima se enlaza a Tir, resultando en una unión estrecha; acumulación de actina y otros elementos del citoesqueleto debajo del sitio de adhesión de las bacterias.
- 4.- Acumulación masiva de elementos del citoesqueleto que culmina con la formación de los pedestales, pérdida de la integridad de las uniones estrechas y de la función de las mitocondrias, conduciendo a pérdida de electrolitos y a la eventual muerte celular (Moon et al., 1983; Knutton and McNeish, 1987; Kenny and Finlay, 1997; Sekiya et al., 2001; Clarke et al., 2003).

Antecedentes

Los microorganismos patógenos han desarrollado diversos e ingeniosos mecanismos para infectar a sus hospederos y causarles enfermedad, éstos mecanismos incluyen la subversión y la explotación de sus células blanco. Muchos de los trabajos recientes, se han enfocado en definir los mecanismos celulares y moleculares que utilizan los microbios para causar enfermedad, dándole así una nueva apreciación a las patogénesis bacterianas. Un tema que emerge en éste ámbito, es la habilidad que poseen muchas bacterias para explotar las vías de señalización celular, así como, a los componentes del citoesqueleto y de la membrana celular, para permitir la colonización e invasión de sus hospederos. Evolutivamente, los organismos y los patógenos han jugado una competencia en la cual los organismos han desarrollado una serie de mecanismos de defensa para evitar ser colonizados e invadidos por los patógenos y a su vez, los patógenos han desarrollado una serie de estrategias para sobrepasar los mecanismos de defensa y de ser posibles pasar inadvertidos. Actualmente existe gran interés en estudiar los mecanismos moleculares subyacentes en la interacción organismo-patógeno para conocer con detalle los mecanismos de virulencia de los patógenos y de defensa de los organismos para comprender la patogenia de las enfermedades. Uno de los mecanismos utilizados por los patógenos es apropiarse de la maquinaria celular para su beneficio y, en este sentido, tres aspectos fundamentales en la vida celular son blanco frecuente de los patógenos; el citoesqueleto, las vías de señalización y la maquinaria genómica. (Chen and Frankel, 2005.). Algunos microorganismos patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Rickettsia rickettsii*, *vaccinia virus*, *Burkholderia pseudomallei*, *Yersinia spp.*, *Salmonella spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptosporidium parvum*, y *Trypanosoma cruzi* toman ventaja de los cambios dinámicos del citoesqueleto para colonizar e invadir las células del hospedero y poder desplazarse dentro del citoplasma para poder salir e invadir células vecinas (Orth et al. 2002; Gruenheid and Finlay 2003; Vallance and Finlay 2000; Gouin et al, 2005)

Por otro lado, se ha establecido que la cepa O103:K:H2 de *E.coli* enteropatógena específica de conejos (REPEC), tiene mecanismos de patogenicidad análogos a las cepas de EPEC, las lesiones A/E producidas por REPEC O103 se caracterizan por la unión estrecha de la bacteria a los enterocitos, destrucción localizada de las microvellosidades y la formación de pedestales tal como sucede con EPEC de humano, además de activar la expresión de citocinas proinflamatorias. Por lo tanto REPEC puede utilizarse como modelo para estudiar la patogénesis de las lesiones A/E producidas por la *E. coli* en el hospedero natural (Marches et al., 2000, Ramírez et al 2005; Oliver-González et al., 2008). Por lo anterior, REPEC puede ser considerado uno de los modelos más relevantes para el estudio de la patogenia de las lesiones tipo A/E inducidas por *E. coli* en un huésped natural como lo mencionan Milon et al. 1999. Sin embargo, en solo un reporte se menciona el uso de cultivos de células epiteliales de conejo como modelos para observar la participación de Tir y de intimina en la patogenia de REPEC (Marches et al. 2000), pero los autores no investigaron los mecanismos relacionados en la formación de pedestales a nivel celular.

A la par de los modelos de estudios histológicos y cultivos celulares provenientes de biopsias humanas, no existe un modelo que pueda correlacionar la dinámica del citoesqueleto de actina durante la infección con EPEC en modelo animal o celular (Nataro y Kaper 1998). Aunque existen varios modelos celulares de infección con EPEC en los cuales se ha estudiado su patogenia y la reorganización del citoesqueleto, como por ejemplo: PtK2, Caco-2 y células HeLa (Sanger et al. 1996, Freeman et al. 2000). Por consiguiente en este trabajo se estudió la formación de pedestales en un modelo de infección de células RK13 con REPEC y la expresión de distintas proteínas del citoesqueleto y cómo estas interaccionan en la formación de pedestales, lo anterior se correlaciona con los modelos de infección natural de conejos con REPEC (Ramírez et al. 2005), y los recientes estudios realizados sobre la dinámica de los pedestales que muestran que son estructuras dinámicas y que se modifican en un lapso de tiempo relacionado con la presencia de la bacteria y la participación del complejo Arp2/3

(Oliver et al. 2008). Adicionalmente se ha trabajado con la dinámica de la proteína gelsolina, estudiando su colocalización en células RK13 infectadas con REPEC, observando que la presencia de esta proteína se identifica a las 2 horas postinfección (Cortez et al. 2009) Lo anterior proporciona un campo amplio sobre las distintas proteínas que participan en los rearrreglos del citoesqueleto durante la infección, tanto en modelos *in vivo*, como en modelos *in vitro*, generando el estudio sobre otras proteínas involucradas en la patogenia de REPEC, como es el caso de profilina.

Justificación

El citoesqueleto de actina es un sistema dinámico de suma importancia para la función celular y consideramos que a medida que se conozca con mayor precisión este sistema, se entenderá mejor su participación en muchos mecanismos normales y patológicos de la célula. Para estudiar las funciones y mecanismos de regulación de los filamentos de actina se han trabajado diversos modelos, uno de ellos utiliza la interacción de bacterias que al infectar a las células manipulan su citoesqueleto. En este sentido, dentro del estudio de la infección con REPEC, aún no se conocen todos los mecanismos que permitan saber con detalle la dinámica de las proteínas que intervienen en los rearrreglos del citoesqueleto de actina provocados por proteínas que REPEC libera a través del TTSS al citoplasma celular. Con la estrategia planteada para este proyecto, se podrá determinar la colocalización subcelular de actina, Arp2 y profilina, en células en un proceso de infección causado por REPEC. Los resultados obtenidos nos permitirán ampliar el conocimiento de la dinámica del citoesqueleto de actina desde el momento de la infección hasta la formación de pedestales. También el conocer los mecanismos que intervienen durante la infección, permitirá plantear nuevas estrategias de prevención para esta enfermedad, además de aportar nuevos elementos para comprender mejor la patogenia. Los resultados que se obtengan en este trabajo pueden ser extrapolados a otras bacterias que utilizan mecanismos de infección similares, principalmente aquellas relacionadas con el sistema de secreción tipo III. Con anterioridad ya se ha trabajado con el complejo Arp2 en distintos estudios, resaltando su importancia dentro de los rearrreglos del citoesqueleto (Oliver et al. 2008 y Cortez et al. 2009), ya que el complejo Arp2 juega un papel principal en la polimerización de los filamentos de actina, tanto en los modelos *in vivo* como en los modelos *in vitro*, participando en la hidrólisis de ATP para la formación de filamentos de actina, a la par con profilina y el complejo Arp2/3, una proteína de unión a actina, N-WASP también cumple un papel fundamental en el modelo de polimerización de actina como lo menciona el modelo de nucleación dendrítica en arreglo de treadmilling propuesto por Pollard and Borisy (2003).

Hipótesis

Arp2, N-WASP y profilina participan en la regulación de la dinámica de los filamentos de actina, entonces estas proteínas se localizarán en los pedestales originados por la polimerización de actina inducida por REPEC.

