



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“Caracterización de la proteína SepL del  
sistema de secreción tipo III de *Escherichia  
coli* enteropatógena”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A:**

**MEZTLI OFELIA GAYTÁN ENRÍQUEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO**



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 realizó en el laboratorio 325 del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Bertha González Pedrajo, con el apoyo de los donativos IN224708 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM y 81847 del CONACyT.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Académicos.**

A la Dra. Bertha González Pedrajo, porque siempre me brindó un gran apoyo, desde lo académico hasta lo moral, por toda la confianza que me tuvo para dejarme hacer y deshacer en su lab. Gracias por ser una excelente persona y darme esta gran oportunidad, siempre te estaré agradecida ☺.

A la Dra. Norma Espinosa Sánchez por su excelente apoyo técnico y asesoría en la realización de este trabajo, y porque siempre tuvo tiempo y paciencia para enseñarme cosas nuevas y ayudarme con todo.

A los miembros del jurado: Dr. Luis Servín González, Dra. Bertha González Pedrajo, Dr. Dimitris Georgellis, Dr. Carlos Eslava Campos y al Dr. H. Ángel Manjarrez Hernández por la revisión crítica de este trabajo.

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

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

Al Dr. Georges Dreyfus y a todos los miembros de su laboratorio: Javier de la Mora, Ana Martínez, Yael González y especialmente a Tere Ballado, porque además de los préstamos y enseñanzas técnicas, me heredaron la gran fascinación que siento por "El mundo de los microbios".

A mis compañeros del 325N: Julia, Eli, Raúl, Onasis y en especial a Mariana, Miguel y Angel quienes además de contribuir al ambiente "buena onda" del lab siempre me brindaron su amistad y me enseñaron cosas que van más allá de lo académico.

### **Personales.**

A mis padres: Ma. Delia Enríquez Dircio y Jaime Gaitán Rivera, gracias por criarme con amor y libertad, enseñarme a crecer y apoyarme siempre.

A mis hermanos Itzel y Ángel quienes además de acompañarme desde que nací (bueno, Ángel 2 años después) han sido uno de los pilares más importantes en mi vida, gracias por hacerme reír y motivarme a seguir adelante siempre. Aquí también incluyo a Libe, que aunque no es mi hermana, crecimos juntas, gracias por tu valiosísima amistad, que es inmune al tiempo y a la distancia.

A mis amigos de ayer y hoy: Libe, Wenchis, Daniel, Miguel A., Angel, Josué, Aldo, Eunice y Uriel, gracias por ponerle sabor a cada día y regalarme mil sonrisas.

A Angel porque además de ser parte importante en mi formación académica también ha sido muy importante en mi vida.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	4
Modelo de patogénesis de EPEC.....	4
i) Adherencia inicial.....	5
ii) Transducción de señales.....	5
iii) Adherencia íntima.....	6
Locus de esfacelamiento enterocítico.....	7
Sistemas de secreción tipo III.....	9
Sistema de secreción tipo III de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	10
Jerarquía de secreción en el SST3 de EPEC.....	12
Interruptor molecular 1: de sustratos tempranos a intermedios.....	14
Medición de la longitud de la aguja.....	14
Cambio en la especificidad de sustratos.....	15
Interruptor molecular 2: de sustratos intermedios a tardíos.....	16
SepL: regulador del segundo interruptor molecular en EPEC.....	18
Modelo 1: SepL/SepD actúan como porteros.....	19
Modelo 2: SepL retiene al efector Tir.....	20
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>OBJETIVOS</b> .....	24
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	25
Manipulación de DNA.....	26
Amplificación por PCR.....	26
Purificación de DNA.....	27
Clonación y subclonación de genes en distintos vectores.....	27
Construcciones bicistrónicas.....	30
Análisis de restricción.....	30
Preparación de células competentes (CaCl <sub>2</sub> ) y transformación de DNA plasmídico.....	32

Inducción de proteínas recombinantes.....	33
Fraccionamiento celular.....	33
Purificación de proteínas recombinantes.....	34
Generación y limpieza de anticuerpos policlonales.....	34
Generación de anticuerpos policlonales.....	34
Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio saturado (SAS).....	35
Inmunoadsorción.....	35
Inmunodetección (Western blot).....	35
Ensayo de secreción de proteínas.....	36
Ensayos de interacción proteína-proteína.....	37
Copurificación (pull-down) por cromatografía de afinidad por níquel	37
Doble híbrido en levadura.....	37
<b>RESULTADOS</b> .....	40
<b>PARTE I. Caracterización de SepL</b> .....	40
Clonación de sepL en distintos vectores de expresión.....	40
Purificación de His-SepL.....	41
Anticuerpos policlonales anti SepL.....	42
Fenotipo y complementación de EPEC $\Delta$ sepL.....	44
Efecto multicopia de SepL y His-SepL.....	46
<b>PARTE II. Regulación de la jerarquía de secreción</b> .....	47
Orf12 es el ortólogo de SsaM.....	48
SepD es el ortólogo de SpiC.....	48
Interacción de la proteína SepL con SepD.....	50
Copurificación de la proteína SepL con His-SepD.....	51
Copurificación de la proteína SepD con His-SepL.....	52
Interacción de la proteína SepD con Orf12.....	55
Interacción de la proteína SepL con Orf12.....	57
<b>PARTE III. Papel de la ATPasa EscN en la jerarquía de secreción</b> .....	58
Interacción de la proteína SepL con EscN.....	58
Generación de versiones truncas de SepL.....	60
Funcionalidad de las versiones truncas de SepL.....	61
Pérdida de funcionalidad de SepL $\Delta$ 75.....	62
<b>DISCUSIÓN</b> .....	64

La proteína SepL de EPEC.....	64
Complementación de la mutante $\Delta$ sepL.....	66
Complementación de la secreción de translocadores.....	66
Complementación de la secreción de efectores.....	67
Efecto multicopia de SepL y His-SepL en EPEC.....	69
Secreción de translocadores.....	69
Secreción de efectores.....	69
Secreción de SepL: un efector aberrante.....	70
El papel de la ATPasa EscN en la jerarquía de secreción.....	70
SepL y sus ortólogos en Salmonella: regulación de la jerarquía de secreción.....	74
Modelo de regulación de la jerarquía de secreción en EPEC.....	76
<b>CONCLUSIONES</b> .....	81
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	82
<b>APÉNDICE I</b> .....	83
<b>APÉNDICE II</b> .....	87
<b>APÉNDICE III</b> .....	92
<b>APÉNDICE IV</b> .....	96
<b>REFERENCIAS</b> .....	97

## RESUMEN

Muchas bacterias patógenas Gram negativas emplean un sistema de secreción tipo III (SST3) como principal mecanismo de virulencia. A través de éste se secretan distintos tipos de proteínas que caen en tres categorías: sustratos tempranos, intermedios o translocadores y tardíos o efectores. Los sustratos tempranos forman los componentes basales del SST3 por lo que su secreción y ensamblaje es indispensable para la secreción de los demás sustratos. Los translocadores se requieren para la translocación de los efectores hacia la célula hospedera ya que forman un poro en la membrana de ésta a través del cual se transportan los sustratos tardíos, los cuales modulan diferentes vías de señalización alterando las funciones celulares del hospedero y sus mecanismos de defensa.

Los patógenos han desarrollado diversos mecanismos para asegurar que los translocadores sean secretados antes que los efectores, de esta manera, aseguran que los efectores sean transportados directamente hacia el citoplasma del hospedero y no al medio extracelular. Sin embargo, estos mecanismos son poco entendidos.

En el SST3 de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) las proteínas SepL y SepD forman un complejo que promueve la secreción de translocadores y evita la de efectores. Por ello se propuso que estas proteínas forman un interruptor molecular que regula la jerarquía en la secreción de sustratos. En este trabajo se realizó una caracterización de la proteína SepL.

La proteína recombinante His-SepL se purificó mediante cromatografía de afinidad por níquel. A partir de ésta se generaron anticuerpos policlonales en conejo. Las inmunoglobulinas precipitadas con sulfato de amonio saturado e inmuoadsorbidas reconocen de manera específica a la proteína SepL.

His-SepL es capaz de restaurar la secreción de translocadores en una cepa  $\Delta sepL$  (que no secreta translocadores e hipersecreta efectores); sin embargo, no complementa la hipersecreción del efector Tir. También se observó que la



sobreexpresión de *his-sepL* en un fondo silvestre induce la hipersecreción de Tir. Por lo que una etiqueta de 10 histidinas en la región amino de SepL interfiere con la función de SepL como regulador de la secreción de efectores, pero no afecta su función de promover la secreción de translocadores.

Recientemente se demostró en el laboratorio que la delección del gen que codifica para la proteína Orf12 resulta en el mismo fenotipo que las mutantes en *sepD* o *sepL*, es decir, Orf12 también participa en la regulación de la secreción de sustratos. Asimismo, se demostró que SepL, SepD y Orf12 forman un complejo proteico. En este trabajo, mediante alineamientos de secuencia se demostró que SepL, SepD y Orf12 son ortólogos de las proteínas SsaL, SpiC y SsaM, respectivamente, las cuales regulan la secreción de proteínas de virulencia a través del SST3 de *Salmonella enterica*. A su vez, se observó que la estabilidad de SepL disminuye en un fondo genético  $\Delta sepD$  y  $\Delta orf12$ .

Mediante ensayos de copurificación tipo *pull-down* y doble híbrido en levadura se demostró que tanto SepL como Orf12 interactúan con SepD, sin embargo, no se detectó interacción entre SepL y Orf12. Este es el primer reporte donde se demuestra interacción directa entre SepD y Orf12.

Por otra parte, se demostró que SepL interactúa con EscN, la ATPasa asociada al SST3 de EPEC.

Se observó que una versión de SepL que carece de los primeros 75 aminoácidos (SepL  $\Delta 75$ ) no es capaz de complementar una cepa  $\Delta sepL$ . De acuerdo con reportes previos se considera que el defecto de complementación de SepL  $\Delta 75$  podría deberse a la falta de interacción con la ATPasa EscN.

Finalmente, se presenta un modelo de las interacciones ya descritas para SepL así como las observadas en este trabajo y se propone un posible mecanismo de la regulación de la jerarquía de secreción de sustratos a través del SST3 de EPEC.

## INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa que coloniza el tracto gastrointestinal de humanos dentro de las primeras horas de vida (Nataro and Kaper 1998). A partir de ese momento, forma parte de la microbiota intestinal y establece una relación benéfica con su hospedero, del cual obtiene una fuente constante de nutrientes y protección contra algunos estreses; por otra parte, lo favorece previniendo la colonización por patógenos (Tenaillon, Skurnik et al. 2010).

*E. coli* representa el anaerobio facultativo más abundante de la microbiota intestinal, su nicho ecológico es la capa mucosa que cubre las células epiteliales del intestino grueso, principalmente el colon, donde permanece sin causar daño; sin embargo, en un hospedero inmunodeprimido o cuando las barreras gastrointestinales son quebrantadas (como en una peritonitis), puede causar infección (Kaper, Nataro et al. 2004).

A lo largo del tiempo, diversas cepas de *E. coli* han adquirido factores de virulencia específicos a través de elementos móviles como plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad. Estos elementos les confieren la capacidad de provocar un amplio espectro de enfermedades así como una mejor habilidad de adaptación a distintos nichos. A estas cepas de *E. coli* se les denominó patotipos (Kaper, Nataro et al. 2004).

Las infecciones provocadas por distintos patotipos de *E. coli* pueden delimitarse a las mucosas o diseminarse a través del cuerpo. Éstas se han asociado con tres síndromes clínicos generales: i) Infecciones del tracto urinario, ii) Sepsis/meningitis y iii) Enfermedades entéricas/diarrea (Chen and Frankel 2005).

Se han descrito seis patotipos asociados a enfermedades entéricas/diarrea: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva

(EIEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC) (Nataro and Kaper 1998; Kaper, Nataro et al. 2004).

### ***Escherichia coli* enteropatógena.**

*E. coli* enteropatógena (EPEC) es el agente etiológico común de diarrea aguda en niños menores de 2 años (Levine and Edelman 1984). Fue el primer patotipo en ser descrito como la causa de brotes de diarrea en el Reino Unido entre 1940-1950 (Levine, Bergquist et al. 1978). Mientras que este fenómeno ha disminuido en países desarrollados, EPEC sigue siendo una de las principales causas de diarrea infantil en países en vías de desarrollo (Kaper, Nataro et al. 2004). Diferentes estudios han demostrado que del 30 al 40% de los casos de diarrea infantil se deben a EPEC, y la tasa de mortalidad es de alrededor del 30% (Nataro and Kaper 1998; Kaper, Nataro et al. 2004; Chen and Frankel 2005).

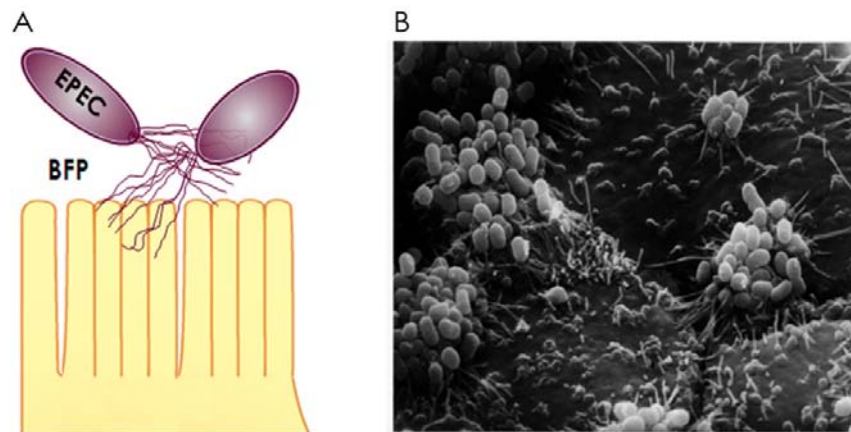
EPEC coloniza las células epiteliales del intestino delgado (enterocitos), principalmente la porción del yeyuno (Rothbaum, McAdams et al. 1982). Los signos y síntomas de una infección por este patógeno incluyen diarrea acuosa aguda, vómito, fiebre y malestar general. Además, en las biopsias de pacientes infectados se puede observar una lesión histopatológica característica ocasionada por este patógeno: la lesión de adherencia y esfacelamiento (lesión A/E). Este fenotipo se caracteriza por la eliminación de las microvellosidades del intestino y la adherencia íntima entre la bacteria y la célula hospedera, también se observan marcados cambios en el citoesqueleto del enterocito, incluyendo la acumulación de filamentos de actina bajo el sitio de adherencia de la bacteria y la formación de una estructura en forma de pedestal sobre la cual se posa la bacteria (Nataro and Kaper 1998).

### **Modelo de patogénesis de EPEC.**

El modelo de patogénesis de EPEC se ha dividido en tres etapas (Nataro and Kaper 1998; Chen and Frankel 2005):

**i) Adherencia inicial:** En la primera etapa de la infección, la bacteria se adhiere a las células epiteliales del intestino a través de una fimbria o pili tipo IV denominado BFP (*Bundle forming pilus*), el cual, además de promover la adherencia inicial entre la bacteria y el enterocito, también promueve la adherencia entre bacterias y con ello la formación de agregados bacterianos (microcolonias); a este fenotipo se le denomina “adherencia localizada” o LA (*Localized adherence*) por sus siglas en inglés (figura 1) (Tobe and Sasakawa 2001).

Además del BFP, se ha propuesto que otras adhesinas (fimbriales y no fimbriales), así como el flagelo podrían participar en la adherencia entre la bacteria y la célula hospedera (Cleary, Lai et al. 2004; Saldana, Erdem et al. 2009).

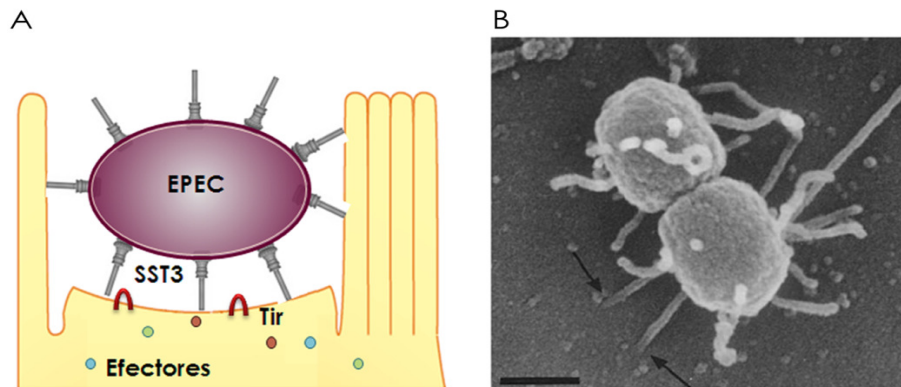


**Figura 1.** Etapa I: Adherencia inicial. (A) Representación del BFP de EPEC mediando la adherencia inicial entre las bacterias y entre la bacteria y el hospedero. (B) Imagen de microscopía electrónica que muestra el fenotipo de adherencia localizada de EPEC a células HEp-2 [Tomada de: <http://medschool.umaryland.edu/infeMSD/Images.htm>].

**ii) Transducción de señales:** Las condiciones ambientales del intestino permiten que EPEC exprese un sistema de secreción tipo III (SST3) (ver más adelante) a través del cual inyecta una serie de proteínas efectoras (efectores) hacia el citoplasma del enterocito (figura 2). Estas proteínas de virulencia alteran distintas vías de señalización del hospedero, induciendo cambios en algunas funciones celulares como la remodelación del citoesqueleto de actina, alteración de la barrera epitelial y de la función mitocondrial entre otras. Todos estos cambios promueven la formación de la lesión A/E y la inducción de la

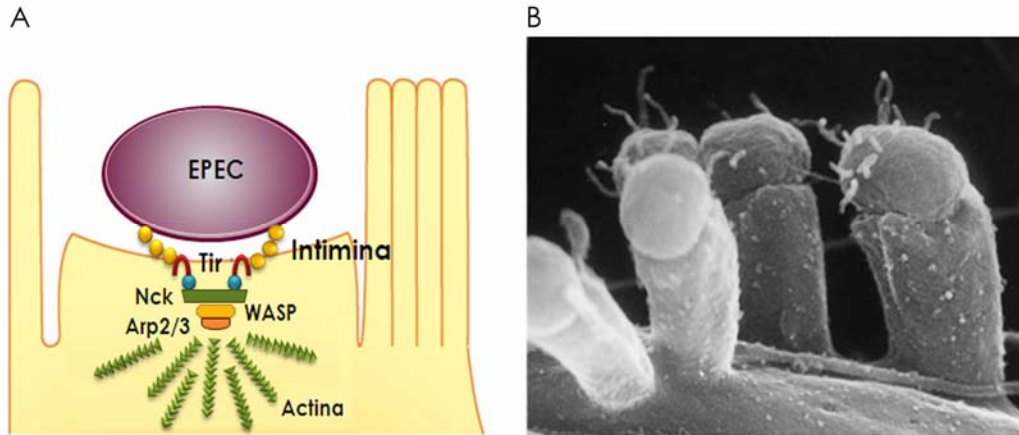
diarrea, aunque hasta la fecha aun no se han esclarecido en su totalidad los mecanismos que conllevan a la producción de diarrea (Auerbach, Baker et al. 1984; Guttman and Finlay 2008; Dean and Kenny 2009; Viswanathan, Hodges et al. 2009).