Objetivos

a) Objetivo General

Evaluar la expresión de actina, Arp2, N-WASP y profilina en la formación de pedestales durante la infección por *Escherichia coli* enteropatógena de conejo (REPEC).

b) Objetivos particulares

- 1.- Detectar a nivel subcelular, la presencia de actina, Arp2, WASP y profilina en células RK13 infectados con REPEC.
- 2.- Mediante un modelo de infección y reinfección post-tratamiento con antibióticos, observar las proteínas actina, Arp2 y profilina en células RK13 infectadas con REPEC.
- 3.- Contribuir al conocimiento de la dinámica del citoesqueleto de actina en la formación de los pedestales.

Metodología

I. Cultivo celular

En este trabajo se utilizaron células RK13 provenientes de células epiteliales de riñón de conejo (ATCC-CCL37, Rockville, MD, USA), las cuales se propagaron inicialmente en Medio Mínimo Esencial Modificado por Dubelco (DMEM) (Gibco, Grand Island, N.Y), suplementado con: aminoácidos no esenciales 1% (Gibco), penicilina (100UI/ml), estreptomycin (100UI/ml) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco); en cajas para cultivo celular de 60mm x 15mm (Corning), con 8 cubreobjetos cada una, mantenidas en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C hasta alcanzar una confluencia del 60%.

II. Cultivo de REPEC

La cepa que se utilizó en este trabajo fue: *Escherichia coli* E22 serotipo O103 enteropatógena para conejo (REPEC). (Donada por el Dr. Fernando Navarro García, CINVESTAV IPN). La cepa fue incubada en 2ml de caldo Luria Bertoni (LB), se incubó toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, el cultivo bacteriano (CB) se ambientó en DMEM sin suplementos utilizando una dilución de 1:20 y se incubó a 37°C durante 2 horas en condiciones estáticas, posteriormente se tomó una muestra de 10µl y se midió su densidad óptica a 600 nm de longitud de onda (D.O₆₀₀)

La cantidad de CB para infectar las células se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ de células por pozo} \quad \times \quad \# \text{ de bacterias por célula (MOI)}}{5 \times 10^8 \quad \times \quad D.O_{600}} \times 1000 = \mu\text{l de CB}$$

En nuestros experimentos el número de células por caja fue de aprox 5×10^6 y se consideró una MOI de 40. La densidad óptica de 0.550 y la constante 5×10^8 , se refiere a la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *E. coli* con un valor de 1 en D.O₆₀₀

III. Infección de las células RK13 con REPEC

Las células RK13 se incubaron sobre cubreobjetos hasta alcanzar una confluencia de 60%. Al siguiente día, las células se lavaron 2 veces y se adicionó DMEM libre de antibióticos y suero, para posteriormente infectarlas con 500 μ l (por caja) de REPEC, tomando muestras cada: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 horas (para observar la cinética de la formación de los pedestales). Las células infectadas se mantuvieron en incubación a 37⁰C con una atmósfera de 5% de CO₂ durante el tiempo requerido para los distintos experimentos. Para la medición de la longitud de los pedestales se utilizó la función Manual measurements, del programa Q Capture Pro 6.0. Para corroborar la presencia de la bacteria en los cultivos infectados, se tomó una muestra del medio y se incubó toda la noche en agar Luria sólido, para la identificación posterior de las colonias.

IV. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios (Ac) usados en este estudio fueron el anticuerpo policlonal IgG anti-profilina humana producido en cabra (Goat polyclonal IgG, Santa cruz Biotec, Santa Cruz, CA), el anticuerpo policlonal IgG anti-Arp2 humana producido en cabra (Goat polyclonal IgG, Santa cruz Biotec, Santa Cruz, CA) y el anticuerpo policlonal IgG anti N-WASP humana producido en cabra (Goat polyclonal IgG, Santa cruz Biotec, Santa Cruz, CA). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo policlonal de IgG de conejo anti-cabra conjugado con fluoresceína (Rabbit anti-goat IgG fluorescein conjugate, Biosource, Camarillo, CA). El citoesqueleto de actina fue marcado con faloidina conjugada con rodamina (F.R) (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, MO).

V. Ensayos de Inmunofluorescencia

Las células RK13 crecidas sobre cubreobjetos fueron infectadas a diferentes tiempos con los cultivos bacterianos de REPEC (MOI:40). A partir del momento de la infección se tomaron muestras, con intervalos de una hora, hasta las 5 horas, posteriormente se lavaron una hora con antibiótico penicilina (100UI/ml),

estreptomycin (100UI/ml). El antibiótico se eliminó y se re infecto nuevamente con REPEC por tres horas. Todas las muestras se fijaron durante una hora con Paraformaldeido al 4% (Gibco). Posteriormente fueron permeabilizadas con tritón-x100 (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, MO). (0.01%) en PBS durante 20min. Se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS durante 20 min (Reserch Organic, Cleveland). Después se agregó el anticuerpo primario anti-profilina, anti-Arp2 o anti N-WASP (1:20, concentración que recomienda el laboratorio de origen), se incubó en cámara húmeda a 4⁰C toda la noche; al día siguiente se agregó el anticuerpo secundario fluoresceinado (1:20) en PBS y se dejó 3 horas a temperatura ambiente, en seguida se adicionó faloidina rodaminada (1:150) para marcar actina-F incubando por 20 min, después de cada paso las muestras se lavaron 3 veces con PBS y en el lavado final con agua desionizada (García Tovar et al 2002) para hacer el montaje en portaobjetos utilizando medio de montaje especial para fluorescencia con DAPI (UltracruzTM sc-24941).

Resultados

I. Las células RK13 infectadas con REPEC muestran estructuras ricas en acumulación de actina llamadas pedestales

Las células sin infectar mostraron la clásica conformación del citoesqueleto de actina. (FIG. 1a). Durante el proceso de infección de las células RK13 con REPEC, las células empiezan a mostrar estructuras ricas en actina en el citoplasma y en la membrana (FIG. 1b); Para confirmar que las estructuras ricas en actina anteriormente marcadas fueran pedestales, las preparaciones infectadas con REPEC se analizaron a una resolución más alta (100x) (FIG. 1c). Se identificaron varias células que presentaban prolongaciones ricas en actina, en contraste con las células sin infectar, las cuales no mostraban esas prolongaciones. Estos resultados muestran que REPEC es capaz de formar pedestales ricos en actina en las células RK13. (Fig. 1)