Tir, uno de los efectores translocados hacia el enterocito, se inserta en la membrana plasmática de éste (Kenny, DeVinney et al. 1997) y adopta una topología de asa, en la cual, su dominio central permanece extracelular mientras sus extremos amino y carboxilo permanecen intracelulares, éstos últimos tienen un papel importante en la activación de vías de señalización del hospedero (Campellone and Leong 2003).



**Figura 2.** Etapa II: Transducción de señales. (A) Representación de EPEC expresando el SST3, mediante el cual transloca proteínas efectoras hacia el citoplasma del hospedero, entre éstas se encuentra Tir (representado como un arco rojo) que se inserta en la membrana. (B) Imagen de microscopía electrónica de barrido donde se observa a EPEC infectando células HEL, las flechas señalan el filamento del SST3, tomada de (Knutton, Rosenshine et al. 1998).

**iii) Adherencia íntima:** En la última etapa, el dominio extracelular de Tir interactúa con una adhesina de membrana externa de EPEC denominada intimina (Kenny, DeVinney et al. 1997). Esta interacción promueve la adherencia íntima entre la bacteria y el enterocito (figura 3A).



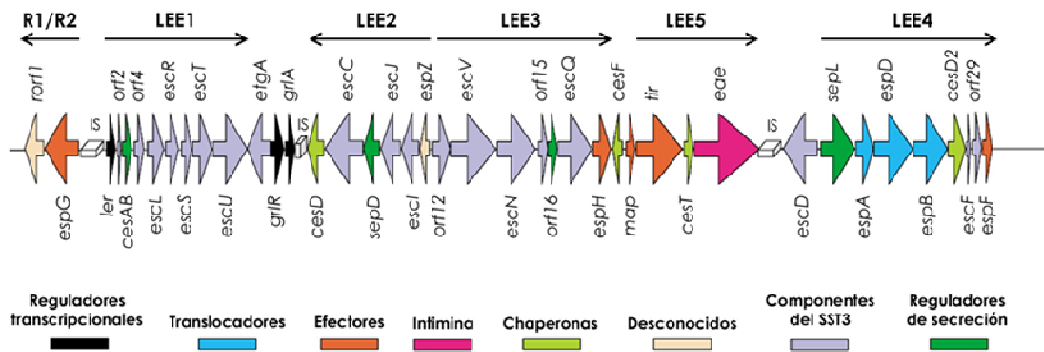
**Figura 3.** Etapa III: Adherencia íntima. (A) Esquema de la adherencia íntima entre EPEC y el enterocito, los círculos amarillos representan a la intimina y el arco rojo a Tir; el círculo azul representa la fosforilación de Tir. También se muestran las proteínas Nck, N-WASP (*Neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein*), Arp2/3 (*Actin-related protein 2/3*) y la actina. (B) Microscopía electrónica de barrido de EPEC infectando células HEL; se puede observar la formación del pedestal (Knutton, Rosenshine et al. 1998).

La interacción con la intimina promueve el agrupamiento de diversas moléculas de Tir, el cual es fosforilado en la tirosina 474 por cinasas del hospedero. La forma fosforilada de Tir interactúa con la proteína adaptadora Nck, que a su vez recluta y activa a N-WASP (*Neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein*) y al complejo Arp 2/3 (*Actin-related protein 2/3*). El reclutamiento de este complejo resulta en la nucleación de filamentos de actina debajo del lugar de adhesión de la bacteria y la formación de una estructura en forma de pedestal característica de la infección por EPEC (figura 3B) (Kalman, Weiner et al. 1999; Sal-Man, Biemans-Oldehinkel et al. 2009).

### **Locus de esfacelamiento enterocítico.**

Todos los genes necesarios para la formación de la lesión A/E están codificados en una isla de patogenicidad de 35.6 kb denominada LEE (Locus de Esfacelamiento Enterocítico) (Jarvis, Giron et al. 1995; McDaniel, Jarvis et al. 1995). Se ha demostrado que esta región es necesaria y suficiente para inducir dicha lesión ya que al clonar el LEE en una cepa no patógena de *E. coli* (K12) ésta adquiere la habilidad de formar la lesión A/E (McDaniel and Kaper 1997).

El LEE de EPEC consta de 41 marcos de lectura abiertos organizados principalmente en 5 operones policistrónicos, LEE1 a LEE5 (figura 4) (Elliott, Wainwright et al. 1998). Los genes codificados en esta isla se agrupan en distintas categorías que comprenden: reguladores transcripcionales, translocadores, efectores, la adhesina intimina, chaperonas moleculares, proteínas estructurales del SST3, proteínas involucradas en la regulación de la secreción a través del SST3 así como algunos marcos de lectura abiertos de función desconocida (Dean, Maresca et al. 2005).



**Figura 4.** Representación esquemática de la isla de patogenicidad LEE (Locus de esfacelamiento enterocítico). Modificado de (Dean, Maresca et al. 2005).

El análisis del contenido de G + C del LEE mostró que es más bajo (38%) que el del resto del cromosoma de EPEC (50.8%), lo cual implica que se adquirió por transferencia horizontal (Frankel, Phillips et al. 1998).

*Ler* es un regulador transcripcional codificado por el primer gen del operón LEE1. Éste regula positivamente la expresión de todos los operones del LEE al contrarrestar la represión impuesta por el regulador global H-NS (Bustamante, Santana et al. 2001). Adicionalmente, los reguladores transcripcionales *GrIA* y *GrIR*, también codificados en el LEE, lo regulan de manera positiva y negativa (respectivamente), a través del control de la expresión de *ler* (Deng, Puente et al. 2004; Mellies, Barron et al. 2007).

La función central de la isla de patogenicidad LEE es la formación del sistema de secreción tipo III o inyectisoma (Jarvis, Giron et al. 1995) a través del cual se translocan los efectores hacia la célula hospedera. Cabe mencionar que además de los 7 efectores codificados en el LEE se han identificado otros

localizados en distintas islas de patogenicidad a lo largo del cromosoma, a éstos se les denominó Nle's (*non-LEE encoded*) (Dean, Maresca et al. 2005).

### **Sistemas de secreción tipo III.**

Los sistemas de secreción tipo III, también llamados inyectisomas, permiten la secreción de proteínas hacia el exterior bacteriano en un solo paso (sin intermediarios periplásmicos). Estos sistemas son empleados por muchos patógenos de plantas y animales como *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*, *Escherichia coli* enteropatógena y enterohemorrágica, y *Pseudomonas aeruginosa* así como por algunos simbiosis (Dale, Plague et al. 2002; Cornelis 2006), para translocar proteínas efectoras hacia el citoplasma de la célula hospedera (Galan and Wolf-Watz 2006). Los inyectisomas están relacionados estructural y evolutivamente con el flagelo (organelo de motilidad bacteriana que también se ensambla a través de un SST3) (Cornelis 2006).

Los SST3 están formados por más de 20 proteínas y se dividen en dos estructuras:

i) Cuerpo basal: estructura cilíndrica que consiste en una serie de anillos embebidos en ambas membranas (interna y externa) conectados a través de una estructura periplásmica denominada eje.

ii) Estructura extracelular: constituida por el gancho y el filamento en el caso del flagelo; la aguja en patógenos de animales y el pilus Hrp en patógenos de plantas. Para algunas bacterias como EPEC, además de la aguja se ensambla también un filamento en la punta de ésta.

Adicionalmente, en el extremo distal de los inyectisomas se ensambla un complejo que forma un poro de translocación en la membrana citoplásmica de la célula hospedera a través del cual se translocan los efectores (Cornelis 2006).



### **Sistema de secreción tipo III de *Escherichia coli* enteropatógena.**

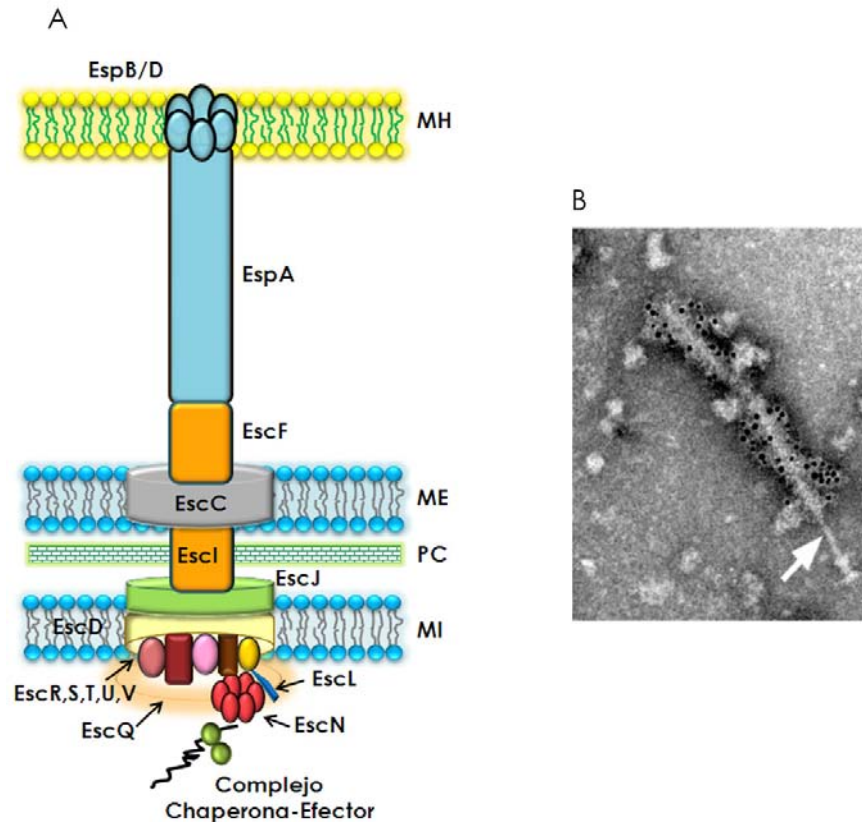
El SST3 de EPEC está compuesto por una estructura cilíndrica (cuerpo basal) que atraviesa ambas membranas. En la membrana externa se ensambla un anillo compuesto por 12 subunidades de la proteína EscC, miembro de la familia de las secretinas (Gauthier, Puente et al. 2003). En la membrana interna se ensamblan dos anillos: la lipoproteína EscJ oligomeriza para formar un anillo de 24 subunidades asociado a la cara periplásmica de la membrana interna (Yip, Kimbrough et al. 2005), mientras que EscD forma el anillo que se asocia con la cara citoplásmica. Estos anillos están conectados a través de un eje periplásmico conformado por la proteína EscI (figura 5) (Pallen, Beatson et al. 2005).

La parte extracelular del inyectisoma está formada por la aguja, un polímero helicoidal de aproximadamente 55 nm de longitud que se ensambla por la polimerización de subunidades de la proteína EscF (Sekiya, Ohishi et al. 2001; Wilson, Shaw et al. 2001). Además, en EPEC, la proteína EspA polimeriza en la parte distal de la aguja para formar un filamento que funciona como puente físico entre la bacteria y el enterocito; se cree que este filamento facilita la inserción del inyectisoma a través de la capa mucosa que recubre a estas células (Knutton, Rosenshine et al. 1998; Sekiya, Ohishi et al. 2001). Finalmente, en la punta del filamento se ensamblan las proteínas EspB y EspD que forman el poro de translocación en la membrana de los enterocitos (Ide, Laarmann et al. 2001).

Un canal de aproximadamente 2-3 nm de diámetro recorre el SST3, y a través de éste son exportados los efectores desde el citoplasma bacteriano hasta el citoplasma de los enterocitos. En el citoplasma de EPEC, los efectores se encuentran en complejo con proteínas denominadas chaperonas, las que además de conferirles estabilidad, los dirigen hacia la base del SST3 (Feldman and Cornelis 2003).

En la base del SST3 se encuentra el aparato de exportación, que es esencial para que ocurra la secreción a través de estos sistemas. De hecho, 8 de las

proteínas más conservadas entre los diferentes SST3 forman parte de este complejo proteico (Macnab 1999), entre ellas EscN (Pallen, Beatson et al. 2005), la ATPasa del SST3 de EPEC (Andrade, Pardo et al. 2007). Se ha propuesto que mediante la hidrólisis de ATP las ATPasas asociadas a los SST3 se encargan de disociar los complejos chaperona-efector, desplegar los efectores y energizar su secreción a través de este sistema (Akeda and Galan 2005).



**Figura 5.** Sistema de secreción tipo III de EPEC. (A) Esquema del injectisoma de EPEC. (B) Microscopía electrónica de transmisión que muestra un injectisoma purificado de EPEC. El filamento EspA se marcó con anticuerpo anti-EspA acoplado a partículas de oro; la flecha señala a la aguja (Sekiya, Ohishi et al. 2001).

El ensamblaje de los SST3 es un proceso altamente regulado que ocurre de manera ordenada o jerárquica. Es decir, existen distintas categorías de sustratos que son exportados según la etapa de ensamblaje en la que se encuentre el sistema. Esta jerarquía en la secreción permite que el SST3 se ensamble de manera eficiente y asegura que no se secreten componentes hasta que los previos han sido ensamblados.

## Jerarquía de secreción en el SST3 de EPEC.

En EPEC, la secreción de proteínas a través del SST3 se induce en respuesta a condiciones similares a las del tracto gastrointestinal (Kenny, Abe et al. 1997), esto es, a 37°C, pH 7 y osmolaridad fisiológica así como en presencia de bicarbonato de sodio (Abe, Tatsuno et al. 2002).

Durante la morfogénesis del inyectisoma, los componentes de los anillos y las proteínas membranales del aparato de exportación se ensamblan a través de la vía Sec (tabla 1), que es la vía general de secreción que media la translocación de proteínas a través de la membrana interna y la inserción de proteínas membranales; mientras que los componentes restantes son exportados vía SST3 (Sukhan, Kubori et al. 2001; He, Nomura et al. 2004).

Recientemente se observó el orden en el que se ensamblan algunos de los componentes Sec dependientes del SST3 de *Yersinia enterocolitica* (Diepold, Amstutz et al. 2010): el ensamblaje comienza con la secretina (EscC en el caso de EPEC) que forma el anillo de membrana externa y prosigue hacia el interior a través de YscD y YscJ (EscD y EscJ en EPEC) que forman los anillos de membrana interna; una vez que éstos han sido ensamblados, se forma un complejo citosólico formado por las proteínas YscK, YscL, YscN y YscQ. El ensamblaje de este complejo ocurre en un solo paso y no requiere de las proteínas membranales que forman el aparato de exportación, cuya función en el proceso de ensamblaje aun no es clara.

<b>Tabla 1. Componentes del SST3 que se ensamblan vía Sec.</b>		
<b>EPEC</b>	<b><i>Yersinia enterocolitica</i></b>	<b>Función</b>
EscC	YscC	Componente del anillo de ME
EscD	YscD	Componente del anillo de MI
EscJ	YscJ	Componente del anillo de MI
EscR	YscR	Aparato de exportación
EscS	YscS	Aparato de exportación
EscT	YscT	Aparato de exportación
EscU	YscU	Aparato de exportación
EscV	YscV	Aparato de exportación

Componentes del SST3 ensamblados vía Sec. Modificada de (Diepold, Amstutz et al. 2010)

Las proteínas que se secretan vía SST3 se dividen en tres categorías (Deane, Abrusci et al. 2010):

- ❖ **Sustratos tempranos:** en esta categoría se encuentran las proteínas que forman el eje periplásmico (EscI) y la aguja (EscF).
- ❖ **Sustratos intermedios:** las proteínas EspA, EspB y EspD constituyen los sustratos intermedios o translocadores.
- ❖ **Sustratos tardíos:** también conocidos como efectores, son las proteínas de virulencia translocadas hacia el interior de la célula hospedera.

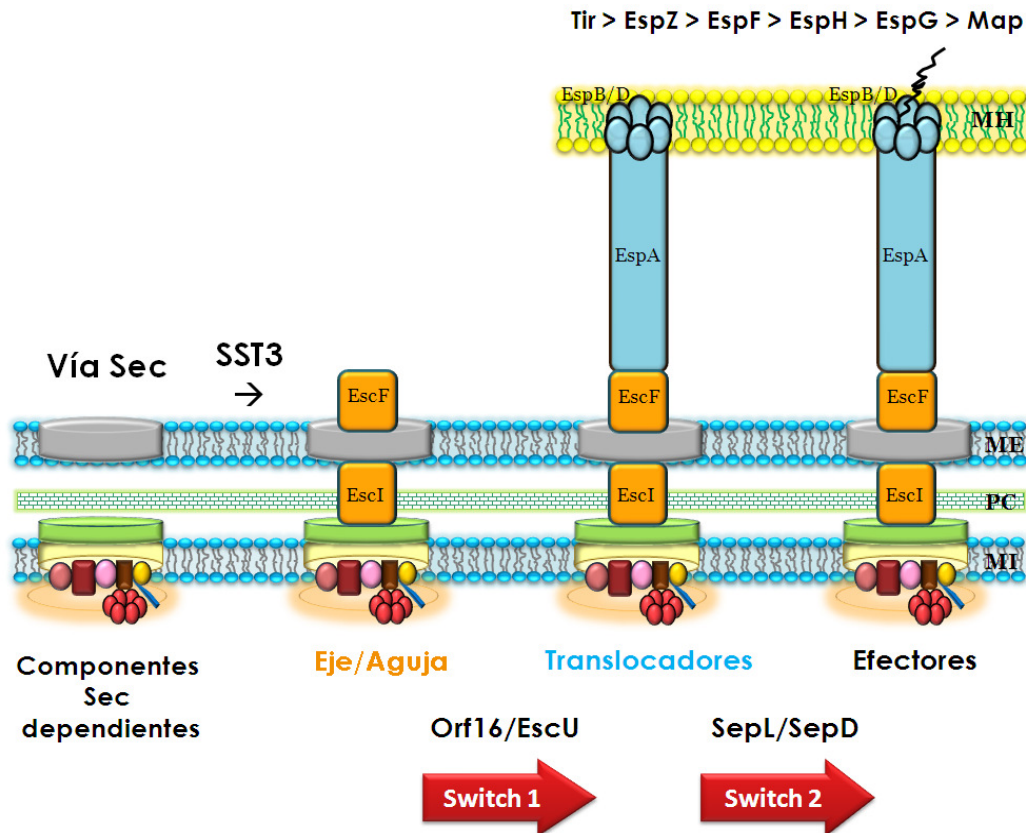
Existe una jerarquía en la secreción de los sustratos del SST3 (figura 6); es decir, cada categoría de sustratos se secreta de manera diferencial dependiendo la etapa del ensamblaje en la que se encuentra el sistema (Tree, Wolfson et al. 2009; Deane, Abrusci et al. 2010).