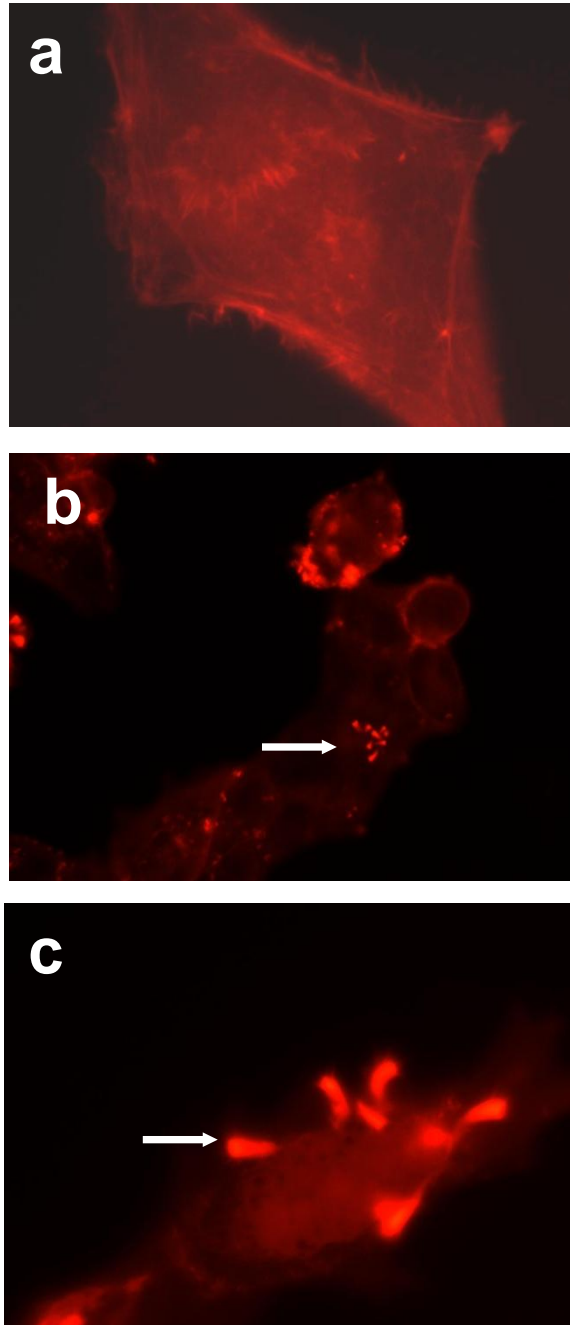


Fig. 1 Células RK13 infectadas con REPEC que muestran sitios ricos en actina. Las células RK13 fueron infectadas con REPEC durante 4 horas, marcadas con faloidina rodaminada y analizadas con microscopia de epifluorescencia. Células control no infectadas (40x) (a) y células infectadas por 4 horas observada a 40X (b) y 100X (c). Acúmulos de actina sobre la superficie de la célula (Flechas). Formación de los pedestales (c)

II. Cinética de la formación de pedestales en células RK13 infectadas con REPEC

Para determinar el tiempo de infección necesario para la formación de pedestales se examinaron siete grupos cada hora postinfección (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Las células infectadas se marcaron con faloidina rodaminada y se analizaron con microscopia de epifluorescencia. No se localizó formación de pedestales a la hora y dos horas postinfección y las células se observaron similares a las células no infectadas. Aunque la adhesión inicial de la bacteria se observó a 1.5h. La formación inicial de los pedestales en las células se observó a las 3h postinfección (FIG. 2a) y los pedestales mejor definidos se observaron a las 4h postinfección (FIG. 2b).

Para determinar lo que sucede con los pedestales pasadas las 4 horas de infección, tiempo que usualmente tarda en formar pedestales la infección de EPEC en células humanas (Sanger et al., 1996, Goosney et al., 2000 y Batchelor et al., 2004), las células RK13 infectadas con REPEC fueron examinadas a las 5, 6 y 7 horas postinfección. Las células se marcaron con faloidina-rodaminada y se analizaron con microscopia de epifluorescencia. Las células infectadas por 5 horas mostraron pedestales ricos en actina (Fig. 2c), que parecieron aumentar en número en comparación con aquellas células que se infectaron menos tiempo. Las células RK13 infectadas por 6 horas y 7 horas mostraron pedestales ricos en actina que incrementaron en tamaño, de 5.2μ a las 4 horas postinfección a 10.2μ a las 7 horas postinfección (FIG. 2d, 2e)

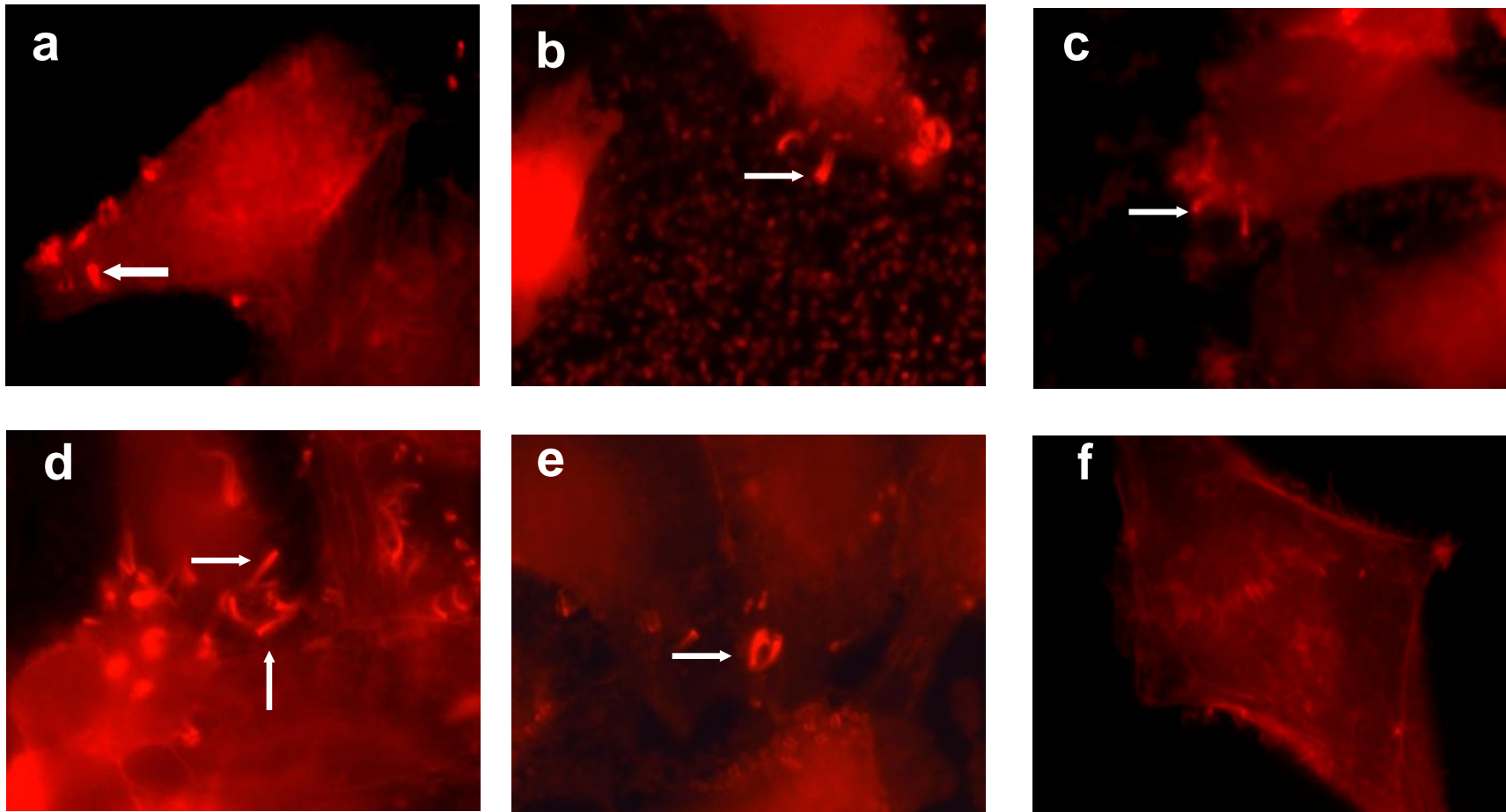


Fig. 2 Desarrollo temporal de la formación de pedestales en células RK13 infectadas con REPEC a diferentes tiempos. Cada hora las células se fijaron y se marcaron con faloidina rodaminada, para posteriormente ser analizadas con microscopia de epifluorescencia. (a) 3 horas postinfección (10x); (b) 4 horas postinfección (100x), (c) 5 horas postinfección(10x); (d) 6 horas postinfección (100x); (e) 7 horas postinfección (100x);(f) Células sin infectar (40x). Los pedestales se señalan con flechas.

III. Reclutamiento a los pedestales y colocalización de las proteínas Profilina, Arp2 y N-WASP con actina durante la infección por REPEC

Con la finalidad de ver la distribución de las proteínas Profilina, Complejo Arp2 y N-WASP durante la formación de pedestales en la infección de células RK13 con REPEC, se prepararon muestras en diferentes tiempos de postinfección.

A las 4 horas de infección se notaron pedestales de $5.2\mu\text{m}$ de longitud en promedio, a lo largo de los cuales se apreció una marca positiva para Profilina y N-WASP, además se notó una localización similar a la detectada con actina como se muestra en las figuras 3 y 5. A las 5 horas de infección se observaron pedestales de $8.4\mu\text{m}$ de longitud en promedio, a lo largo de los cuales se distinguió una marca positiva para Profilina, Arp2 y N-WASP, además se manifestó una localización similar a la observada con actina como se muestra en las figuras 3, 4 y 5. A las 6 horas de infección se detectaron pedestales de $9.2\mu\text{m}$ de longitud en promedio, a lo largo de los cuales se dio una marca positiva para Profilina, Arp2 y N-WASP, además se notó localización similar a la observada con actina como se muestra en las figuras 3, 4 y 5. A las 7 horas de infección se pudieron apreciar pedestales de $10.2\mu\text{m}$ de longitud en promedio, a lo largo de los cuales se observó una marca positiva para Profilina y Arp2 además se identificó una localización similar a la observada con actina como se muestra en las figuras 3, y 4.

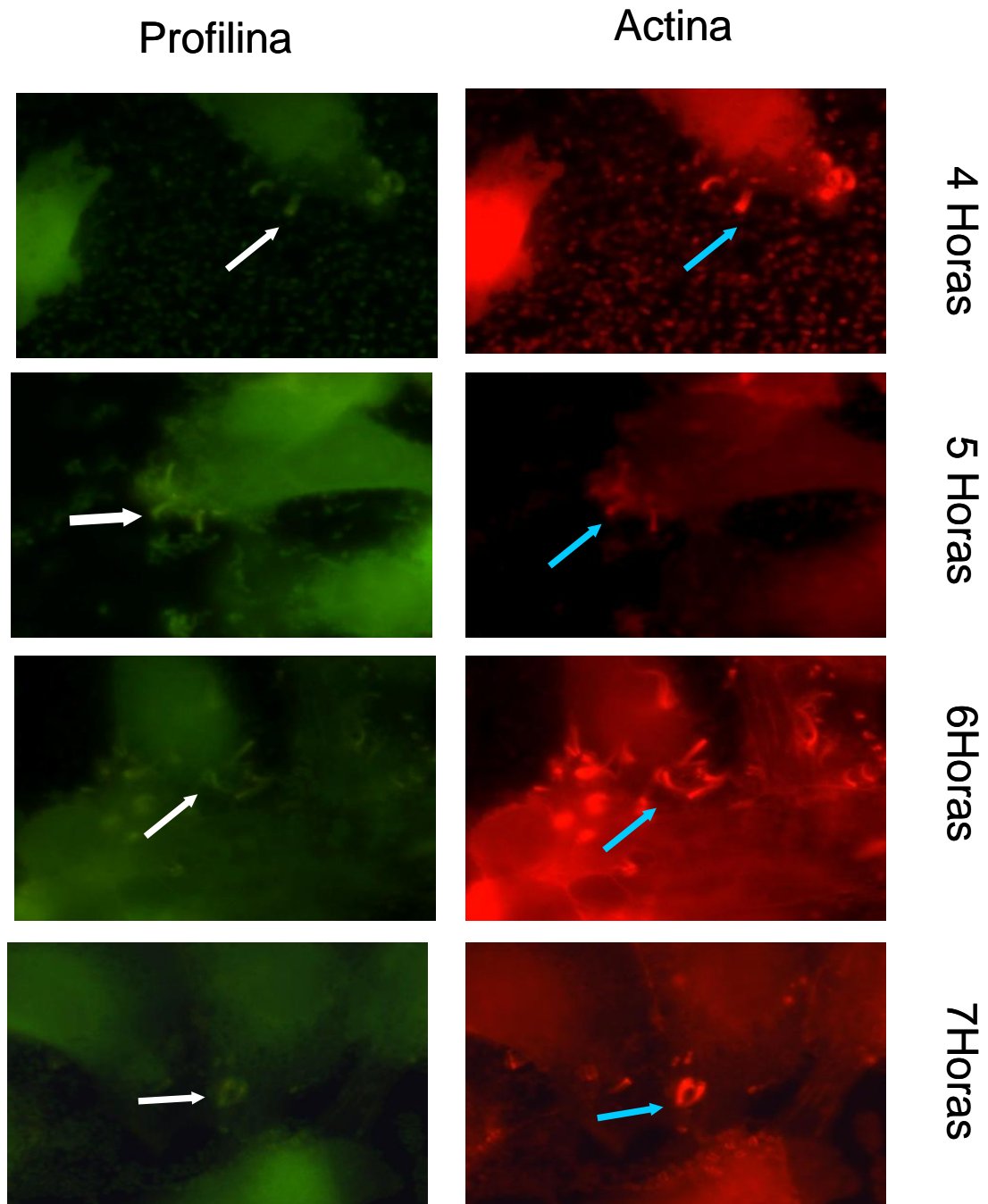


Fig. 3 Cultivos de células RK13 infectadas con REPEC durante 7 horas, posteriormente se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. Pedestales ricos en actina (flechas azules). Marcas de Profilina en pedestales (flechas blancas).

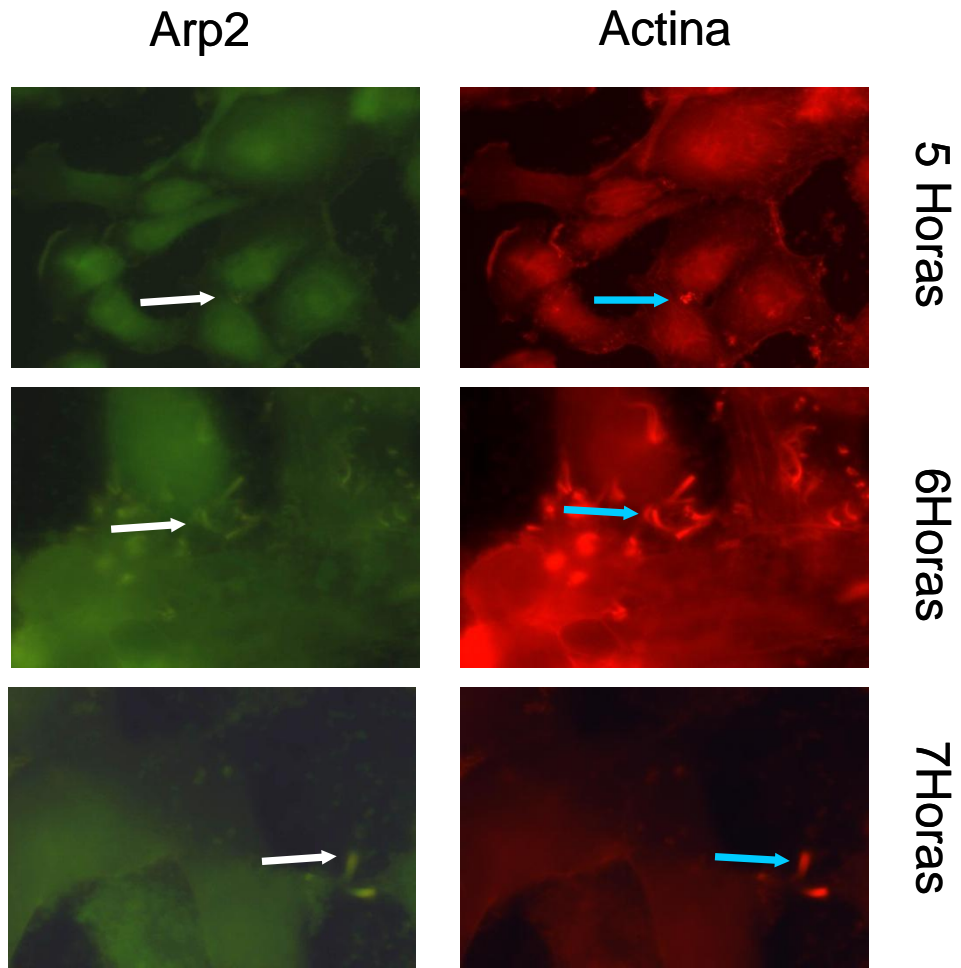


Fig. 4 Cultivos de células RK13 infectadas con REPEC durante 7 horas, posteriormente se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. Pedestales ricos en actina (flechas azules). Marcas de Arp2 en pedestales (flechas blancas).