Los primeros sustratos en ser secretados vía SST3 son los sustratos tempranos, éstos se dirigen al aparato secretor después de que se ensamblan los componentes Sec dependientes. Posteriormente se secretan los sustratos intermedios y al final los sustratos tardíos.

Se sabe poco acerca de los mecanismos que regulan el cambio en la especificidad de secreción de sustratos; sin embargo, se han descrito dos *switches* o interruptores moleculares que participan en el control de la jerarquía de secreción (Tree, Wolfson et al. 2009; Deane, Abrusci et al. 2010):

- ❖ **Interruptor molecular 1 (Switch 1):** controla el cambio en la especificidad de sustratos tempranos (eje y aguja) a intermedios (translocadores). Este cambio ocurre cuando la aguja alcanza su longitud final (~55nm).
- ❖ **Interruptor molecular 2 (Switch 2):** controla el cambio de especificidad de sustratos intermedios (translocadores) a sustratos tardíos (efectores). Este interruptor molecular evita la secreción de efectores hasta que se da el contacto celular.

Adicionalmente, existe una jerarquía en la translocación de efectores hacia la célula hospedera, el primer efector en ser translocado es Tir, seguido de EspZ, EspF, EspH, EspG y Map (Mills, Baruch et al. 2008).



**Figura 6.** Jerarquía de secreción del SST3 de EPEC. En el esquema se muestran los componentes ensamblados vía Sec y las proteínas citoplásmicas asociadas a éstos, así como los sustratos del SST3: tempranos (anaranjado), intermedios (azul) y tardíos (negro). También se esquematizan los dos interruptores moleculares (*switches*) que regulan la jerarquía de secreción así como las proteínas involucradas.

### Interruptor molecular 1: de sustratos tempranos a intermedios.

El interruptor molecular 1 controla el cambio en la especificidad de secreción de sustratos tempranos a intermedios, para que este cambio se dé, primero debe ensamblarse la aguja, y una vez que ésta alcanza una longitud de aproximadamente 55 nm (en EPEC), ocurre el primer interruptor molecular. Este proceso involucra dos mecanismos: la medición de la longitud de la aguja y el cambio en la especificidad de secreción de sustratos (Cornelis 2006).

**Medición de la longitud de la aguja:** La longitud de la aguja varía entre diferentes especies, sin embargo, es un proceso altamente regulado (Journet,

Agrain et al. 2003; Mota, Journet et al. 2005). En *Yersinia enterocolitica* la proteína YscP controla dicho proceso, ya que la pérdida de esta proteína resulta en el ensamblaje de agujas de tamaño anormal (Edqvist, Olsson et al. 2003; Journet, Agrain et al. 2003).

Para explicar cómo se regula la longitud de la aguja en *Y. enterocolitica* se propuso el modelo de la regla molecular. Deleciones e inserciones en *yscP* conllevan al ensamblaje de agujas cortas o largas, respectivamente. Además, existe una correlación lineal entre el número de residuos de YscP y la longitud de la aguja, sugiriendo que la proteína actúa como regla molecular (Journet, Agrain et al. 2003). En el modelo propuesto, se permite la secreción de subunidades de la aguja hasta que ésta alcanza la longitud de la proteína YscP extendida, en este punto, YscP provoca un cambio en la especificidad de sustratos que termina con la exportación de subunidades de la aguja (sustratos tempranos) (Journet, Agrain et al. 2003; Cornelis 2006). La proteína YscP se secreta vía SST3 y dicha secreción se requiere para controlar la longitud de la aguja, pero no es necesaria para el cambio en la especificidad de sustratos (Payne and Straley 1999; Agrain, Sorg et al. 2005; Riordan, Sorg et al. 2008).

De acuerdo al modelo de la regla molecular, YscP puede ocupar físicamente el canal de secreción mientras se exportan las subunidades de la aguja o bien, secretarse periódicamente para "chechar" la longitud de la aguja, como se ha propuesto para el gancho en el sistema flagelar (Moriya, Minamino et al. 2006); sin embargo, no se sabe con claridad cuál es el mecanismo mediante el cual ocurre dicho proceso de medición (Journet, Agrain et al. 2003).

**Cambio en la especificidad de sustratos:** adicionalmente a su papel como regla molecular, YscP participa en el cambio en la especificidad de sustratos, provocando un cambio que termina con la exportación de subunidades de la aguja. Esta función como interruptor molecular es mediada por la interacción entre YscP y un componente del aparato de exportación, la proteína YscU (Edqvist, Olsson et al. 2003; Cornelis 2006).

YscU es una proteína membranal que posee un dominio carboxilo citoplásmico. En este dominio ocurre una autoproteólisis entre una asparagina (Asn) y una prolina (Pro) en el motivo altamente conservado NPTH. Dicho procesamiento produce dos fragmentos del dominio C-terminal, CN y CC que se mantienen fuertemente asociados entre ellos y con el extremo N-terminal (membranal) de YscU. El motivo NPTH se localiza en una región expuesta de YscU, y se ha observado que dicha región adopta una conformación distinta cuando la proteína se procesa. Mutaciones en la Asn y Pro que previenen el corte proteolítico interfieren con el cambio en la especificidad de sustratos, estas mutantes no secretan sustratos intermedios. Por lo anterior, se propuso que el corte de YscU se requiere para que la proteína adopte una conformación que permita el reconocimiento de los translocadores o sustratos intermedios (Sorg, Wagner et al. 2007).

El mecanismo propuesto es causa de debate debido a que no se requiere de ningún factor para la autoproteólisis de YscU y ésta ocurre en cuanto la proteína se sintetiza y pliega, por lo cual el procesamiento que sufre YscU no podría ser como tal el evento que permita el cambio en la especificidad de la secreción de sustratos. Dicho cambio podría ser más bien el resultado de la interacción entre la forma procesada de YscU y otras proteínas del SST3 (Deane, Abrusci et al. 2010).

En EPEC, los ortólogos de YscP y YscU son Orf16 y EscU respectivamente y se piensa que estas proteínas podrían regular la longitud de la aguja y el cambio en la especificidad de sustratos de la misma manera que sus ortólogos en *Yersinia* (Zarivach, Deng et al. 2008).

### **Interruptor molecular 2: de sustratos intermedios a tardíos.**

La translocación de efectores hacia el citoplasma de la célula hospedera es el mecanismo principal de virulencia empleado por diversas bacterias patógenas. Los efectores son proteínas de virulencia que modulan distintas funciones celulares y alteran vías de señalización del hospedero para facilitar la proliferación bacteriana y el desarrollo de la enfermedad. La translocación

de efectores hacia el hospedero requiere de la formación de un poro (formado por las proteínas translocadoras) en la membrana del hospedero. Por lo anterior, las bacterias han desarrollado mecanismos para asegurar que los translocadores sean secretados antes que los efectores, evitando así que estos últimos sean secretados al medio extracelular.

El segundo interruptor molecular regula la transición de secreción de translocadores (sustratos intermedios) a efectores (sustratos tardíos). Se han identificado varias proteínas que actúan como reguladores de la secreción a este nivel: *Sepl* en EPEC, *MxiC* en *Shigella*, *YopN/TyeA* en *Yersinia* y *SsaL* e *InvE* en *Salmonella* (Pallen, Beatson et al. 2005). Todas estas proteínas previenen la secreción temprana de efectores ya que su pérdida causa un aumento en la secreción de éstos; sin embargo, su papel en la secreción de translocadores no está del todo claro ya que en mutantes en *sepl*, *ssaL*, *mxiC* e *invE* la secreción de translocadores se ve severamente afectada (Kubori and Galan 2002; Coombes, Brown et al. 2004; Deng, Puente et al. 2004; Deng, Li et al. 2005; Martinez-Argudo and Blocker 2010); mientras que en mutantes en *yopN* y *tyeA* la secreción de éstos aumenta (tabla 2) (Forsberg, Viitanen et al. 1991; Iriarte, Sory et al. 1998; Day, Ferracci et al. 2003; Ferracci, Schubot et al. 2005). De todas estas proteínas sólo *YopN* y *MxiC* son secretadas vía SST3 (Cheng, Kay et al. 2001; Botteaux, Sory et al. 2009; Martinez-Argudo and Blocker 2010).

<b>Tabla 2. Fenotipo de mutantes en el interruptor molecular 2.</b>				
<b>MUTANTE</b>	<b>Fenotipo de secreción</b>		<b>Sustrato de secreción</b>	<b>Referencia</b>
	<b>Efectores</b>	<b>Translocadores</b>		
<b><i>sepl</i></b>	Aumenta	Abate	No	(Deng, Puente et al. 2004; Deng, Li et al. 2005)
<b><i>ssaL</i></b>	Aumenta	Abate	No	(Yu, McGourty et al. 2010)
<b><i>invE</i></b>	Aumenta	Reduce	No	(Kubori and Galan 2002)
<b><i>mxiC</i></b>	Aumenta	Reduce	Si	(Botteaux, Sory et al. 2009; Martinez-Argudo and Blocker 2010)



<b>yopN</b>	Aumenta	Aumenta	Si	(Forsberg, Viitanen et al. 1991; Ferracci, Day et al. 2004; Ferracci, Schubot et al. 2005)
<b>tyeA</b>	Aumenta	Aumenta	No	(Iriarte, Sory et al. 1998)

### **Sepl: regulador del segundo interruptor molecular en EPEC.**

Sepl es una proteína de 351 aminoácidos codificada por el primer gen (*sepl*) del operón LEE4, tiene una masa molecular predicha de 39.9 kDa y se localiza en el citoplasma bacteriano, aunque también se ha encontrado asociada a membrana (Kresse, Beltrametti et al. 2000; O'Connell, Creasey et al. 2004; Deng, Li et al. 2005; Wang, Roe et al. 2008). En una mutante nula en el gen *sepl* ( $\Delta sepl$ ) se incrementa la secreción de efectores y se abate totalmente la de translocadores por ello, a pesar de que secreta efectores, es incapaz de infectar células (Deng, Puente et al. 2004; Deng, Li et al. 2005; Wang, Roe et al. 2008).

Sepl interactúa con una proteína asociada a membrana denominada SepD (Creasey, Delahay et al. 2003; O'Connell, Creasey et al. 2004; Deng, Li et al. 2005; Wang, Roe et al. 2008); de hecho, se ha demostrado que SepL se asocia a membrana de manera dependiente de SepD (Wang, Roe et al. 2008). La delección del gen que codifica para SepD tiene el mismo fenotipo que una mutante en *sepl* (abate la secreción de translocadores e hipersecreta efectores) (Deng, Puente et al. 2004; Deng, Li et al. 2005). Debido a su fenotipo se propuso que SepL y SepD forman un complejo que regula el cambio en la especificidad de secreción de sustratos intermedios a tardíos (Deng, Li et al. 2005).

Se han propuesto diversos modelos para intentar explicar el mecanismo mediante el cual el complejo formado por SepD y SepL regula el cambio en la especificidad de secreción de sustratos intermedios a tardíos, dos de los modelos más recientes y que permanecen vigentes son los siguientes:

➤ **Modelo 1: SepL/SepD actúan como porteros.**

Este modelo propone que las proteínas SepL/SepD actúan como porteros en la base del aparato de secreción, permitiendo la exportación selectiva de translocadores mientras que impiden la de efectores.

La composición del medio en que se crece a EPEC juega un papel importante en la secreción de proteínas. En presencia de calcio la cepa silvestre secreta preferencialmente translocadores y pocos efectores, pero al eliminar el calcio del medio, la secreción de translocadores se reduce y aumenta la de efectores (Kenny, Abe et al. 1997; Ide, Michgehl et al. 2003; Deng, Li et al. 2005). Este fenómeno es similar al fenotipo de las mutantes *sepL* y *sepD*, las cuales sin embargo, no se ven afectadas por la presencia o ausencia de calcio (ciegas al calcio). Este efecto diferencial sugiere que el calcio podría ser la señal que regula la jerarquía de secreción de efectores y translocadores probablemente a través del complejo SepD/SepL. Sin embargo, la presencia o ausencia de éste no afecta la estabilidad de estas proteínas ni su interacción, por lo que aun no está claro qué proteína(s) podrían detectar dicha señal y si ésta es la única que promueve la jerarquía en la secreción (Deng, Li et al. 2005).

Con estas observaciones se propuso un modelo donde la secreción tipo III ocurre en dos fases (Deng, Li et al. 2005):

En la primera fase, cuando EPEC entra al hospedero, las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal activan la expresión del LEE, lo que da lugar al ensamblaje del SST3. En el fluido extracelular del lumen intestinal, donde las concentraciones de calcio son de ~2.5 mM, la bacteria secreta sólo translocadores (EspA, EspB y EspD), permitiendo el ensamblaje del poro de translocación en la membrana del hospedero. A través del poro se forma un conducto que conecta el citosol bacteriano ( $0.1-1 \text{ M Ca}^{2+}$ ) con el del hospedero, donde el calcio es limitado (100-300 nM) (Deng, Li et al. 2005).

En la segunda fase, la bacteria detecta la baja concentración de calcio del hospedero (evento que sirve como señal para indicar contacto celular). Esta señal suprime la secreción de translocadores y activa la de efectores (probablemente a través del complejo SepL/SepD). Este efecto diferencial del calcio en la secreción de translocadores y efectores asegura que los translocadores sean secretados antes que los efectores para que así éstos puedan ser translocados directamente a la célula hospedera.

➤ **Modelo 2: SepL retiene al efector Tir.**

Este modelo se basa en la observación de que SepL interactúa con el efector Tir (Wang, Roe et al. 2008). Tir, no solo es el primer efector en ser translocado hacia el hospedero (Mills, Baruch et al. 2008), sino que además, su secreción se requiere para la secreción de los otros efectores en un fondo  $\Delta sepD$  (Thomas, Deng et al. 2007).

Una versión trunca de SepL (sin los últimos 11 aminoácidos) no interactúa con Tir. Cuando esta versión de SepL se introduce en un fondo  $\Delta sepL$  sólo complementa la secreción de translocadores, pero los efectores se siguen hipersecretando, además, se pierde la sincronía en la secreción, ya que en una cepa silvestre se secretan primero los translocadores y después los efectores, pero en este caso, ambos sustratos se secretan al mismo tiempo (Wang, Roe et al. 2008).

Con lo anterior, se propuso que la interacción entre SepL y Tir tiene como objetivo "retener" al efector Tir mientras se secretan los translocadores; y cuando el poro de translocación se inserta en la membrana del hospedero, se detecta una señal que promueve la disociación del complejo SepL/Tir, y con esto, Tir se transloca hacia el hospedero y entonces también los demás efectores se pueden translocar (Wang, Roe et al. 2008).

Aun se desconoce el mecanismo mediante el cual se promueve la disociación del complejo SepL/Tir, sin embargo, recientemente se demostró que SepL interactúa con EscD, proteína que forma uno de los anillos de la membrana

interna, y que esta interacción se da a través de los últimos 11 aminoácidos de SepL (mismos que promueven la interacción con Tir). Además, la sobreexpresión de EscD en EPEC, desregula la secreción de Tir (Ogino, Ohno et al. 2006). Lo anterior sugiere que la interacción de SepL con Tir y SepL con EscD podría ser excluyente y que dichas interacciones son importantes para la regulación de la secreción.

También se ha observado que algunos ortólogos de SepL interactúan con la ATPasa de sus respectivos SST3 (Stone, Johnson et al. 2008; Botteaux, Sory et al. 2009), sin embargo, no se ha demostrado la funcionalidad de dicha interacción.

A pesar de los avances en el entendimiento de la regulación de la jerarquía de secreción, se desconoce el mecanismo mediante el cual SepL y SepD regulan el cambio en la especificidad de la secreción de sustratos, así como el papel de otras proteínas del sistema que pudieran estar involucradas en la regulación de este proceso. Es por ello que el presente trabajo se enfoca en el estudio de SepL, sus interacciones con otros componentes del SST3 y su papel en la jerarquía de secreción.

## JUSTIFICACIÓN

A pesar del conocimiento acumulado y la gran importancia acerca del mecanismo a través del cual se regula la secreción ordenada de translocadores y efectores a través del SST3 de EPEC, éste apenas comienza a dilucidarse. Aun es poco entendido qué proteínas están involucradas en dicho proceso y cuál es su papel específico en la regulación del mismo.

Debido a que la translocación de efectores es esencial para la virulencia de EPEC y otros patógenos, es de suma importancia el estudio de los mecanismos moleculares que regulan dicho proceso, ya que un mejor entendimiento de éste podría, a largo plazo, proveer el conocimiento necesario para generar herramientas que permitan la prevención y/o control de infecciones por este patógeno.

Por lo anterior, en este trabajo se realizó la caracterización de SepL, una de las proteínas que participan en el mecanismo de regulación del cambio en la especificidad de secreción de sustratos intermedios (translocadores) a tardíos (efectores).

## **HIPÓTESIS**

La proteína SepL del SST3 de EPEC interactúa con varios componentes del sistema, como la ATPasa EscN y la proteína SepD, y es la interacción dinámica entre estas proteínas la que regula la jerarquía de secreción de sustratos.

## OBJETIVOS

### General

Caracterizar a la proteína SepL y estudiar su papel en los mecanismos de regulación del cambio en la especificidad de secreción de sustratos.

### Particulares

- Clonar al gen *sepL* en distintos vectores de expresión.
- Purificar a la proteína SepL.
- Generar anticuerpos policlonales anti-SepL
- Caracterizar el fenotipo y complementación de una mutante en el gen *sepL*.
- Analizar interacciones entre SepL y distintas proteínas del SST3.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas y medios de cultivo.

*Escherichia coli* enteropatógena E2348/69 O127:H6 se creció a 37 °C (en incubadora con 5 % CO<sub>2</sub>) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) adicionado con estreptomycin (50 g/ml). Adicionalmente, todas las cepas de *E. coli* y *Salmonella* utilizadas en este estudio (tabla 2) se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) a 37 °C, adicionado, cuando se requirió, con los siguientes antibióticos: ampicilina (100 g/ml), cloranfenicol (25 g/ml) estreptomycin (50 g/ml), kanamicina (50 g/ml) y/o tetraciclina (25 g/ml).