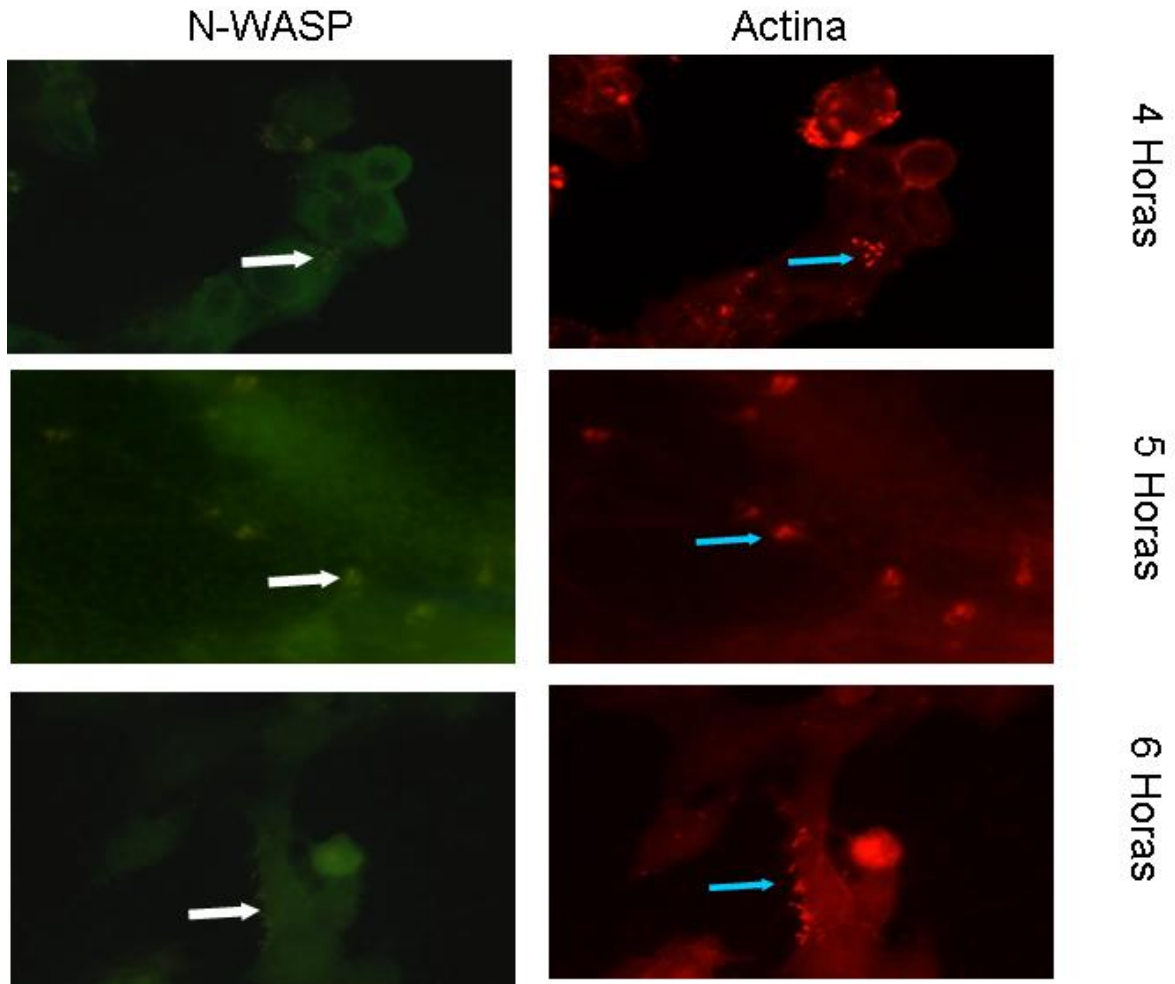


Fig. 5 Cultivos de células RK13 infectadas con REPEC durante 6 horas, posteriormente se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. Pedestales ricos en actina (flechas azules). Marcas de N-WASP en pedestales (flechas blancas).

IV. Uso de antibióticos y reinfección de cultivos de RK13 con REPEC, produce eliminación y formación de pedestales

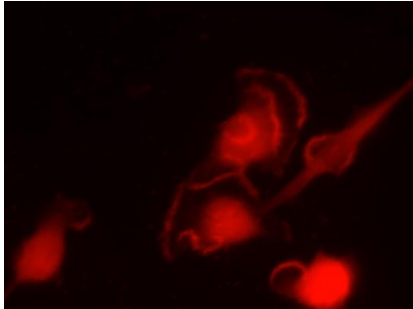
Para estudiar la polimerización de actina se estableció un modelo a través de la eliminación y remodelación de los pedestales ricos en actina, para esto se eliminó a la bacteria con antibióticos (5000 UI de penicilina/ml y 5mg de estreptomina); y posteriormente las células se re infectaron con REPEC, estableciendo grupos de trabajo; el primero, con cultivos celulares de RK13 tratadas una hora con antibióticos, y el segundo tratadas con dos horas con antibióticos, ambos cultivos tenían 5 horas de infección previos con REPEC. Se logró la eliminación completa de la bacteria y la eliminación total de los pedestales después del tratamiento con antibióticos. (Fig.6) Para corroborar la eliminación de la bacteria en los cultivos infectados, se tomó una muestra del medio y se incubó toda la noche en agar Luria sólido, al día siguiente las placas no presentaron crecimiento (datos no mostrados). Comprobándose lo mismo a las dos horas de incubación con antibióticos (Fig.6). Después de 4 horas de reinfección con REPEC, se volvieron a observar los pedestales (Fig.7).

V. Reclutamiento a los pedestales y localización de Profilina en pedestales formados con actina, con el tratamiento con antibióticos y reinfección de cultivos de RK13 con REPEC

A las 4 horas de reinfección posterior al tratamiento con antibióticos, se formaron pedestales de 6 μm de longitud en promedio, a lo largo de los cuales se identificó una marca positiva para Profilina con una localización similar a la observada con actina (FIG. 7).

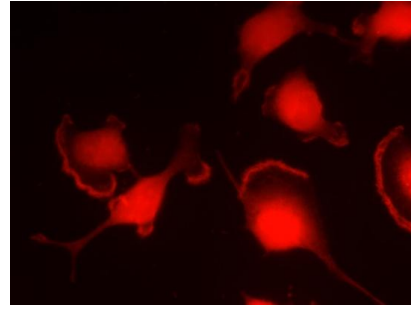
1 hora lavado
antibiótico

Actina



1 hora lavado
antibiótico

Actina



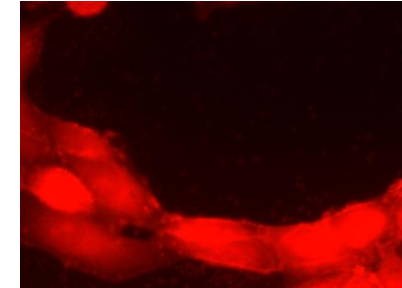
2 hora lavado
antibiótico

Actina

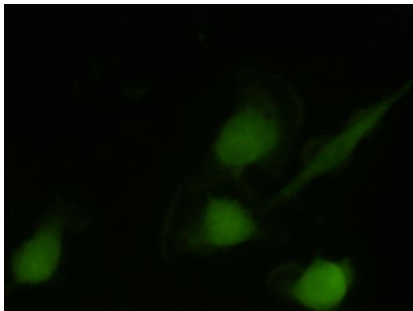


2 hora lavado
antibiótico

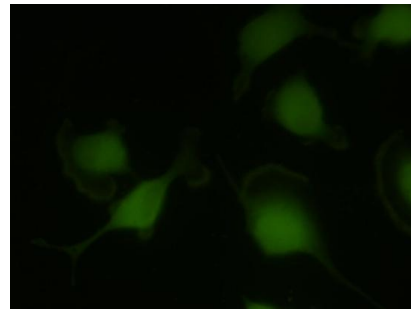
Actina



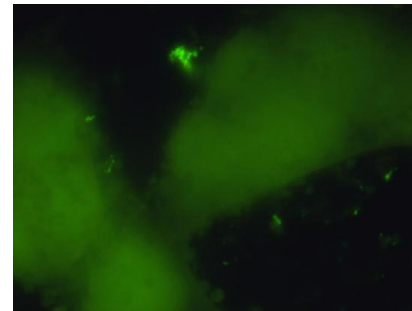
Profilina



ARP



Profilina



ARP

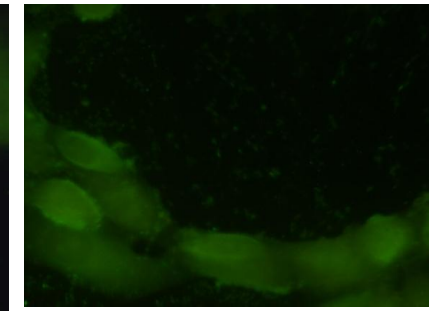
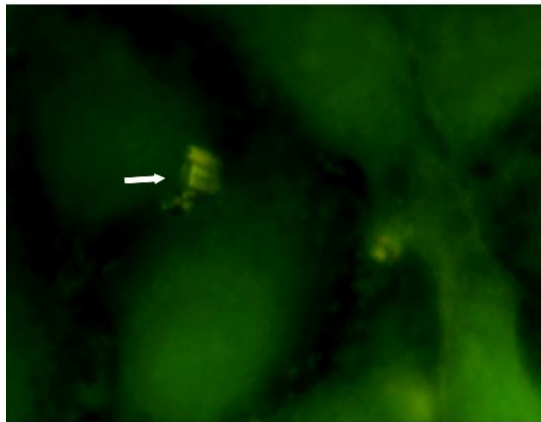


Fig. 6 Cultivos de células RK13 infectadas con REPEC durante 5 horas, tratadas con antibióticos (5000 UI de penicilina/ml y 5mg de estreptomicina) una y dos horas. Posteriormente se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. Se observa la total remisión de los pedestales después de ser tratadas con antibiótico.

Profilina



Actina

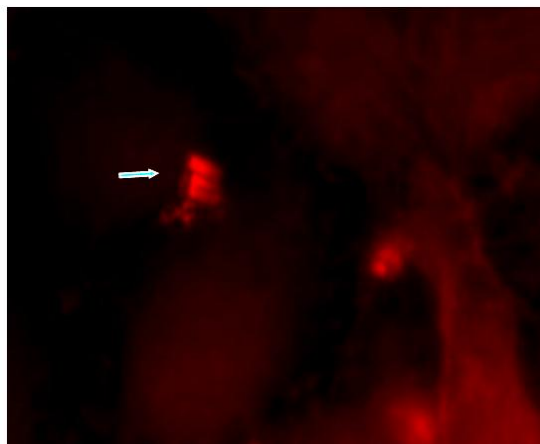


Fig. 7 Cultivos de células RK13 re infectadas con REPEC durante 4 horas, previamente tratadas con antibiótico. Posteriormente se prepararon las muestras para inmunofluorescencia como se describe en la metodología. Pedestales ricos en actina (flechas azules). Marcas de Profilina y Arp2 en pedestales (flechas blancas).

Discusión

Los modelos de infección *in vitro* son esenciales para el estudio de los mecanismos moleculares utilizados en las distintas patogénesis bacterianas. REPEC es considerada como uno de los modelos más relevantes para estudiar la manera en que se desarrollan las lesiones A/E en un modelo natural (Milon et al. 1999). En este trabajo analizamos la formación de pedestales en células RK13 infectadas con REPEC, por medio de microscopía de fluorescencia y observamos en los mismos, la participación de las proteínas: Actina, N-WASP, Arp2 y Profilina. Existen estudios que describen los mecanismos moleculares relacionados con EPEC y que inducen las lesiones A/E para la formación de los pedestales (Kenny 2002; Campellone, et al. 2002; Clarke et al. 2003; Chen y Frankel 2005), así como reportes que señalan las proteínas del citoesqueleto y sus vías de señalización que son reclutadas durante la formación de los mismos, sin embargo, hay pocos estudios que reportan la dinámica de actina y las proteínas que participan en su polimerización y despolimerización.

Los estudios realizados *in vitro* permiten estudiar de manera controlada los eventos que se suceden durante la infección, (Marchés 2000) reporta la formación de pedestales en un modelo de infección de REPEC utilizando la línea celular RK13. Ellos sugieren las ventajas de su modelo para el estudio de las lesiones A/E, dado que es posible observar la acumulación de actina-F en el sitio de infección. Los resultados reportados son similares a lo observado en otras líneas celulares y diferentes tejidos, como los fibroblastos de origen embrionario, HeLa, PTK2 y Caco-2 con EPEC (Freeman et al. 2000, Cantarelli et al. 2000). Varios estudios han identificado las proteínas del citoesqueleto que se reclutan en los sitios de infección, entre las 3 y 4 horas post-infección, tiempo en el cual aparecen los pedestales (Sanger et al. 1996; Freeman et al. 2000; Goosney et al. 2000). A partir de los estudios realizados con líneas celulares ha sido posible determinar un gran número de proteínas que son reclutadas o bien que se proponen como posibles blancos que participan en la formación de los pedestales, resumidas en la revisión hecha por Dean and Kenny (2009) y que incluyen a IQGAP1, 14-3-3tau,

Nck, α -Actinina, Talina, Cortactina, Vinculina, Citoqueratina 18, EBP50/, NHERF1, antitripsina, α -catenina, Miosina, ABCF2, Actina, ZO-1/ZO-2, Profilina, Arp2/3, nexina 9, N-WASP, 14-3-3 proteína mito, Tubulina, Sec24, PDZK11, SNX27, MAIS3 y TCOF1. Con el fin de estudiar las proteínas del citoesqueleto que participan en la formación de los pedestales en nuestro laboratorio generamos un modelo dinámico con formación, destrucción y reformación de los pedestales utilizando la infección de la línea celular RK13 con REPEC. Oliver et al (2008) al realizar un seguimiento de actina y Arp2 reportaron la formación de pedestales a las 4 horas e hizo un seguimiento hasta las 7 horas post-infección observando la elongación de los mismos. Luego los cultivos infectados por 4 horas fueron tratados con antibiótico para eliminar a la bacteria y observó la desaparición de los pedestales, después los re infectó y observó nuevamente la formación de los pedestales a las 3 horas, indicando que actina y Arp2 colocalizaban en la formación y reformación de los mismos. Cortez (2009) trabajó con la proteína gelsolina, reportando la presencia de esta proteína colocalizando con actina y Arp2 desde las 2 horas post-infección. De esta manera nuestro trabajo permite con la inclusión de la localización subcelular de la proteína Profilina, en conjunto con Arp2 y N-WASP, estudiar la dinámica del citoesqueleto de actina y las proteínas involucradas en la formación de pedestales. Se ha reportado que estímulos extracelulares activan a sus correspondientes receptores de membrana, lo cual conduce a la activación de las Rho GTPasas y conjuntamente con PIP2 movilizan a las proteínas WASP/Scar, activan al complejo Arp2/3 que se une a un filamento de actina preexistente, lo que lleva a la polimerización de actina para la formación de un nuevo filamento con la participación de profilina (modelo de nucleación dendrítica descrito por Pollard and Borisy, 2003). Por otro lado, una de las proteínas efectoras de EPEC, EspF, comparte un dominio rico en prolina con la familia de proteínas relacionadas a WASP. Las secuencias ricas en prolina, pueden unir dominios SH3 y a profilina. Durante la infección con REPEC, ya sea a través de Tir, o bien, mediante EspF se podría activar a WASP, induciendo la polimerización de actina mediante el complejo Arp2/3 con la participación de