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio		
Cepa	Descripción	Fuente/Referencia
<b>Cepas de <i>Escherichia coli</i></b>		
BL21 ( DE3) pLysS	Cepa para expresión a partir del promotor T7. Posee el gen de la T7 RNA polimerasa y el plásmido pLysS que además de conferir resistencia a cloranfenicol codifica el gen para la lisozima T7 que reduce la expresión basal de genes regulados por el promotor T7. Deficiente en las proteasas OmpT y Lon.	Novagen/(Studier, Rosenberg et al. 1990)
M15 [pREP4]	Cepa derivada de K12, carece de una copia cromosomal del gen <i>lacI<sup>a</sup></i> . Posee el plásmido pREP4 que confiere resistencia a kanamicina y expresa constitutivamente el represor LacI (codificado por el gen <i>lacI</i> ).	Qiagen
Top-10	Cepa con alta eficiencia de transformación, permite la transformación de DNA metilado (preparaciones genómicas) y no metilado (amplificación por PCR). Resistente a estreptomycin.	Invitrogen
XL1-Blue	Células deficientes en la endonucleasa I ( <i>endA</i> ) y recombinasa A ( <i>recA</i> ), lo que mejora la estabilidad y calidad del DNA plasmídico exógeno. Resistente a tetraciclina.	Stratagene



<b>Cepas de EPEC</b>		
E2348/69	EPEC silvestre serotipo O127:H6. Resistente a estreptomicina.	Donada por el Dr. Puente J. L./ (Levine, Bergquist et al. 1978)
$\Delta$ escN	EPEC E2348/69 con una deleción en fase del gen <i>escN</i> . Resistente a estreptomicina.	Donada por el Dr. Puente J. L./ (Gauthier, Puente et al. 2003)
$\Delta$ sepL	EPEC E2348/69 con una deleción en fase del gen <i>sepL</i> . Resistente a estreptomicina.	Donada por el Dr. Puente J. L./ (Deng, Li et al. 2005)
$\Delta$ sepD	EPEC E2348/69 con una deleción en fase del gen <i>sepD</i> . Resistente a estreptomicina.	Donada por el Dr. Puente J. L./ (Deng, Li et al. 2005)
$\Delta$ orf12	EPEC E2348/69 con una deleción de los nucleótidos 60 a 306 del gen <i>orf12</i> , e inserción de un casete de kanamicina. Resistente a estreptomicina y kanamicina.	Díaz, M.A. No publicado
<b>Cepas de Salmonella</b>		
JR501	Cepa deficiente en los sistemas de restricción y competente en los de modificación <i>galE</i> ( <i>hsd</i> , <i>rm</i> <sup>+</sup> ). Permite la incorporación de DNA plasmídico metilado. Resistente a estreptomicina.	(Ryu and Hartin 1990)
SJW1368	Cepa mutante de los genes <i>flhDC</i> y <i>cheW</i> incapaz de ensamblar flagelo (no móvil)	(Ohnishi, Ohto et al. 1994)

### **Manipulación de DNA**

**Amplificación por PCR.** A partir de DNA cromosomal de EPEC se diseñaron oligonucleótidos y se amplificó el gen *sepL* así como dos versiones trunca de los primeros 10 y 75 codones mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando la polimerasa *Taq* (Invitrogene) o *Pfu* (Stratagene) y los oligonucleótidos que se enlistan en la tabla 3.

Los genes amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en amortiguador TAE 1X (Apéndice 1), se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron con luz ultravioleta.

<b>Tabla 3. Lista de oligonucleótidos utilizados.</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5' → 3'</b>	<b>Sitio de restricción</b>
<b>sepl</b>		
seplGSTFw	ATTACGTGAGGATCCATGGCTAAT	BamHI
seplGSTRv	TAAAAGAATTC AATATCACATAAC	EcoRI
<b>sepl</b>		
seplNdeIF	AGTTTCATATGGCTAATGGTATTG	NdeI
seplXhoIRv	AAAAAACACTCGAGCATAACATCC	XhoI
<b>sepl Δ10</b>		
sepl10	GTAGCGCAAGGCATATGGAGGAAGG	NdeI
seplBamHIR	CTATAAAAAAAGGATCCTCACAT	BamHI
<b>sepl Δ75</b>		
seplGlu76	GAATTAATCATATGCCCGCATCT	NdeI
seplBamHIR	CTATAAAAAAAGGATCCTCACAT	BamHI

Se señalan las secuencias de restricción (subrayadas).

**Purificación de DNA.** Cuando el producto de PCR no presentó amplificados inespecíficos, la purificación se realizó con el estuche comercial PCR Purification de Qiagen. En el caso de existir bandas inespecíficas, el producto de PCR (o digestión con enzimas de restricción, ver más adelante) se corrió en un gel de agarosa, se cortó la banda correspondiente al gen y se purificó mediante el estuche Gel Extraction de Qiagen siguiendo las recomendaciones del fabricante.

**Clonación y subclonación de genes en distintos vectores.** Los genes amplificados mediante PCR se digirieron con enzimas de restricción (según los sitios con los que se diseñaron los oligonucleótidos) al igual que los vectores de clonación (tabla 4). Una vez digeridos y purificados tanto el inserto (gen) como el vector, se ligaron con la enzima T4 DNA Ligasa (New England Biolabs), y la reacción de ligación se incubó por 16 horas a 16 °C. El vector pGEM T-easy

está linearizado y tiene una timidina en los extremos 3' por lo que se pueden clonar directamente productos de PCR amplificados con polimerasas que adicionen adeninas en los extremos 3' del amplificado (*Taq*).

Para las subclonaciones el procedimiento fue el mismo, sólo que el gen (inserto) se obtuvo a partir de plásmidos previamente construidos. Todas las enzimas de restricción fueron del proveedor New England Biolabs.

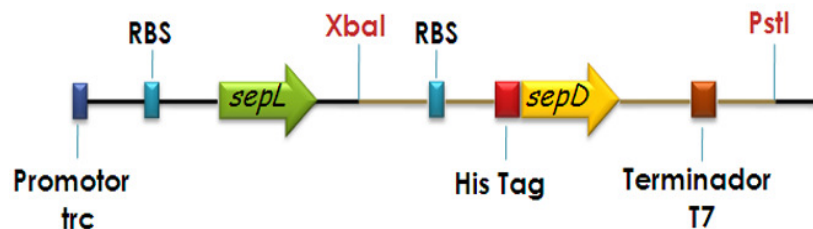
Las reacciones de ligación se transformaron en células competentes (ver más adelante) de *E. coli* Top-10. Las células transformantes se seleccionaron por la resistencia a antibióticos que le confiere el plásmido.

<b>Tabla 4. Plásmidos utilizados en este estudio.</b>		
<b>Plásmido</b>	<b>Descripción</b>	<b>Fuente/Referencia</b>
pGEM-T Easy	Este vector permite la clonación directa de productos de PCR amplificados con la <i>Taq</i> polimerasa. El sitio de multiclonación se encuentra en la región codificante del péptido de la $\beta$ -galactosidasa, cuya inactivación por inserción permite la identificación de recombinantes mediante el escrutinio de colonias blancas y azules. Confiere resistencia a ampicilina.	Promega
pQE30	Vector que permite la expresión de genes bajo el control del promotor T5, fusiona una etiqueta de 6 histidinas en la región 5' del gen clonado. Confiere resistencia a ampicilina.	Qiagen
pTrc99A	Vector que permite la expresión de genes bajo el control del promotor híbrido <i>trc</i> (contiene la región -35 y -10 de los promotores <i>trp</i> y <i>lac</i> UV5, respectivamente). Tiene el sitio de multiclonación del vector pUC18. Confiere resistencia a ampicilina.	(Amann, Ochs et al. 1988)
pTrc99A_FF4	Vector generado a partir de pTrc99A por la eliminación del único sitio <i>Nde</i> I y la sustitución del sitio <i>Nco</i> I de la región	(Ohnishi, Fan et al. 1997)

	de multiclonación por el sitio NdeI. Confiere resistencia a ampicilina.	
pET19b	Vector que permite la expresión de genes bajo el control del promotor T7. Fusiona una etiqueta de 10 histidinas en el extremo 5' del gen clonado. Confiere resistencia a ampicilina.	Novagen
pET23b	Vector que permite la expresión de genes bajo el control del promotor T7. Fusiona una etiqueta de 10 histidinas en el extremo 3' del gen clonado. Confiere resistencia a ampicilina.	Novagen
pGEX4T-2	Vector que permite la expresión de genes bajo el control del promotor <i>tac</i> . Fusiona la secuencia codificante de la glutatión S-transferasa (GST) en el extremo 5' del gen clonado. Confiere resistencia a ampicilina.	Amersham
pGADT7	Vector de expresión en levadura que fusiona la región codificante del dominio de activación de GAL4 (AD; aminoácidos 768-881) en el extremo 5' del gen clonado. La transcripción de la fusión está bajo el control del promotor constitutivo <i>ADH1</i> ( $P_{ADH1}$ ). La fusión contiene una señal de localización nuclear (SV40) en el extremo amino que dirige a la proteína recombinante al núcleo. Además, tiene el promotor T7. Este vector se replica de manera autónoma en <i>E. coli</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , contiene el gen de resistencia a ampicilina (para selección en <i>E. coli</i> ) y el marcador nutricional <i>LEU2</i> para selección en levadura.	Clontech
pGBKT7	Vector que permite la expresión de proteínas fusionadas a los aminoácidos 1 a 147 del dominio de unión a DNA de GAL4 (DNA-BD). La expresión está bajo el control del promotor constitutivo <i>ADH1</i> ( $P_{ADH1}$ ). Tiene el promotor T7. Se replica de	Clontech

manera autónoma en *E. coli* y *S. cerevisiae*. Contiene el gen de resistencia a kanamicina (para selección en *E. coli*) y el marcador nutricional *TRP1* para selección en levadura.

**Construcciones bicistrónicas.** La estrategia que se siguió para la construcción de plásmidos bicistrónicos (dos genes clonados en un mismo vector) fue la siguiente: primero se clonó un gen (*sepL*, *sepD*, *espA* o *espB*) en el vector pTrc99A\_FF4, una vez construidas las clonas individuales (pMTpL, pATpD, pETsA y pETsB) se linearizaron digiriendo con las enzimas de restricción XbaI/PstI, con excepción del pETsB que se digirió con Sall/PstI. El segundo gen se clonó primero en el vector pET19b (*sepD*, *sepL* y *orf29*) o pQE30 (*cesAB*), estos plásmidos se digirieron con las enzimas XbaI/PstI con excepción de *cesAB* en pQE30 que se digirió con XhoI/PstI, los insertos obtenidos contienen el sitio de unión a ribosoma del plásmido y una etiqueta de 10 (pET19b) o 6 histidinas (pQE30) en el extremo 5' y el gen. Se ligó el vector linearizado que contiene al gen 1 con el inserto (gen 2), y las reacciones de ligación se transformaron en células competentes Top-10 y las colonias transformantes se analizaron por restricción para verificar que tuvieran el inserto.



**Figura 7.** Esquema de la construcción bicistrónica pMTBISpLpD. Los dos genes clonados (*sepL* y *sepD*) quedan bajo el control del promotor *trc*; la línea negra representa el vector pTrc99A y la café el inserto proveniente del vector pET19b (sitios XbaI/PstI), el segundo sitio de unión a ribosoma es el de pET19b al igual que el terminador T7; el gen *sepD* tiene una fusión de 10 histidinas en el extremo 5'.

**Análisis de restricción.** Se aisló DNA plasmídico de las células transformantes con el estuche QIAprep Spin Miniprep de Qiagen. A partir del DNA plasmídico se realizó el análisis de restricción, incubando 3 µL de DNA con las enzimas de restricción correspondientes, H<sub>2</sub>O y el amortiguador de las enzimas utilizadas diluido a 1X. Las reacciones se realizaron a 37 °C por 4 horas (mínimo).

Mediante electroforesis en gel de agarosa se observó la digestión de DNA para corroborar que los fragmentos generados fuesen del tamaño (pares de bases) esperado. Posteriormente el DNA se transformó en células XL1-Blue (que mejoran la calidad del DNA aislado), se purificó DNA plasmídico y se mandó secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

En la tabla 5 se enlistan todas las construcciones (clonaciones y subclonaciones) que se realizaron y/o utilizaron en este estudio.

<b>Tabla 5. Construcciones de DNA realizadas/utilizadas en este estudio.</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>	<b>Fuente/Referencia</b>
pMEo29	Gen <i>orf29</i> clonado en pET19b	Este trabajo
pMTo29	Gen <i>orf29</i> clonado en pTrc99A_FF4	Este trabajo
pMTBISsAo29	Genes <i>espA</i> y <i>his-orf29</i> clonados en pTrc99A_FF4	Este trabajo
pMQcAB	Gen <i>cesAB</i> clonado en pQE30	Este trabajo
pMTBISsBcAB	Genes <i>espB</i> y <i>his-cesAB</i> clonados en pTrc99A_FF4	Este trabajo
pMEpL	Gen <i>sepL</i> clonado en pET19b	Este trabajo
pMTpL	Gen <i>sepL</i> clonado en pTrc99A_FF4	Este trabajo
pMTHpL	Gen <i>his-sepL</i> clonado en pTrc99A	Este trabajo
pMTBISpLpD	Genes <i>sepL</i> y <i>his-sepD</i> clonados en pTrc99A_FF4	Este trabajo
pMTBISpDpL	Genes <i>sepD</i> y <i>his-sepL</i> clonados en pTrc99A_FF4	Este trabajo
pMEpL Δ1-10	Gen <i>sepL</i> sin los primeros 10 codones clonado en pET19b	Este trabajo
pMTpL Δ1-10	Gen <i>sepL</i> sin los primeros 10 codones clonado en pTrc99A_FF4	Este trabajo
pMTHpL Δ1-10	Gen <i>his-sepL</i> sin los primeros 10 codones clonado en pTrc99A	Este trabajo
pMEpL Δ1-75	Gen <i>sepL</i> sin los primeros 75 codones clonado en pET19b	Este trabajo
pMTpL Δ1-75	Gen <i>sepL</i> sin los primeros 75 codones clonado en pTrc99A_FF4	Este trabajo
pMTHpL Δ1-75	Gen <i>his-sepL</i> sin los primeros 75 codones clonado en pTrc99A	Este trabajo
pMMpL	Gen <i>sepL</i> clonado en pGEM T-easy	Este trabajo
pMGpL	Gen <i>sepL</i> clonado en pGEX-4T2	Este trabajo
pME23bpL	Gen <i>sepL</i> clonado en pET23b	Este trabajo

pMGADpL	Gen <i>sepL</i> clonado en pGADT7	Este trabajo
pMTBISpLΔ75pD	Genes <i>sepL</i> sin los primeros 75 codones y <i>his-sepD</i> clonados en pTrc99A_FF4	Este trabajo
pMGADcT	Gen <i>cesT</i> clonado en pGADT7	Este trabajo
pMGBKcT	Gen <i>cesT</i> clonado en pGBKT7	Este trabajo
pOGBKpL	Gen <i>sepL</i> clonado en pGBKT7	Vicente, O. No publicado
pMGBDo12	Gen <i>orf 12</i> clonado en pGBKT7	Este trabajo
pNGADo12	Gen <i>orf 12</i> clonado en pGADT7	Espinosa, N. No publicado
pOGADpD	Gen <i>sepD</i> clonado en pGADT7	Vicente, O. No publicado
pOGBDpD	Gen <i>sepD</i> clonado en pGBKT7	Vicente, O. No publicado
pGBKT7-53	Codifica para una proteína de fusión entre el dominio de unión a DNA de GAL4 y la proteína murina p53	Clontech
pGADT7-T	Codifica para una proteína de fusión entre el dominio de activación de GAL4 y el antígeno T-largo de SV40	Clontech
pGBKT7-Lam	Codifica para una proteína de fusión entre el dominio de unión a DNA de GAL4 y la proteína lamina C	Clontech
pATHescN	Gen <i>his-escN</i> clonado en pTrc99A	Andrade, A. No publicado
pAMpL	Gen <i>sepL</i> clonado en pGEM T-easy	Castañeda, A. No publicado
pAMo29	Gen <i>orf29</i> clonado en pGEM T-easy	Castañeda, A. No publicado
pATpD	Gen <i>sepD</i> clonado en pTrc99A_FF4	Castañeda, A. No publicado
pAEpD	Gen <i>sepD</i> clonado en pET19b	Castañeda, A. No publicado
pETsA	Gen <i>espA</i> clonado en pTrc99A_FF4	Hernández, E. No publicado
pETsB	Gen <i>espB</i> clonado en pTrc99A_FF4	Hernández, E. No publicado

### **Preparación de células competentes (CaCl<sub>2</sub>) y transformación de DNA plasmídico.**

Se inocularon 2 mL de medio LB (con el antibiótico adecuado) con una colonia de la cepa bacteriana de la que se deseaban preparar células competentes, el cultivo se dejó crecer por 12 horas a 37 °C en agitación (250

rpm). Posteriormente se inocularon 30 mL de medio LB sin antibióticos con 300  $\mu$ L de cultivo y se dejó crecer hasta alcanzar una D.O.<sub>650nm</sub> de 0.3 a 0.5. Las células se recolectaron por centrifugación, 5 minutos a 8 228 x g. Se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 30 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío. Las células se dejaron reposar por 1 hora en hielo y nuevamente se centrifugaron 5 minutos a 8 228 x g. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 3 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío y se dejó incubando en hielo toda la noche.

Se tomaron 200  $\mu$ L de células competentes y se agregaron 2  $\mu$ L de DNA plasmídico, esta mezcla se dejó incubar por 45 minutos en hielo y posteriormente se incubó 2 minutos a 42 °C (choque térmico). Las células se recuperaron del choque térmico agregando 800  $\mu$ L de LB y se dejaron 1 hora a 37 °C. Finalmente se plaquearon en cajas de LB sólido con el antibiótico correspondiente.

### **Inducción de proteínas recombinantes.**

Las construcciones en los plásmidos de expresión se transformaron en la cepa hospedera adecuada [pET19b en BL21 ( DE3) pLysS; pTrc99A en JR501 y SJW1368 y pQE30 en M15 (pREP4)]. Se creció un cultivo en medio LB durante la noche con los antibióticos correspondiente, y a partir de éste se inoculó un cultivo de mayor volumen (~200 mL de medio LB con antibióticos) y se creció a 30 °C en agitación constante (250 rpm). Al alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6 a 0.8 se añadió IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.1 mM y se dejó crecer por otras 4 horas. Al final, las células se recolectaron por centrifugación y se almacenaron a -20 °C. Para realizar el perfil de inducción se tomaron muestras de 1.5 mL del cultivo antes de agregar el IPTG y cada hora después de haberlo agregado. Se tomó la densidad óptica del cultivo y las células se centrifugaron.

### **Fraccionamiento celular.**

Para determinar si la proteína recombinante sobreproducida se encontraba en la fracción soluble o formaba cuerpos de inclusión (fracción insoluble). Las



pastillas celulares del cultivo inducido se resuspendieron en 1/10 del volumen del cultivo de amortiguador TN (20mM Tris-HCl pH 8 y 500mM de NaCl) + 1mM de PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo); las células se lisaron con el sonicador Branson sonifier 450 (Duty cycle: 50%, Output control: 5) dando cuatro pulsos de 45 segundos; se dejaron reposar por 1 minuto entre cada pulso. El lisado celular se centrifugó por 30 minutos a 25 432 x g. El sobrenadante se tomó como la fracción soluble y la pastilla como la fracción insoluble.

### **Purificación de proteínas recombinantes.**

Las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad por níquel a partir de la fracción soluble de los lisados celulares. Se empacó una columna con 2 mL de resina de agarosa acoplada a níquel (Ni-NTA de Qiagen), se dejó eluir el amortiguador en el que viene resuspendida la resina y se lavó con agua; se equilibró con amortiguador TN y se cargó el sobrenadante, dejando eluir la fracción no unida; como las proteínas recombinantes tienen una etiqueta de histidinas se espera que a través de interacciones iónicas entre los anillos de imidazol de las histidinas y el níquel, éstas se inmovilicen en la columna. Para eliminar proteínas que se pegan de manera inespecífica a la resina, ésta se lavó con amortiguador TN adicionado con concentraciones crecientes de imidazol (de 40 mM hasta 80 mM). Las proteínas recombinantes se eluyeron de la resina con amortiguador TN más 400 mM de imidazol.

### **Generación y limpieza de anticuerpos policlonales.**

**Generación de anticuerpos policlonales.** Se generaron anticuerpos policlonales anti SepL ( -SepL) y anti CesAB ( -CesAB). Se obtuvo el suero preinmune de dos conejos hembra de la cepa Nueva Zelanda los que posteriormente se inmunizaron con ~200 g de proteína (SepL y CesAB, respectivamente) purificada y dializada en amortiguador TN. 15 días después de la primera inmunización se obtuvieron ~15 mL de sangre y se separó el suero de la fracción celular; se dejaron pasar 7 días antes del segundo refuerzo; el tercer refuerzo se inmunizó 3 semanas después del segundo y al final se sangró

el conejo a blanco. Se probaron distintas diluciones del suero contra muestras de SepL y CesAB, usando el estuche comercial de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico de Pierce (ver más adelante). El esquema de inmunización empleado se diseñó de acuerdo a las recomendaciones del manual "Antibodies: a Laboratory Manual" de Ed Harlow y David Lane.

#### **Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio saturado (SAS).**

Se agregaron 10 mL de sulfato de amonio saturado (SAS) gota por gota a 20 mL de suero mientras se agitaba en un baño de hielo. La mezcla se dejó incubar por 12 horas a 4 °C. Se centrifugó 10 minutos a 12 857 x g y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 20 mL de amortiguador PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4). Se volvieron a agregar 10 mL de SAS como se describió. Se dejó incubando por 12 horas a 4 °C. Se centrifugó 10 minutos a 12 857 x g, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 mL de PBS; finalmente se dializó contra 2.5 L de PBS toda la noche, se centrifugó el sobrenadante (10 minutos a 12 857 x g), se alicuotó y almacenó a -20 °C.

**Inmunoadsorción.** Para eliminar el reconocimiento inespecífico se inmunoadsorbieron las inmunoglobulinas. Se preparó un lisado celular de la cepa EPEC  $\Delta$ sepL; la fracción soluble del lisado se cargó en un gel de poliacrilamida al 15 % y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (2 horas a 70 volts); la membrana se incubó por 12 horas con las inmunoglobulinas anti-SepL 1:1000 en amortiguador tTBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween). Al otro día se recuperó el amortiguador y con esa muestra se realizó la inmunodetección.

#### **Inmunodetección (Western blot).**

Las muestras de proteínas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (15 %) bajo condiciones desnaturalizantes, SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 12 horas con amortiguador tTBS adicionado con 5 % de leche sin grasa. Posteriormente

se lavó la membrana con tTBS y se incubó con el anticuerpo primario por una hora a 4 °C en agitación. Se utilizaron distintos anticuerpos policlonales generados en el laboratorio ( -EspA, -EspB, -Tir, -SepL, -EscN y -EspA) así como algunos monoclonales ( -His y -DnaK). La membrana se lavó por 30 minutos con amortiguador tTBS y se incubó otra hora con el anticuerpo secundario (GAR-HRP: Goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase o GAM-HRP: Goat anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase) y se lavó por 30 minutos con tTBS. La inmunodetección se realizó utilizando el estuche de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico de Pierce.

### **Ensayo de secreción de proteínas.**

Las bacterias se crecieron en 2 mL de medio LB con el antibiótico adecuado por 12 horas a 37 °C en agitación. Se inocularon 9 mL de medio DMEM preequilibrado con 200 U de los cultivos crecidos a 37 °C en LB. Los cultivos en DMEM se dejaron crecer a 37 °C en condiciones estáticas en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> ~1. Para el análisis de la producción de proteínas, se tomó una muestra del cultivo de 1.5 mL y se centrifugó 5 minutos a 25 432 x g; se tomaron 1.4 mL de sobrenadante y se pasaron a un tubo limpio, se volvieron a centrifugar y el sobrenadante se precipitó con 10% de TCA (ácido tricloroacético) por 12 horas a 4°C; las pastillas celulares se resuspendieron en amortiguador de carga (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 0.1 % azul de bromofenol, 10 % glicerol) adicionado con 1 U de β-mercaptoetanol. El resto del cultivo (7.5 mL) se centrifugó 15 minutos a 15 557 g, se recuperó el sobrenadante y se precipitó con 10 % de TCA por 12 horas a 4 °C. Las proteínas precipitadas del sobrenadante (proteínas secretadas) se centrifugaron por 30 minutos a 25 432 x g, se desechó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en amortiguador de carga y tris saturado para neutralizar el TCA. Tanto las pastillas celulares como las proteínas precipitadas del sobrenadante se sometieron a SDS-PAGE para el análisis por tinción con azul de Coomassie e inmunodetección.

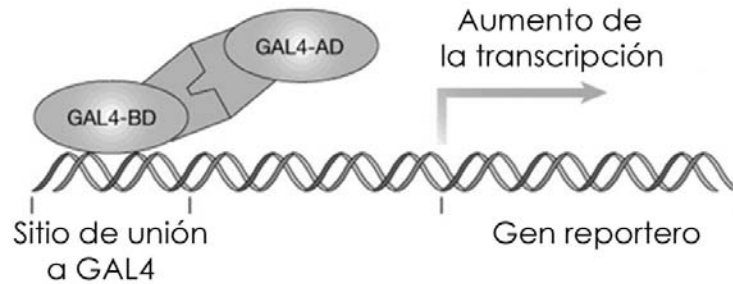
## **Ensayos de interacción proteína-proteína.**

**Copurificación (pull-down) por cromatografía de afinidad por níquel.** En este ensayo se sobreexpresan 2 proteínas (que se cree interactúan) una con etiqueta de histidinas y la otra sin etiqueta; se cargan en una resina de níquel y se sigue el procedimiento de purificación de proteínas (como se describió previamente). Si las proteínas interactúan, la que tiene histidinas retiene a la otra proteína en la resina de níquel y ambas co-eluyen (copurifican) a concentraciones altas de imidazol.

Las construcciones bicistrónicas (diseñadas de manera que sólo uno de los genes está fusionado a una etiqueta de histidinas) se transformaron en *Salmonella* JR501 y el DNA modificado que se purificó de esta cepa se transformó en *Salmonella* SJW1368. Se indujo la sobreexpresión de los genes con IPTG, las células se cosecharon por centrifugación y se rompieron por sonicación; se separó la fracción insoluble de la soluble (por centrifugación) y ésta última se cargó en una columna con 1 mL de resina de níquel (Ni-NTA de Qiagen); la resina se lavó con concentraciones crecientes de imidazol y al final las proteínas se eluyeron con 400 mM de imidazol. Para observar interacción entre proteínas de las cuales no se contaba con construcciones bicistrónicas, se realizaron las inducciones por separado, se prepararon las fracciones solubles y se mezclaron; esta mezcla se preincubó por 2 horas a 4 °C en agitación antes de agregarle la resina de níquel (Ni-NTA).

**Doble híbrido en levadura.** Este sistema está diseñado para detectar la interacción *in vivo* de dos proteínas fusionadas a los dominios de activación (AD; aminoácidos 768-881) y de unión a DNA (DNA-BD; aminoácidos 1-147) del activador transcripcional GAL4. Si las proteínas interactúan, se reconstituye GAL4 y aumenta la transcripción de genes reporteros (figura 8).

## Interacción positiva



**Figura 8.** Sistema de doble híbrido en levadura.

Se utilizó la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* AH109 que está diseñada para la detección de interacciones proteicas ya que contiene distintos genes reporteros (*ADE2*, *HIS3*, *lacZ* y *MEL1*) que sólo se expresan en presencia de GAL4; además, sus requerimientos nutricionales (marcadores auxotróficos: Ade, His, Leu, Trp, Ura y Met) permiten la selección de levaduras cotransformadas con los plásmidos que contienen las fusiones.

Se creció un cultivo de *S. cerevisiae* AH109 en medio YPDA (yeast peptone dextrose adenine) por 12 horas a 30 °C. A partir de este cultivo se inoculó otro de mayor volumen (30 mL de YPDA) y se dejó crecer a 30 °C en agitación constante hasta alcanzar de una D.O.<sub>600nm</sub> de ~1. Se tomaron 1.5 mL de cultivo (por cada reacción) y se centrifugaron 2 minutos a 8 145 x g. Se desechó el sobrenadante y las pastillas celulares se resuspendieron en 1 mL de H<sub>2</sub>O estéril. Nuevamente se centrifugaron las células a la misma velocidad y esta vez la pastilla celular se resuspendió en 1 mL de acetato de litio (LiAc) 0.1 M y se dejó incubando a temperatura ambiente por una hora, se centrifugó 2 minutos a 8 154 x g, el sobrenadante se desechó y se agregaron los siguientes componentes a las pastillas celulares:

240 L de PEG 3500 50% w/v.

36 L de LiAc.

5 L de DNA de espermatozoos de salmón como acarreador.

1 L de pGADT7 (vacío o con el gen de interés clonado).

1 L de pGBKT7 (con el gen de interés clonado).

77 L de H<sub>2</sub>O.

Las reacciones se incubaron por 45 minutos a 42 °C, posteriormente se centrifugaron 2 minutos a 8 154 x g, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 300  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, se plaquearon 150  $\mu$ L en cajas de medio mínimo SD (synthetic defined) –Trp –Leu (para seleccionar la cotransformación de los 2 vectores) y se dejaron crecer por 3 días a 30 °C.

Se picó una colonia de las levaduras transformadas y se creció por doce horas a 30 °C en medio mínimo SD –Trp –Leu. Se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó 2 minutos a 8 154 x g. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de H<sub>2</sub>O; se volvieron a centrifugar y a resuspender en H<sub>2</sub>O, ajustando el volumen de acuerdo a la densidad óptica del cultivo; posteriormente, se realizaron diluciones 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10 000, se gotearon 3  $\mu$ L de cada dilución en medio mínimo SD –Trp –Leu y SD –Trp –Leu –His (como medio de selección para interacciones positivas) y se dejaron crecer de 2 a 3 días a 30 °C.

El sistema de doble híbrido empleado (de Clontech) proporciona dos controles: en el positivo, la proteína murina p53 está fusionada al dominio de unión a DNA (pGBKT7-53) y el antígeno T grande de SV40 está fusionado al dominio de activación (pGADT7-T). Se sabe que p53 y el antígeno T grande interactúan en un ensayo de doble híbrido en levadura. Como control negativo se cotransformaron pGADT7-T y pGBKT7-Lam (que tiene clonado al gen de la lamina C humana fusionada al dominio de unión de DNA). Adicionalmente, se emplearon como controles los genes fusionados al dominio de unión a DNA contrasformados con el plásmido pGADT7 vacío (que contiene al dominio de activación) para corroborar que las proteínas no activaran solas.

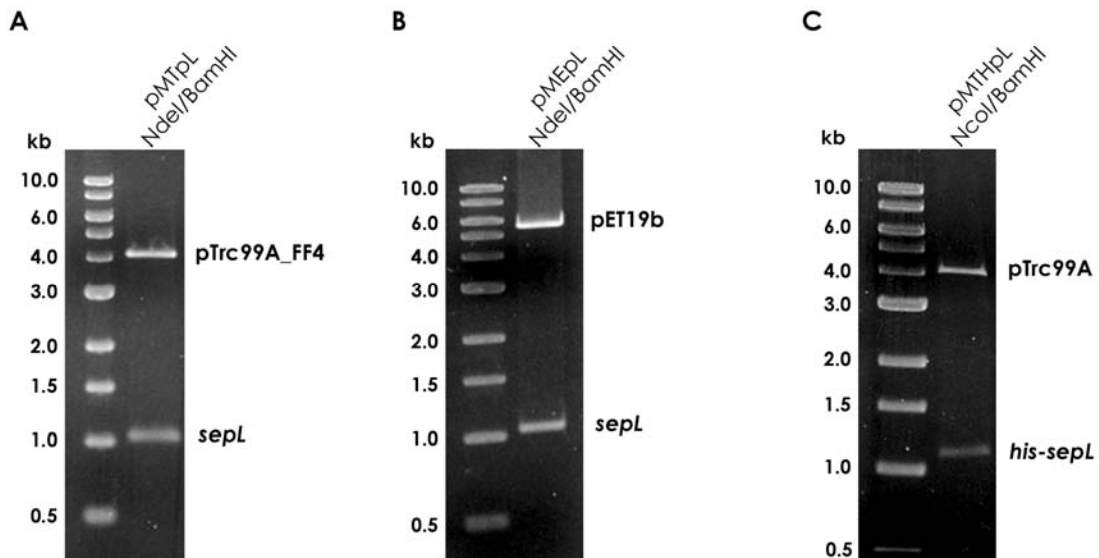
En el apéndice I se describen detalladamente los medios de cultivo y soluciones empleadas.

## RESULTADOS

### PARTE I. Caracterización de *sepL*.

#### Clonación de *sepL* en distintos vectores de expresión.

Se subclonó el gen *sepL* a partir de la construcción pAMpL. Este vector se digirió con las enzimas de restricción NdeI/BamHI y se liberó un fragmento de 1.05 kb que corresponde al gen *sepL*; al mismo tiempo se digirieron (con las mismas enzimas) los vectores pTrc99A\_FF4 y pET19b en los cuales se clonó el gen. Se aisló DNA plasmídico de las colonias transformantes y se verificó la presencia del inserto mediante análisis de restricción con las enzimas NdeI/BamHI. En la digestión de la construcción pMTpL se observaron dos fragmentos, uno de 1.05 kb que corresponde a *sepL* y otro de 4.1 kb que corresponde al vector pTrc99A\_FF4 (figura 9A); con respecto al análisis de restricción de la construcción pMEpL (*sepL* en pET19b) también se identificaron los fragmentos esperados de 1.05 kb y 5.7 kb (figura 9B) que corresponden al gen *sepL* y al vector respectivamente.

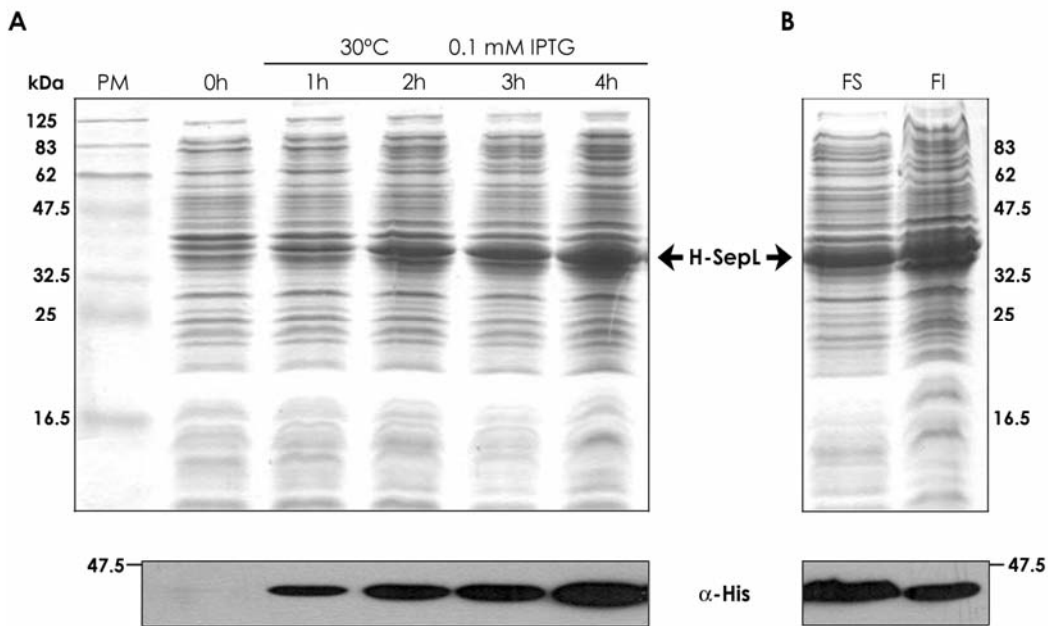


**Figura 9.** Clonación de *sepL* en distintos vectores de expresión. Electroforesis en geles de agarosa al 1 %. (A) Análisis de restricción de pMTpL y (B) pMEpL con las enzimas NdeI/BamHI así como (C) pMTHpL con NcoI/BamHI. Los tamaños de los fragmentos liberados son: *sepL* 1.05 kb, *his-sepL* 1.1 kb, pET19b 5.7 kb, pTrc99A y pTrc99A\_FF4 4.1 kb.

El vector pET19b fusiona una etiqueta de 10 histidinas en el extremo 5' del gen clonado (*sepL*). A partir de la construcción pMEpL se subclonó *his-sepL* (con sitios NcoI/BamHI) en el vector pTrc99A (figura 9C). A esta construcción se le nombró pMTHpL.