profilina para generar una poza de actina lista para polimerizar (Peralta et al. 2008, Campellone et al. 2008, Campellone 2010). Considerando la identificación de actina, Arp2 y gelsolina en la formación y reformación de los pedestales, además del reporte de la localización de N-WASP en los sitios de infección, la nucleación dendrítica podría ser el mecanismo de polimerización de actina en la formación de los pedestales. En este trabajo evaluamos la localización subcelular de actina, N-WASP, Arp2 y profilina utilizando el modelo de infección descrito (infección, tratamiento con antibiótico y reinfección para obtener la formación, desaparición y reformación de los pedestales) y de esta forma conocer si el comportamiento de estas proteínas se da de manera conjunta en el desarrollo de los pedestales. Demostramos que los pedestales son evidentes en las células RK13 a las 4 horas de infección con REPEC. Estas estructuras son muy similares a aquellas que se observan en células humanas provenientes de biopsias de niños infectados con EPEC. (Clary et al. 2004.) De manera muy interesante, cuando eliminamos la infección adicionando antibióticos observamos la reducción de los cúmulos de actina F en los sitios en donde se localizaban los pedestales, todo esto después de 1 hora y los pedestales desaparecieron completamente a las 2 horas después de la incubación con antibióticos. Posteriormente, cuando estos mismos cultivos fueron tratados con antibióticos se reinfectaron se observaron nuevos sitios de formación de pedestales. En estos sitios logramos identificar a profilina con la misma localización que actina. Todas las proteínas en estudio se localizaron a lo largo de los pedestales durante las 7 horas postinfección y también se detectaron en la reinfección después de haber tratado las células con antibióticos. Estos resultados indican que la inducción de la polimerización de actina para la formación de pedestales es continua mientras esté presente la bacteria adherida a la célula del hospedador. Lo anterior es también respaldado por el concepto de que los pedestales son estructuras dinámicas de Sanger et al. (1996), quienes demostraron que se requiere de la polimerización de actina en los pedestales para la movilidad de EPEC en la superficie de la célula del hospedero. Estos pedestales están constituidos por filamentos de actina resultado de la transducción de proteínas efectoras, gracias al sistema de secreción tipo III, de manera similar a lo

que sucede en la formación de las colas de cometa observadas en la infección con *Listeria monocytogenes*). Se ha reportado en experimentos *in vivo* e *in vitro*, que la gelsolina es reclutada en las colas de actina aproximadamente a las 3 horas después de la infección, mostrando un patrón de distribución similar a lo observado en los pedestales del trabajo de Cortez (2009) utilizando el modelo de infección de RK13/REPEC, sugiriendo que la función de la gelsolina basada en el corte de actina-F formando fragmentos que son cubiertos en su extremo para evitar que polimericen y desprendiéndolos para que sirvan como fuente de actina para la formación de nuevos filamentos. Asimismo el complejo Arp2/3 se localiza en los extremos “+” de las colas de cometa producidas por *Listeria monocytogenes*. Este complejo también interactúa con profilina, la cual se une al complejo Arp2/3 mediante la interacción con la unidad Arp2 en células infectadas con *Listeria monocytogenes*. Todos estos eventos suceden a partir de las 3 horas postinfección, sugiriendo que profilina, Arp2, N-WASP y actina interactúan desde el inicio de la formación de los pedestales, ya que observamos una localización similar en las 4 proteínas a partir de las 4 horas de infección, manteniéndose esta marca durante las 7 horas postinfección y reapareciendo posteriormente al tratamiento con antibióticos. A partir de los resultados obtenidos, y la localización subcelular de las proteínas Profilina, Arp2 y N-WASP proponemos que durante la infección con REPEC se activa la cascada de eventos que se suceden durante la nucleación dendrítica en arreglo de rueda de molino (treadmilling) y que involucra la activación del complejo Arp2/3 mediante N-WASP (activada a través de Tir o EspF, proteínas efectoras de REPEC), con la participación de gelsolina (Cortez, 2009) y profilina (este trabajo) proveyendo monómeros de actina G activados y listos para polimerizar. De esta forma la polimerización de actina siguiendo el esquema de nucleación dendrítica proveerá el mecanismo de formación de los pedestales, sitio de asiento de REPEC para la colonización de los cultivos de RK13.

Conclusiones

1. En este trabajo logramos determinar la localización subcelular de las proteínas: Actina, Profilina, Arp2 y N-WASP en los pedestales formados por REPEC, a partir de las 4 horas, lo que muestra la participación de estas proteínas en la formación de los pedestales.
2. Se consiguió la eliminación de la bacteria mediante el tratamiento con penicilina/estreptomicina, lo que llevó a la restructuración del citoesqueleto de las células RK13, para que los pedestales ya no fueran evidentes.
3. A la reinfección de las células RK13 con REPEC, se logró por segunda ocasión identificar pedestales a las 4 horas postinfección localizando en ellos a las proteínas actina y profilina.
4. Trabajos posteriores deben de ampliar la información necesaria para determinar si los monómeros de actina que son utilizados para la formación de los pedestales, son sintetizados *de novo* o tomados de otro lugar mediante rearrreglos del citoesqueleto, que responden a las señales inducidas por REPEC.

Referencias bibliográficas.

1. Aktan I, Springings KA, La Rogione RM, Faul-Kren LM, Priba GA and Woodward MJ. 2004. Characterisation of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. *Vet. Microbiol.* 102 (1-2): 43-53.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. Fifth edition. Garland Science Taylor and Francis Group. New York, USA. Chapter 16, pp 965-1052.
3. Batchelor M, Guignot J, Patel A, Cummings N, Cleary J, Knutton S, Holden DW, Connerton I, and Frankel G. 2004. Involvement of the intermediate filament protein cytokeratin-18 in actin pedestal formation during EPEC infection. *EMBO Rep.* 5(1):104-110.
4. Braun A, Aszódi A, Hellebrand H, Berna A, Fässler R, Brandau O. 2002. Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. *Gene.* 283(1-2):219-25.
5. Burke E, Mahoney NM, Almo SC, Barik S. 2000. Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. *J. Virol.* Jan; 74(2):669-75.
6. Campellone KG, Giese A, Tipper DJ. and Leong JM. 2002. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol. Microbiol.* 43:1227-1241.
7. Campellone KG, Cheng HC, Robbins D, Siripala AD, McGhie EJ, Hayward RD, Welch MD, Rosen MK, Koronakis V, and Leong JM. 2008. Repetitive N-WASP-binding elements of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector EspF (U) synergistically activate actin assembly. *PLoS Pathog.* 4: (10):e1000191.
8. Campellone KG 2010. Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly. *FEBS.* 36, 1091–1102.