### Purificación de His-SepL.

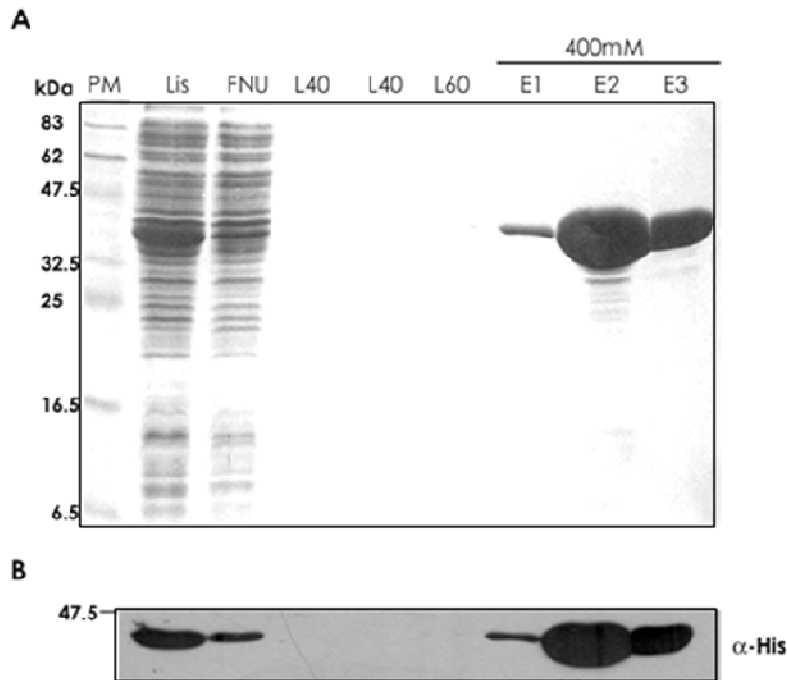
El vector pMTHpL se transformó en la cepa de *Salmonella* SJW1368. Se realizó un perfil de producción de la proteína His-SepL (figura 10A) y se observó que la producción de ésta incrementa después de inducir la expresión con 0.1 mM de IPTG. Posteriormente se realizó fraccionamiento celular y se observó que His-SepL permanece en ambas fracciones (figura 10B), tanto en la soluble como en la insoluble. Se confirmó la identidad de His-SepL mediante inmunodetección utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen a la etiqueta de histidinas (figura 10A y 10B, panel inferior).



**Figura 10.** Sobreproducción de His-SepL. (A) El plásmido pMTHpL se transformó en células SJW1368 y se indujo la expresión de His-SepL a 30 °C con 0.1 mM de IPTG. Se tomaron muestras cada hora después de agregado el IPTG. (B) Fraccionamiento celular. Las células del cultivo inducido se rompieron por sonicación para separar la fracción soluble (FS) de la insoluble (FI). Las muestras en (A) y (B) se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie. Se corroboró la identidad de la proteína sobreexpresada mediante inmunodetección contra la etiqueta de histidinas (panel inferior). PM: Peso molecular.



His-SepL se purificó a partir de la fracción soluble de un lisado celular mediante cromatografía de afinidad por níquel. La masa molecular estimada para His-SepL es de 42.5 kDa (ProtParam). La proteína recombinante se observó a la altura esperada en SDS-PAGE (figura 11A) además, mediante inmunodetección utilizando anticuerpos específicos contra la etiqueta de histidinas (figura 11B) se confirmó la identidad de la proteína.



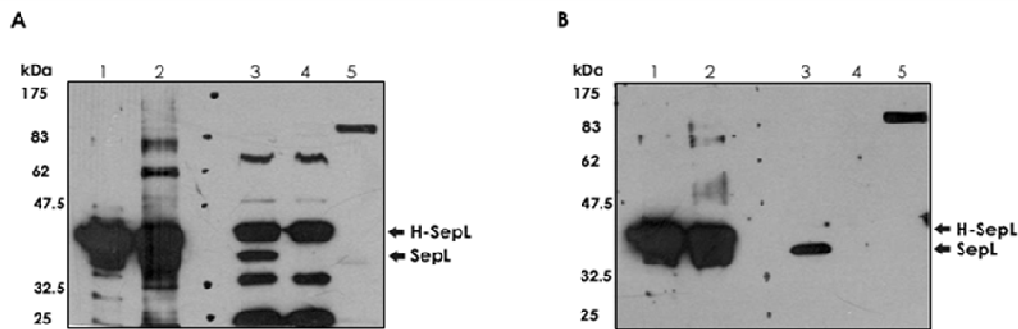
**Figura 11.** Purificación de His-SepL. (A) La proteína recombinante His-SepL se purificó mediante cromatografía de afinidad por níquel a partir de la fracción soluble de un lisado celular. La resina de níquel se lavó con concentraciones crecientes de imidazol (40 y 60 mM). Al final la proteína se eluyó con 400 mM de imidazol. (B) Inmunodetección de His-SepL utilizando anticuerpos contra la etiqueta de histidinas. PM: Peso molecular, Lis: fracción soluble de un lisado celular, FNU: Fracción no unida, L40: Lavado con 40 mM de Imidazol, L60: Lavado con 60 mM de Imidazol, E1, E2 y E3: Eluciones 1, 2 y 3.

### Anticuerpos policlonales anti SepL.

Se evaluó la reactividad de los anticuerpos policlonales obtenidos del suero de un conejo inmunizado con la proteína recombinante His-SepL. Éstos reconocieron a la proteína SepL sobreexpresada (figura 12A, carriles 1 y 2) y también en un fondo silvestre (figura 12A, carril 3), aunque fueron muy inespecíficos ya que reconocían muchas otras proteínas que no correspondían a la masa molecular esperada para SepL o His-SepL. Como control, se evaluó

también la reactividad de los anticuerpos policlonales del suero preinmune. Éstos no reconocieron a ninguna proteína en las pastillas celulares de un ensayo de secreción de EPEC, ni en el sobrenadante (datos no mostrados)

SepL no se detectó en sobrenadantes (figura 12A, carril 5) con los anticuerpos policlonales obtenidos; esto concuerda con los reportes de que SepL no se secreta (Kresse, Beltrametti et al. 2000; Deng, Puente et al. 2004; O'Connell, Creasey et al. 2004; Deng, Li et al. 2005; Younis, Bingle et al. 2010). Como control negativo se utilizó la pastilla celular de un cultivo de EPEC  $\Delta$ sepL (figura 12A, carril 4).



**Figura 12.** Anticuerpos policlonales anti- SepL. (A) Inmunodetección utilizando el suero generado en conejo contra la proteína SepL. (B) Inmunodetección contra SepL utilizando las inmunoglobulinas precipitadas e inmunoadsorbidas. Las muestras empleadas son las siguientes: His-SepL purificada (carril 1), fracción soluble de un lisado celular conteniendo a His-SepL sobreexpresada (carril 2), pastilla celular de un cultivo de EPEC WT (carril 3), pastilla celular de un cultivo de EPEC  $\Delta$ sepL (carril 4) y sobrenadante de un ensayo de secreción de EPEC WT (carril 5).

Debido a que los anticuerpos eran muy inespecíficos, las inmunoglobulinas se precipitaron con sulfato de amonio saturado (SAS) y se inmunoadsorbieron en una membrana de nitrocelulosa con lisado celular de EPEC  $\Delta$ sepL. Se realizó la inmunodetección contra SepL utilizando las inmunoglobulinas inmunoadsorbidas anti-SepL sobre las mismas muestras en las que se probó el suero (figura 12B). Se detectó a SepL en un fondo silvestre (figura 12B, carril 3) y a la proteína recombinante His-SepL sobreexpresada (figura 12B, carriles 1 y 2) además, con esta metodología se eliminó casi en su totalidad el reconocimiento de bandas inespecíficas. Sin embargo, en el sobrenadante de un ensayo de secreción (figura 12B, carril 5) se sigue detectando una proteína de más de 83 kDa, que por el tamaño, puede corresponder a EspC, un autotransportador que se secreta de manera independiente del SST3.

## **Fenotipo y complementación de EPEC $\Delta sepL$ .**

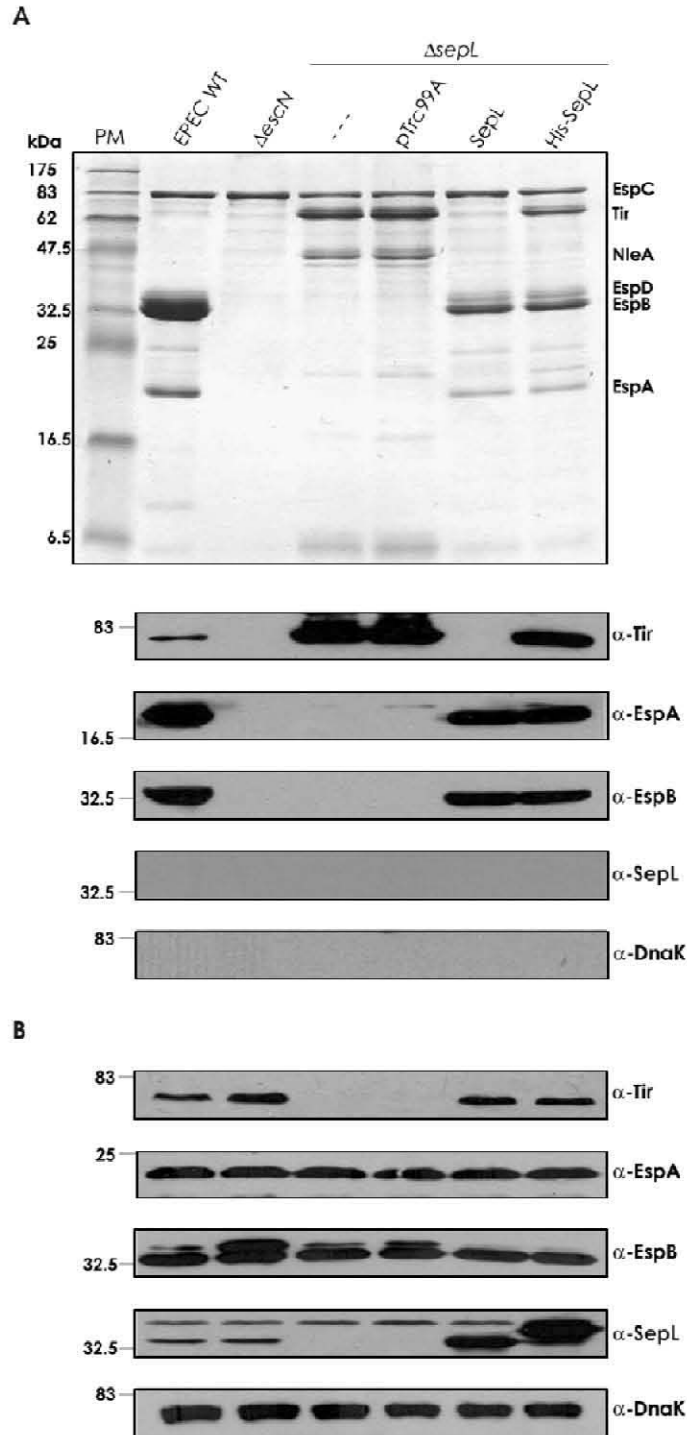
Se caracterizó el fenotipo de secreción de la cepa EPEC  $\Delta sepL$ . En la figura 13A se observa el perfil de secreción en medio DMEM de las cepas EPEC WT,  $\Delta escN$  y  $\Delta sepL$ . Comparando la cepa WT contra  $\Delta sepL$  se observa que esta última no secreta translocadores (EspA, EspB y EspD) e hipersecreta efectores (Tir y NleA). Lo anterior concuerda con lo reportado previamente (Deng, Puente et al. 2004; Deng, Li et al. 2005; Wang, Roe et al. 2008). Este mismo fenotipo se observó al analizar los sobrenadantes del ensayo de secreción mediante inmunodetección (figura 13A, panel inferior) empleando anticuerpos específicos contra translocadores ( -EspA y -EspB) y efectores ( -Tir). La cepa EPEC  $\Delta escN$  se utilizó como control negativo ya que no es capaz de secretar sustratos vía SST3 (Gauthier, Puente et al. 2003).

Adicionalmente, se realizó inmunodetección contra SepL en los sobrenadantes y ésta no se detectó en ningún caso; con esto se corroboró que SepL no es sustrato del SST3.

Al analizar las pastillas celulares se observó que en la mutante  $\Delta sepL$  no se afecta la producción de translocadores, sin embargo, Tir no se detectó usando anticuerpos específicos contra esta proteína. Lo anterior puede deberse a que en esta mutante Tir se hipersecreta y por lo tanto la poza intracelular de esta proteína se agota (ver discusión). Adicionalmente, se analizó la producción de SepL con anticuerpos específicos contra esta proteína en las pastillas celulares y se pudo detectar tanto en un fondo WT como con las versiones sobreexpresadas. Sin embargo, a pesar de que los anticuerpos se inmuoadsorbieron, se detectó una banda inespecífica en todas las muestras, probablemente porque al inmuoadsober se saturó la membrana y los anticuerpos no se limpiaron completamente.

La mutante nula en *sepL* se complementó con el gen *sepL* clonado en el vector pTrc99A con y sin etiqueta de histidinas (pMTpL y pMTHpL). Con ambas versiones se restauró parcialmente la secreción de translocadores (figura 13A). Sin embargo, al introducir a SepL en este fondo genético, se reduce la

secreción de Tir a niveles incluso menores que la cepa silvestre; en contraste, His-SepL no restaura la hipersecreción de Tir. Como control se introdujo el vector pTrc99A vacío en la cepa  $\Delta sepL$  (figura 13A).

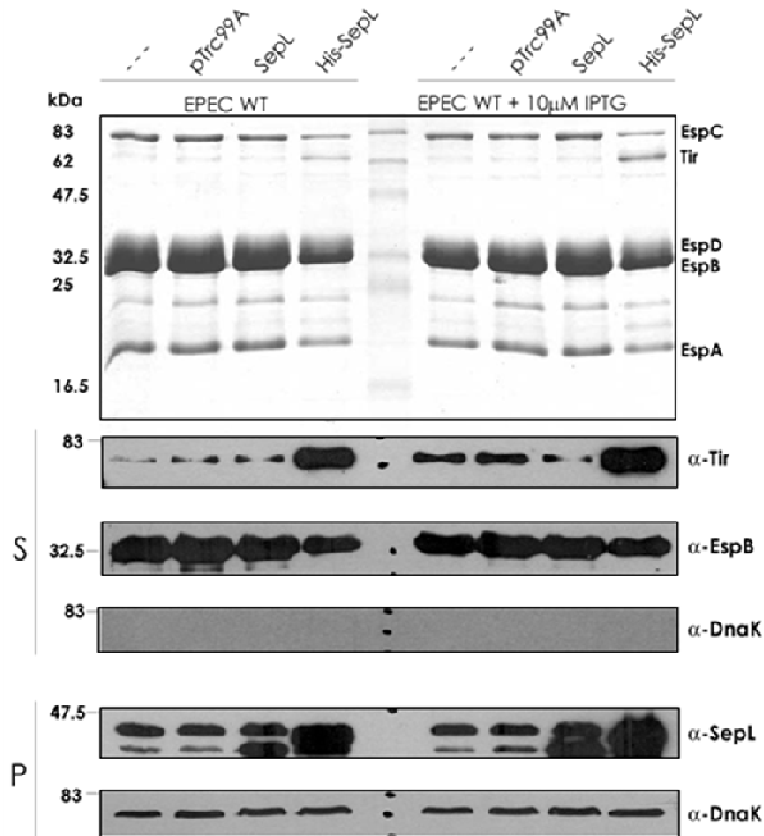


**Figura 13.** Fenotipo y complementación de EPEC  $\Delta sepL$ . (A) Panel superior: SDS PAGE del perfil de secreción (sobrenadantes) de las cepas EPEC WT,  $\Delta escN$ ,  $\Delta sepL$  y  $\Delta sepL$  complementada con el vector vacío (pTrc99A), SepL y His-SepL. Panel inferior: inmunodetección de Tir, EspA, EspB, SepL y DnaK en sobrenadantes usando anticuerpos específicos contra estas proteínas. (B) Inmunoreconocimiento de las proteínas Tir, EspA, EspB, SepL y DnaK en pastillas celulares.

### Efecto multicopia de SepL y His-SepL.

Debido a que His-SepL no fue capaz de complementar la secreción de Tir en una mutante  $\Delta sepL$ , se determinó el efecto de la sobreexpresión de His-SepL sobre un fondo silvestre (figura 14). La sobreexpresión de SepL en EPEC WT no tiene efecto en el perfil de secreción o la producción de proteínas aun agregándole IPTG, en cambio, la sobreexpresión de His-SepL resultó en un aumento en la secreción de Tir en ausencia y presencia de 10  $\mu$ M de IPTG.

Se analizó la producción de SepL en las pastillas celulares, a pesar de que se detecta nuevamente la banda inespecífica, se puede observar que los niveles de SepL inducida con 10  $\mu$ M de IPTG son comparables con los niveles de His-SepL sin IPTG, por lo que descartamos que el efecto multicopia se deba a un aumento en la estabilidad de la proteína.



**Figura 14.** Efecto multicopia de SepL y His-SepL. Perfil de secreción de la cepa EPEC WT sola y transformada con pTrc99A, SepL y His-SepL en presencia y ausencia de IPTG. También se muestra la inmunodetección con anticuerpos específicos contra Tir, EspB y DnaK en sobrenadantes (S) y SepL y DnaK en pastillas celulares (P).

## PARTE II. Regulación de la jerarquía de secreción.

SepL pertenece a la familia de proteínas YopN/TyeA (*Yersinia*) (Pallen, Beatson et al. 2005; Pallen, Beatson et al. 2005); otros miembros de esta familia incluyen a MxiC (*Shigella*), InvE (SPI-1 de *Salmonella*) y SsaL (SPI-2 de *Salmonella*). Todas estas proteínas están involucradas en la regulación del cambio en la secreción de translocadores a efectores. Entre éstas, SsaL es la que presenta el mayor porcentaje de similitud con SepL (28 %) (figura 15).

```

SsaL      MVKIKEVAMNIKINEIKMTPPTAFTPGQVIEEQ--EVISPSMLALQELQETTGAALYETM
SepL      MANGIEFNQNPASVFNNSLDFELESQQLTQKNSNTSSPLINLQNELAMITSSSLSETI
consensus M---E--N-----t-----Qv---qss---SP-m---qEL---T---L-ETm

SsaL      EEIGMALS-GKLESYKFTDAEKLERRQALLRLIKIQEDNGATLRPLTEENSDF----
SepL      EGLSLGYRKGSARKEEGTTIEKLLNEMQELTLTSDSKIKELSLKNSGLLEQHDPTLAM
consensus E-i-ma--kG--R-----T--EKL---Q-LL-L-----En-DPtlam

SsaL      --DLQNAYQIIALAMALTAGGLSKKKKRDLQLQDRTLTAEEGWELAVFSLLELGEVDTAT
SepL      FGNMPKGEIIVALISSLLQSKFVKIELKKYAKLLDLDLGEDDWELALLSWLGVGELNQEG
consensus fg-l--a--i--l---L-----l---Kr-----L--L-aEe-WELAV-S-L-lGEv----

SsaL      LSSLKRPMQQAIDNDE--MPLSQWFRRVADWPDRCERVRIILLRAIAFELSICIEPSEQS
SepL      IQKIKKLYEKARDEDSENGASLLDFWMEIKDLPEREKHLKVIIRALSFDLSYMSFPEDKV
consensus l--lKr---A-D-D-eng--L--WF--v-D-PdR---vrillRAi-FeLS-----e--

SsaL      RLAAALVRLRRLLLFLGLEKECQREEWICQLPPNTLLPLLLDIICERWLFSDWLLDRLTA
SepL      RTSSIIISDLCRIIIIFLSLNNTDIIAISIKKDKDVIILNEMLSIIIEHVWLTEDWLLSPSR
consensus R----l--L-RlllFL-L-----lL--lL-II--WL--DWLLd--t-

SsaL      IVSSSKMFnRLLQQLDAQFMlIPDNCfNDEDQREQIETLREVkvNqVLF-
SepL      VSIVEDKHVYYPHLLKEFFASLPDACEFIDNEQRsNTLLMIgKVIdYKEDVM
consensus i-----L--F--iPD-CF-D-dQR-q-L--l--V-----m

```

**Figura 15.** Alineamiento de la secuencia primaria de SsaL de *S. enterica* (Número de acceso en GenBank: AAX65339.1) y SepL de EPEC (Número de acceso en GenBank: AAC38393.1) realizado con ClustalW. Los residuos marcados en azul denotan identidad de secuencia y los amarillos sustituciones conservativas.

SsaL forma parte de un complejo que regula la secreción de proteínas de virulencia a través del SST3 de *Salmonella enterica* (*S. enterica*). Este complejo, formado por las proteínas SsaL, SpiC y SsaM, permite la secreción de translocadores y evita la de efectores a pH ácido (pH 5). Cuando el poro de translocación se inserta en la membrana vacuolar, se detecta un cambio en el pH de 5 a 7.2; el que promueve la disociación del complejo SsaL/SpiC/SsaM y con ello la translocación de efectores hacia el citoplasma del hospedero (Yu, McGourty et al. 2010).

Con base en estos antecedentes, se decidió hacer una búsqueda en la literatura y en las bases de datos para identificar a los ortólogos de SpiC y SsaM en el SST3 de EPEC.

## Orf12 es el ortólogo de SsaM.

Mediante búsquedas iteradas con PSI-BLAST en la base de datos UniProtKnowledgebase (UniProtKB), utilizando la secuencia de SsaM, se identificó a una proteína con 17 % de identidad y 41 % de similitud codificada por el marco de lectura abierto *orf12* del LEE de EPEC (Yu, Liu et al. 2004) (figura 16).

```
SsaM      MDWDLITERNIQLFYQLAGLAERPLATNMPWRQGYETTYLNYHNGRIHLCQILKQTFLDE
Orf12     M--NLLVKRNVVEFLRLLGNDFYLPDNRVEIDFNGFSFFPIEIIDNNVFWTFALEY---NE
consensus Mdw-Li--Rni--Fi-L-G-----m-----y--yl-----i-l---L--tfl-E

SsaM      DLLFKALTHWKFAAFQGIQRLPFLRDGLAMSCSPLLSSSAEIVLRLHHRQIKFLESQCV
Orf12     NAFFSFPFSALAPERTQGVIEHIFVYDNKLCVSC---LLTNIDVFFLMNTFQQHVQIIERV
consensus ---F--t---P---QGi---lFl---L-mSCsppL-s--eiw--l---Q-----V

SsaM      HG---
Orf12     RRMTS
consensus --mts
```

**Figura 16.** Alineamiento de la secuencia primaria de SsaM de *S. enterica* (Número de acceso en NCBI Reference Sequence: YP\_216421.1) y Orf12 de EPEC (Número de acceso en GenBank: AAC38381.1) realizado con ClustalW. Los residuos marcados en azul denotan identidad de secuencia y los amarillos sustituciones conservativas.

*orf12* es el primer marco de lectura abierto del operón LEE3 de EPEC, codifica para una proteína de 117 aa con una masa molecular predicha de 13.94 kDa y un pI de 4.74 (ExPASy tools: Translate y ProtParam). Previamente se había reportado que la delección de este gen resulta en la pérdida de secreción de efectores y translocadores, (Deng, Puente et al. 2004) por lo cual, se le clasificó como un componente esencial para secreción tipo III. Sin embargo, estudios recientes en el laboratorio (Miguel-Díaz, datos no publicados) demuestran que una mutante no polar del gen *orf12* presenta el mismo fenotipo que el de las mutantes  $\Delta sepL$  y  $\Delta sepD$ : no secreta translocadores e hipersecreta efectores (datos no mostrados). Cabe mencionar que éste es el mismo fenotipo que se observa en las mutantes nulas en *ssaL*, *spiC* y *ssaM*. Por lo anterior se llegó a la conclusión de que Orf12 de EPEC es el ortólogo de SsaM y que al igual que éste, participa en la regulación del cambio en la especificidad de secreción de sustratos intermedios a tardíos (Miguel-Díaz, no publicado).

## SepD es el ortólogo de SpiC.

Se realizó una búsqueda iterada con PSI-BLAST utilizando la secuencia de SpiC en la base de datos UniProtKnowledgebase. Después de la quinta iteración se

identificó a SepD como el posible ortólogo de SpiC con una identidad del 14 %. No se había reportado ningún homólogo para SepD, sin embargo, durante la realización de esta tesis se publicó un artículo en el que llegan a la misma conclusión (Younis, Bingle et al. 2010).

Se realizó un alineamiento con el programa ClustalW y como se observa en la figura 17, a pesar de la baja identidad entre SepD y SpiC se pueden identificar varios residuos conservados.

```

SepD      MNNNGIAKNCDCWLTALDFVKDVNGSPHTLTFYIYQKNAFLHDFGNYWVLYIELSGDPR
SpiC      M-SEEGFMLAVLKGIPLIQDIR-AEGNSRSWIMTIDGHPARGEIIFSEAFSISLPLN-DLE
consensus Mn---G-----l--l--vkd--G-----I---A---F---w-l-i-L-gD--

SepD      QIPTDTFIRLCNILAVSKEYKQMGIFLSNKKWYLCQIFHKDNNHRANMSKAIMQHTLASL
SpiC      SLPKPCLAYVTLLAAHPDVHDYAIQLTADGGWLNQYTTSSSSSELIAIEIEKHLALTCI
consensus -iP-----l--iLA--e---gI-Ls----yL---f-----L--l

SepD      LDKQFDKLEQSSSSDTMMPPTHLFSDIGRIV
SpiC      LKNVIRNHHKLYSGGV-----
consensus L-----S---mmppthlfsdigriv

```

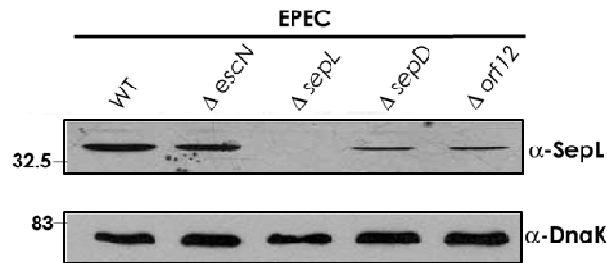
**Figura 17.** Alineamiento de la secuencia primaria de SpiC de *S. enterica* (Número de acceso en GenBank: AAC44300.1) y SepD de EPEC (Número de acceso en GenBank: AAC38378.1) realizado con ClustalW. Los residuos marcados en azul denotan identidad de secuencia y los amarillos sustituciones conservativas.

De acuerdo a los resultados obtenidos y con base en los antecedentes se formuló la hipótesis de que al igual que en *S. enterica*, SepL, SepD y Orf12 (ortólogos de SsaL, SpiC y SsaM, respectivamente) podrían formar un complejo proteico que regule la jerarquía en la secreción de translocadores y efectores a través del SST3 de EPEC.

Tomando en cuenta que, en *Salmonella*, cuando se disocia el complejo proteico SsaL/SpiC/SsaM, las proteínas se degradan, se evaluó la estabilidad de SepL en las mutantes EPEC  $\Delta sepD$  y  $\Delta orf12$ . Se realizaron ensayos de secreción de las cepas EPEC WT,  $\Delta escN$ ,  $\Delta sepL$ ,  $\Delta sepD$  y  $\Delta orf12$  y mediante inmunoreconocimiento se analizó la producción de SepL en las pastillas celulares. Se utilizó DnaK como control de carga (figura 18).

La producción de SepL disminuye en las mutantes EPEC  $\Delta sepD$  y  $\Delta orf12$ . Esto indica que se requiere tanto de SepD como de Orf12 para la estabilidad de SepL.

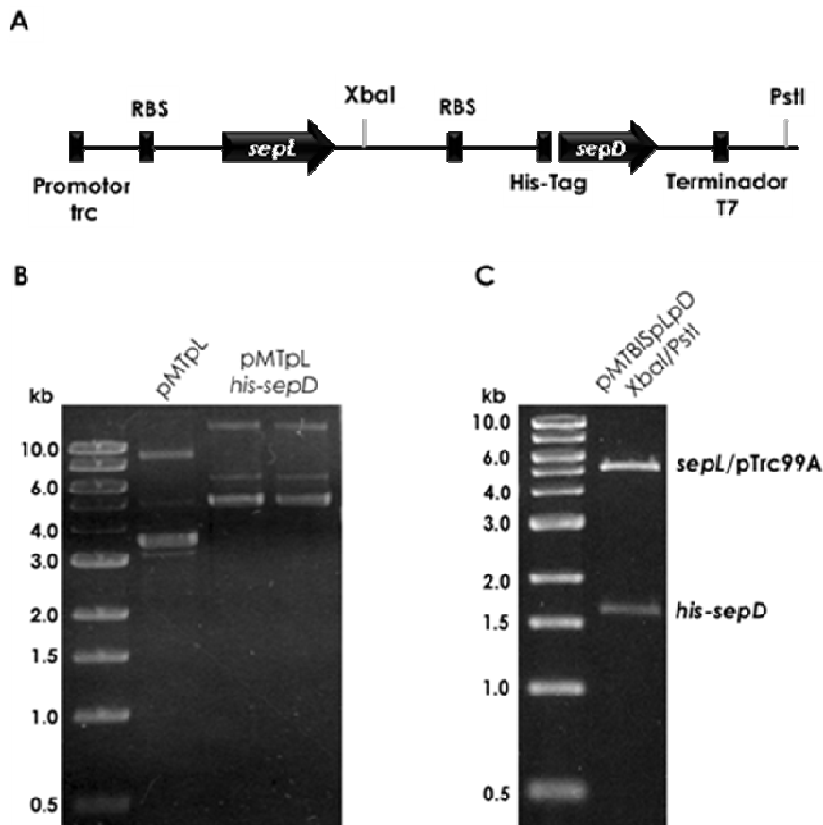




**Figura 18.** Estabilidad de SepL en distintos fondos genéticos. Inmunodetección de SepL y DnaK en las pastillas celulares de ensayos de secreción de las siguientes cepas de EPEC: WT,  $\Delta escN$ ,  $\Delta sepL$ ,  $\Delta sepD$  y  $\Delta orf12$ .

### Interacción de la proteína SepL con SepD.

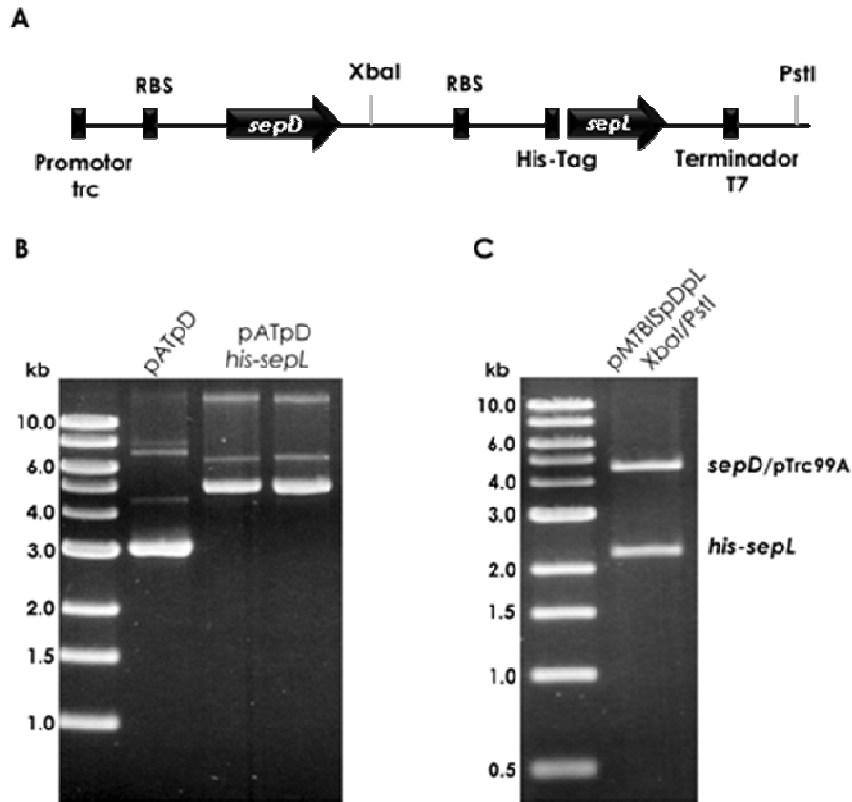
Para evaluar la interacción entre SepL y SepD se realizaron un par de construcciones bicistrónicas: pMTBISpLpD (figura 19) y pMTBISpDpL (figura 20). El vector pAEpD se digirió con las enzimas XbaI/PstI y se liberó un inserto de 1.6 kb que contiene al gen *sepD* con una etiqueta de 10 histidinas en el extremo 5', éste se clonó en el vector pMTpL (figura 9B) digerido con las enzimas XbaI/PstI que cortan río abajo del gen *sepL*.



**Figura 19.** Construcción bicistrónica pMTBISpLpD. (A) Esquema de la construcción bicistrónica pMTBISpLpD. (B) Electroforesis en geles de agarosa al 1 % del DNA plasmídico de la construcción

pMTpL y de dos colonias obtenidas de la ligación de *his-sepD* en pMTpL. (C) Análisis de restricción de pMTBISpLpD con las enzimas XbaI/PstI. Los tamaños de los fragmentos liberados son: *sepL*/pTrc99A 5.1 kb y *his-sepD* 1.6 kb.

La construcción pMTBISpDpL se realizó al clonar el inserto *his-sepL*, obtenido de una doble digestión con las enzimas XbaI/PstI del plásmido pMEpL, en el plásmido pATpD linearizado con las enzimas XbaI/PstI (figura 20).

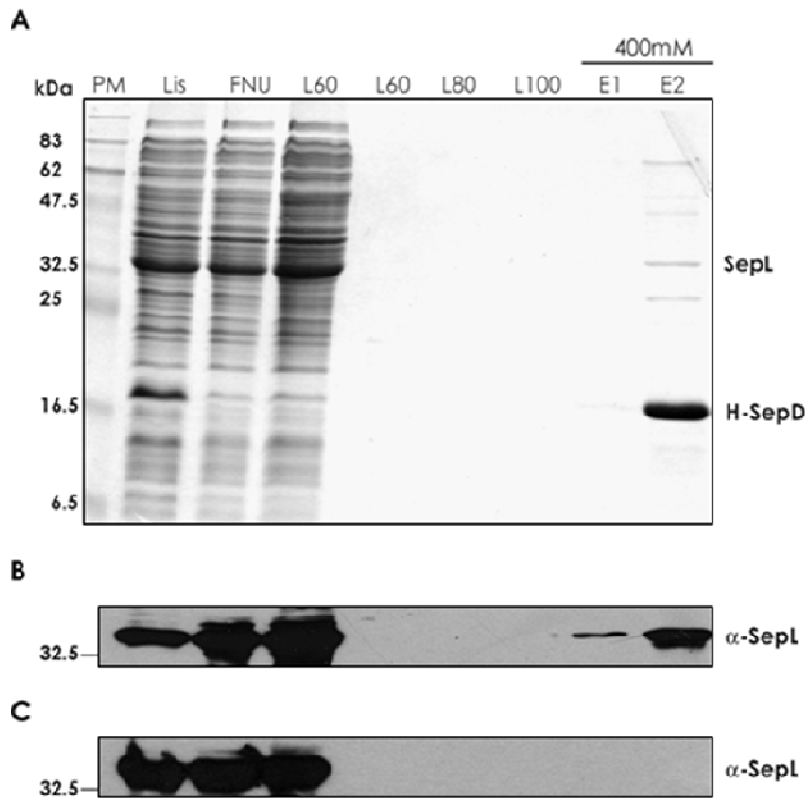


**Figura 20.** Construcción bicistónica pMTBISpDpL. (A) Esquema de la construcción pMTBISpDpL. (B) Electroforesis en geles de agarosa al 1 % del DNA plasmídico de la construcción pATpD y de dos colonias obtenidas de la ligación de *his-sepL* en pATpD. (C) Análisis de restricción de pMTBISpDpL con las enzimas XbaI/PstI. Los tamaños de los fragmentos liberados son: *sepD*/pTrc99A 4.6 kb y *his-sepL* 2.1 kb.

Las construcciones pMTBISpLpD y pMTBISpDpL se transformaron en *Salmonella* SJW1368, estas células se crecieron a 30°C y al alcanzar una densidad óptica entre 0.6 y 0.8 a 600 nm se indujo la producción de proteínas con IPTG. Se realizó fraccionamiento celular y a partir de la fracción soluble de los lisados celulares se realizó la copurificación de las proteínas expresadas mediante cromatografía de afinidad por níquel.