9. Cantarelli VV, Takahashi A, Akeda Y, Nagayama K. and Honda T. 2000. Interaction of enteropathogenic or enterohemorrhagic *Escherichia coli* UIT HeLa cells results in traslocation of cortactin to the bacterial adherence site. *Infect. Immun.* 68:382-6.
10. Chen HD. and Frankel G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:83-98.
11. Clarke SC, Haugh RD, Freestone PPE and Williams PH. 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:365-378.
12. Clary J, Lai LC, Shaw RK. Straalmen, Iwanowska A., Donnenberg MS, Frankel G. and Knutton S. 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP) EspA filaments and intimin. *Microbiol.* 160 3:527-38.
13. Cortez NU. Identificación de Gelsolina en células RK13 infectadas con *Escherichia coli* Enteropatógena para conejo (REPEC). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. 2009
14. Dean P and Brendan K. 2009. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr. Op. Microbiol.* 12:101-109
15. Dean P, Maresca M and Kenny B. 2005. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr. Op. Microbiol.* 8:28-34.
16. Deng J and Finlay BB. 2000. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cel. Microbiol.* 21: 1-9.
17. Derry JMJ, Ochs, HD. and Francke. U. 1994 Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 78, 635-644.
18. Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez D, Santos JI, Rosado JL, DuPont HL, Long KZ. 2009. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 47:93-98.
19. Evangelista M, Zigmond S, Boone C. 2003. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J. Cell Sci* 116, 2603-2611

20. Frankel G and Phillips AD 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell. Microbiol* 10(3):549-556.
21. Freeman NL, Zurawski DV, Chowrashi P, Ayoob JC, Huang L, Mittal B, Sanger JM. and Sanger JW. 2000. Interaction of the enteropathogenic *Escherichia coli* protein, translocated intimin receptor (Tir), with focal adhesion proteins. *Cell. Motil. Cytoskelet.* 47:307-218.
22. Fujiwara M, Sengupta, P, and McIntire, SL. 2002. Regulation of body size and behavioral state of *C. elegans* by sensory perception and the EGL-4 cGMP-dependent protein kinase. *Neuron* 36, 1091–1102.
23. García TCG, Luna J, Mena R, Soto ZCI, Cortéz R, Pérez A, Leon AG, Mornet D, Rendón A and Hernández JM. 2002. Dystrophin isoform Dp71 is present in lamellipodia and focal complexes in human astrocytoma cells U-373MG. *Acta Histochem.* 104 (3):245-254.
24. Goosney DL, DeVinney R. and Finlay BB. 2000. Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect. Immun.* 69:3315-22.
25. Gouin E, Welch MD. and Cossart P. 2005. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr. Op. Microbiol.* 8:35-45.
26. Gruenheid S and Finlay BB. 2003. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature.* 422: 775-781.
27. Harris ES, Rouiller, I, Hanein, D, and Higgs, H.N. 2006. Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, FRL1 and mDia2. *J. Biol. Chem.* 281 (20): 14383-14392.
28. Kenny B. 2002. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) a crafty subversive little bug. *Microbiol.* 148:1967-1978.
29. Kenny B. and Finlay BB. 1997. Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma. *Infect. Immun.* 65:2528-36.
30. Knutton S. and McNeish AS. 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocyte and cultured human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* 55:69-77.

31. Kovar, DR. 2006. Arp2/3 ATP hydrolysis: to branch or to debranch? *Nat. Cell. Biol.* 8, 783-785.
32. Krause G, Zimmerman S and Beutin L. 2005. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin – (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet. Microbiol.* 106(1-2): 87-95.
33. Marches O, Neugayrede JP, Boullier S, Mainil J, Charlier G, Raymond I, Pohl P, Boury M, De Rycke J, Milon A. and Oswald E. 2000. Role of Tir and intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O103:H2. *Infect. and Immun.* 68:171-82.
34. Marjomäki V. and Schaibe UE. 2005. Microbial strategies to exploit host cells. Meeting on Spatial and Temporal Dynamics of the Endomembrane System. *EMBO reports.* 6: 408-412.
35. Mc Callun SJ. and Theriot JA. 2000. Bacterial manipulation of the host cell cytoskeleton. In *Cellular Microbiology* (Cossaret P., Boquet P. Normark S. And Rappuoli R, editors). ASM Press, Eashington DC USA. Chapter 10, pp.171-191.
36. Miki Y, Katagiri T, Kasumi F, Yoshimoto T, Nakamura Y. 1996. Mutation analysis in the BRCA2 gene in primary breast cancers. *Nat. Genet.* 13:245-247
37. Milon A, Oswald E and De Rycke. 1999. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 30:203-219.
38. Moon HW, Whipp SC, Argenzio, RA., Levine, MM. and Gianella, RA. 1983 Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbits intestines. *Infect Immun.* 41: 1340-1351
39. Nakazato G, Gyles C, Ziebell K, Kiler R, Trabulsi LR, Gomes TAT, Irono K, Da Silveira WD. and De Castro AFP. 2004. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Vet. Microbiol.* 101(4):269-277
40. Nataro JP. And Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201.

41. Oliver-González MR, García-Tovar CG, Juárez-Mosqueda ML and Navarro-García F. 2008. Infection of rabbit kidney cells (RK13) by enteropathogenic *Escherichia coli* as a model to study the dynamics of actin cytoskeleton. *Can. J. Microbiol.* 54(9):748-757.
42. Orth, JD, Krueger, EW, Cao, H., and McNiven, MA. 2002. The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:167-172.
43. Pantaloni, D, Le Clainche, C, and Carlier, M-F. 2001. Mechanism of actin-based motility. *Science*, 292, 1502-1506.
44. Peralta-Ramirez J, Hernandez M, Manning-Cela R, Luna-Muñoz, Garcia-Tovar C, Nougayrede JP, Oswald E and Navarro-Garcia F. 2008. EspF Interacts with nucleation-promoting factors to recruit junctional proteins into pedestals for pedestal maturation and disruption of paracellular permeability. *Infect. and Immun.* 76(9):3854-3868.
45. Pollard TD. and Borisy GG. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112:453-465.
46. Pollard, TD, and JA. Cooper. 1986. Actin and actin-binding proteins: a critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 987-1035.
47. Pollard, D, Blanchoin, L., and Mullins, R.D. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29: 545-576.
48. Pollard, TD, L. Blanchoin, and R.D. Mullins. 2001. Actin dynamics. *J. Cell Sci.* 114:3-4.
49. Ramirez K, Huerta R, Oswald E, García-Tovar C, Hernández JM and Navarro-García F. 2005. Role of EspA and intimin in expression of proinflammatory cytokines from enterocytes and lymphocytes by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*-infected rabbits. *Infect. and Immun.* 73(1):103-113.
50. Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, Marchand JB, Higgs HN, Choe S, Pollard TD .2001. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* 294: 1679-1684.
51. Sanger JN, Chang R, Asthon F, Kaper JB. And Sanger JW. 1996. Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 34:279-87.

52. Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C. and Abe A. 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. Proc Natl Acad Sci USA 98:11638-11643.
53. Tampakaki AP, Fadouloglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ and Kokkinidis M. 2004. Conserved features of type III secretion. Cell. Microbiol. 6(9): 805-816
54. Uruno T, Liu J, Li Y, Smith N. and Zhan X. 2003. Sequential interaction of actin related proteins 2 and 3 (Arp2/3) complex with neural Wiscott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cortactin during branched actin filament network formation. J. Biol. Chem. 278, 26086-26093.
55. Vallance A. and Finlay B. 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. Colloquium. 97(16): 8799-8806.
56. Vidal JE, Canizales-Román A, Gutiérrez-Jiménez J y Navarro-García F 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Pública México 49(5):376-386.
57. Welch MD. and Mullins RD. 2002. Cellular control of actin nucleation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 18:247-288.
58. Witke W, Podtelejnikov AV, Di Nardo A, Sutherland JD, Gurniak CB, Dotti C. and Mann M. 1998. In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. EMBO. 17(4):967-76.