**Copurificación de la proteína SepL con His-SepD.** La fracción soluble del lisado celular conteniendo a las proteínas His-SepD y SepL se incubó con la resina de

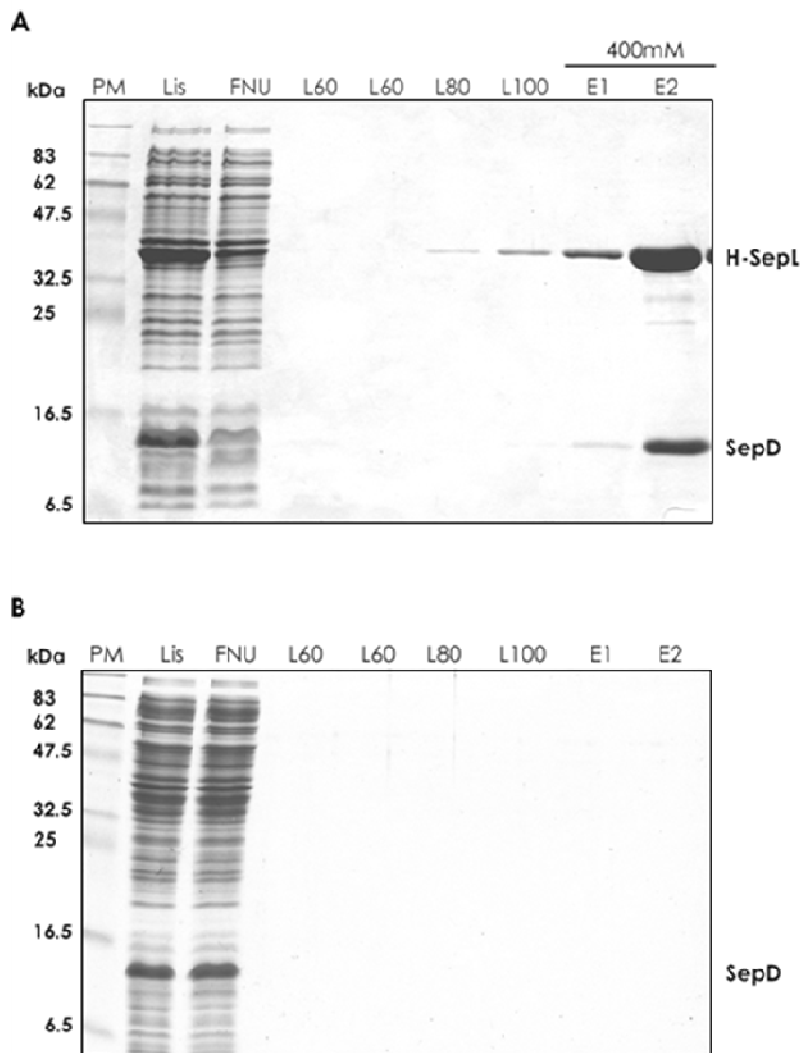
Ni-NTA, y se lavó con concentraciones crecientes de imidazol para eliminar el pegado inespecífico de proteínas. Al final se eluyó His-SepD y las muestras se analizaron por tinción con azul de Coomassie (figura 21A). Además de His-SepD se podían apreciar otras bandas, una de las cuales correspondía con la masa molecular predicha para SepL. Al realizar la inmunodetección de SepL en estas muestras (figura 21B) se corroboró que la banda observada a la altura de 32.5 kDa corresponde a SepL. Como control negativo se incubó un lisado conteniendo sólo a SepL con la resina Ni-NTA (figura 21C).



**Figura 21.** Interacción de SepL y SepD. (A) Copurificación de SepL con la proteína H-SepD. Se incubó la fracción soluble del lisado de células SJW1368/pMTBISpLpD con la resina Ni-NTA. Posteriormente se lavó con 60, 80 y 100 mM de imidazol. Finalmente, las proteínas se eluyeron con 400 mM de imidazol. Las muestras se separaron por SDS-PAGE (15 %) y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. (B) Inmunodetección de SepL en las mismas muestras que en (A). Como control negativo se incubó el lisado de las células SJW1368/pMTpL, que sobreexpresan a la proteína SepL, con la resina Ni-NTA. (C) Inmunodetección de SepL en las muestras del control negativo.

**Copurificación de la proteína SepD con His-SepL** Se incubó la fracción soluble de un lisado celular que contenía a las proteínas His-SepL y SepD con resina Ni-NTA y se lavó con concentraciones crecientes de imidazol. Se eluyó His-SepL y se observó mediante tinción con azul de Coomassie que SepD copurifica con His-SepL (figura 22A). Como control negativo se incubó un lisado conteniendo

sólo a SepD con la resina (figura 22B). En este caso no se pudo realizar la inmunodetección de SepD ya que no se cuenta con anticuerpos contra esta proteína. Sin embargo, al realizar una purificación de His-SepL (figura 11A), bajo las mismas condiciones que la copurificación de SepD con His-SepL, no se observa ninguna banda a la altura de 16.5 kDa por lo que descartamos que la banda observada a esta altura en la copurificación (figura 22A) sea algo inespecífico y creemos que puede corresponder a SepD (masa molecular predicha de 17.5 kDa).

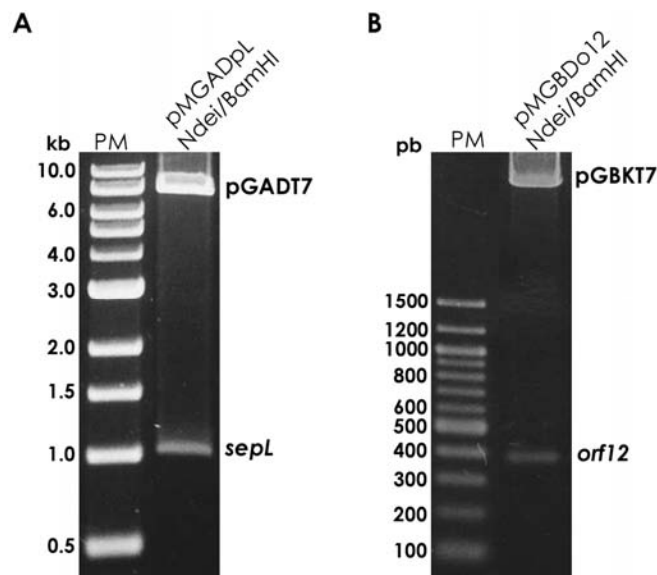


**Figura 22.** Interacción de SepL y SepD. (A) Copurificación de SepD con la proteína H-SepL. Se incubó la fracción soluble del lisado de células SJW1368/pMTBISpDpL con la resina Ni-NTA. Posteriormente se lavó con 60, 80 y 100 mM de imidazol. Finalmente se eluyeron las proteínas con 400 mM de imidazol. Las muestras se separaron por SDS-PAGE (15 %) y se visualizaron por tinción con Coomassie. (B) Como control se separó el lisado de las células SJW1368/pATpD que sobreexpresan a la proteína SepD con la resina Ni-NTA.

Los resultados anteriores indican, como se había reportado previamente (Creasey, Delahay et al. 2003; O'Connell, Creasey et al. 2004; Deng, Li et al. 2005; Wang, Roe et al. 2008), que SepL interactúa con SepD.

Como se había planteado al principio, recientemente se observó que SepL, SepD y Orf12 forman un complejo proteico al igual que sus ortólogos en *S. enterica* (Miguel-Díaz, no publicado y (Younis, Bingle et al. 2010)). Sin embargo, se desconoce si Orf12 interactúa con cada proteína de forma individual o sólo cuando se encuentran en complejo; por ello nos planteamos evaluar las interacciones individuales entre Orf12-SepD y Orf12-SepL mediante el sistema de doble híbrido en levadura.

Los genes *sepL* y *orf12* se subclonaron a partir de los plásmidos pMTpL y pNGADo12, respectivamente, en los vectores de doble híbrido pGADT7 y pGBKT7 (figura 23). A partir de éstos se expresan las proteínas SepL y Orf12 fusionadas en el extremo amino al dominio de activación (AD: *activation domain*) y de unión a DNA (DNA-BD: *binding domain*) del factor transcripcional GAL4.



**Figura 23.** Análisis de restricción de las construcciones pMGADpL y pMGBDo12. El gen *sepL* se clonó en el vector pGADT7 en los sitios NdeI/BamHI, al hacer una doble digestión con estas enzimas (A) se libera un fragmento de 1.05 kb correspondiente a *sepL* y otro de 8 kb que corresponde a pGADT7. *orf12* se clonó en el vector pGBKT7 en los sitios NdeI/BamHI. (B) Los fragmentos liberados al hacer un análisis de restricción con estas enzimas son: *orf12* de 0.35 kb y pGBKT7 de 7.3 kb.

## Interacción de la proteína SepD con Orf12.

Se cotransformó *S. cerevisiae* AH109 con los siguientes vectores:

<b>a.</b>	pGBKT7-53	pGADT7-T
<b>b.</b>	pGBKT7-Lam	pGADT7-T
<b>c.</b>	pMGBDo12	pGADT7
<b>d.</b>	pMGBDo12	pOGADpD
<b>e.</b>	pOGBDpD	pGADT7
<b>f.</b>	pOGBDpD	pNGADo12

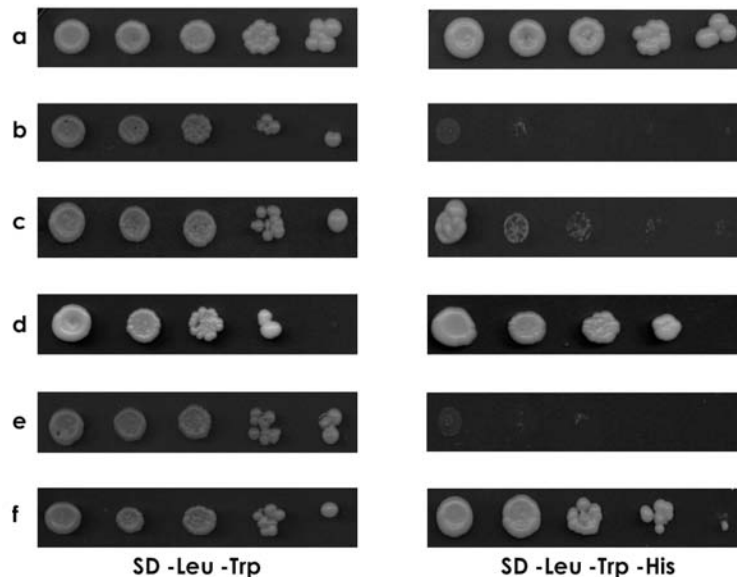
Las colonias cotransformantes se seleccionaron en placas de agar con medio mínimo SD sin leucina ni triptofano (SD –Leu –Trp). A partir de éstas se inocularon cultivos líquidos del mismo medio y se crecieron por 12 horas en agitación constante a 30°C. Se realizaron diluciones como se describe en materiales y métodos. El goteo de las diluciones se realizó en placas de agar SD –Leu –Trp como control de crecimiento (figura 24, panel izquierdo) y en SD –Leu –Trp –His (sin leucina, triptofano e histidina) para seleccionar las interacciones positivas (figura 24, panel derecho).

Como control positivo se cotransformaron los vectores pGBKT7-53 y pGADT7-T que codifican fusiones del DNA-BD y AD de GAL4 a la proteína murina p53 y el antígeno T-largo de SV40, respectivamente. Estas proteínas interactúan en un ensayo de doble híbrido en levadura (Iwabuchi, Li et al. 1993) y por lo tanto crecen en SD –Leu –Trp –His (figura 24a). El vector pGBKT7-Lam codifica para la proteína lamina C fusionada al DNA-BD y sirve como control negativo al ser cotransformado con pGADT7-T (figura 24b). Lamina C no forma complejos ni interactúa con otras proteínas (Bartel, Chien et al. 1993; Ye and Worman 1995).

Las células cotransformadas con los plásmidos pMGBDo12 y pGADT7, que codifican para la fusión DNA-BD-Orf12 y el dominio de activación (AD) sin ninguna fusión, respectivamente, presentaron un leve crecimiento en SD –Leu –Trp –His (figura 24c), esto indica que DNA-BD-Orf12 es capaz de interactuar con el AD solo, con lo cual se reconstituye el activador transcripcional GAL4 y se

induce la expresión del gen reportero *HIS3* o bien, que la fusión DNA-BD-Orf12 es capaz de activar por sí sola. Al cotransformar los plásmidos pMGBDo12 y pOGADpD (que expresa la fusión AD-SepD) también se observó crecimiento en el medio selectivo (figura 24d). A pesar de que DNA-BD-Orf12 activó por sí solo, el crecimiento observado para DNA-BD-Orf12 coexpresado con AD-SepD fue mayor.

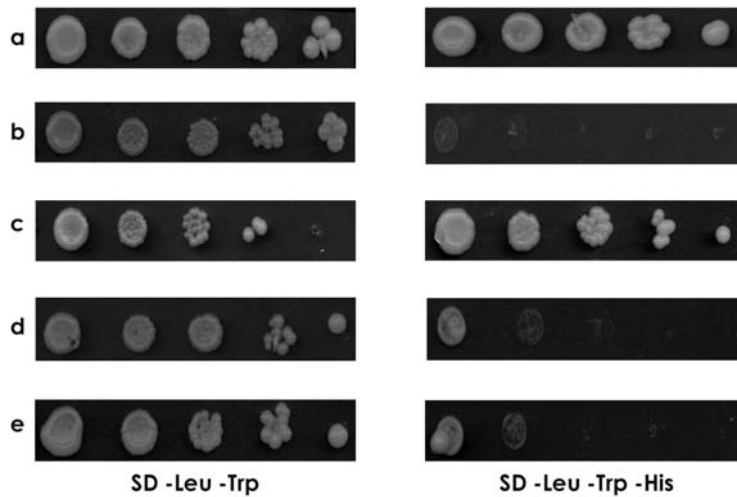
Para descartar la posibilidad de que la interacción entre Orf12 y SepD se debiera a la activación sola de DNA-BD-Orf12, se invirtieron las etiquetas a las proteínas (DNA-BD-SepD y AD-Orf12) y como se puede observar en la figura 24e, las células que coexpresan a las proteínas DNA-BD-SepD y AD no crecen en medio selectivo (SD -Leu -Trp -His), en cambio, al coexpresar a DNA-BD-SepD junto con AD-Orf12 sí hay crecimiento (figura 24f). Estos resultados indican por primera vez que Orf12 interactúa con SepD.



**Figura 24.** Ensayo de doble híbrido en levadura. Diluciones de cultivos de *S. cerevisiae* AH109 en placas de agar con medio SD -Leu -Trp (panel izquierdo) y SD -Leu -Trp -His (panel derecho). *S. cerevisiae* AH109 se cotransformó con (a) pGBKT7-53 y pGADT7-T, (b) pGBKT7-Lam y pGADT7-T, (c) pMGBDo12 y pGADT7, (d) pMGBDo12 y pOGADpD, (e) pOGBDpD y pGADT7 y (f) pOGBDpD y pNGADo12.

## Interacción de la proteína SepL con Orf12.

La fusión del dominio de unión de DNA del activador transcripcional GAL4 (DNA-BD) a la proteína SepL activa por sí sola la expresión de los genes reporteros (figura 25c) (Creasey, Delahay et al. 2003). Por ello, a pesar de que DNA-BD-Orf12 coexpresado con el dominio de activación solo, presenta un leve crecimiento en medio selectivo (figura 24c y 25d) se empleó esta proteína de fusión coexpresada con AD-SepL (codificada por el plásmido pMGADpL) para ver interacción entre Orf12 y SepL; sin embargo, los resultados indican que Orf12 no interactúa con SepL ya que el crecimiento observado (figura 25e) al coexpresar ambas proteínas fusionadas al dominio de unión a DNA y de activación, respectivamente, es el mismo al observado al coexpresar DNA-BD-Orf12 con el AD solo (figura 25d).



**Figura 25.** Ensayo de doble híbrido en levadura. Diluciones de cultivos de *S. cerevisiae* AH109 en placas de agar con medio SD -Leu -Trp (panel izquierdo) y SD -Leu -Trp -His (panel derecho). *S. cerevisiae* AH109 se cotransformó con (a) pGBKT7-53 y pGADT7-T, (b) pGBKT7-Lam y pGADT7-T, (c) pOGBDpL y pGADT7, (d) pMGBDo12 y pGADT7 y (e) pMGBo12 y pMGADpL.



### **PARTE III. Papel de la ATPasa EscN en la jerarquía de secreción.**

Se han descrito diversas interacciones para SepL y sus ortólogos con proteínas del SST3, como por ejemplo con: SepD, Tir y EscD en EPEC (Creasey, Delahay et al. 2003; O'Connell, Creasey et al. 2004; Deng, Li et al. 2005; Wang, Roe et al. 2008), complejos chaperona-translocador SipB/SicA y SipC/SicA en *Salmonella* (Kubori and Galan 2002) (que corresponden a EspD/CesD y EspB/CesD en EPEC), CdsQ (ortólogo de EscQ) en *Chlamydomphila* (Stone, Johnson et al. 2008) así como CdsN y Spa47, estas últimas corresponden a las ATPasas del SST3 de *Chlamydomphila* y *Shigella* respectivamente (Stone, Johnson et al. 2008; Botteaux, Sory et al. 2009).

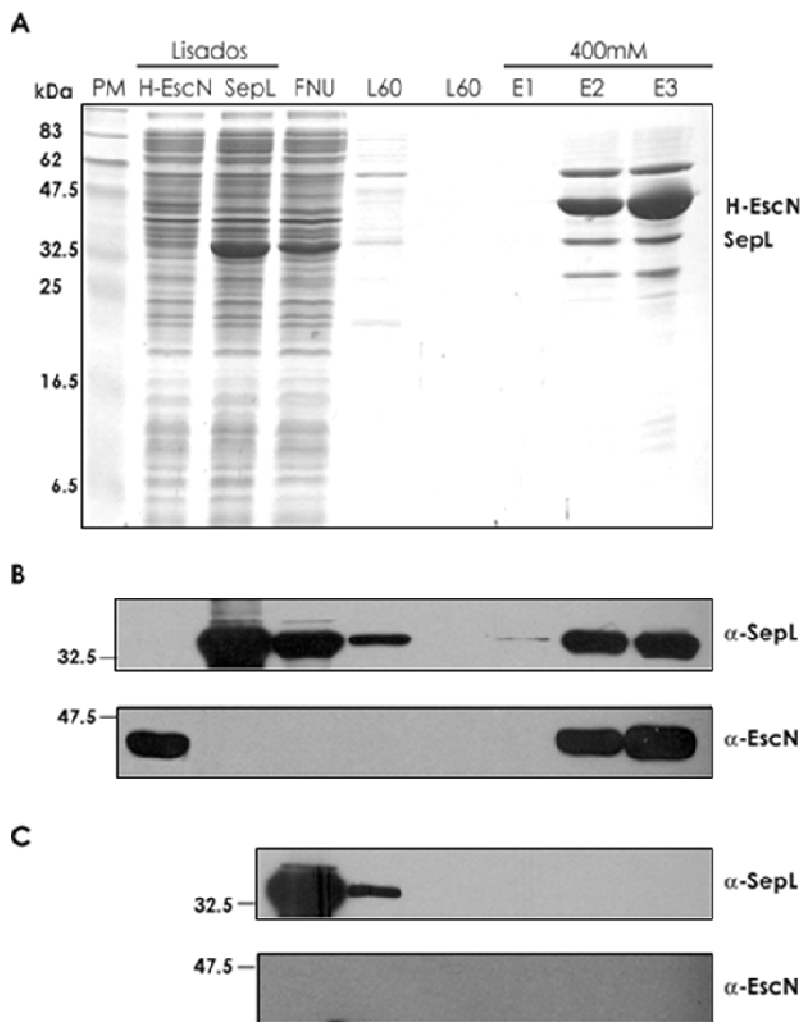
Las ATPasas son de los componentes más conservados entre los SST3. Se encargan de energizar la secreción de proteínas mediante la hidrólisis de ATP. Estas enzimas participan en el reconocimiento de los complejos chaperona-efector, posteriormente, de manera dependiente de la hidrólisis de ATP se encargan de disociar el complejo chaperona-efector y desplegar parcialmente al efector para que éste pueda ser internalizado en el canal de secreción del SST3 (Gauthier and Finlay 2003; Akeda and Galan 2004; Akeda and Galan 2005; Lorenz and Buttner 2009).

EscN es la ATPasa asociada al SST3 en EPEC (Pallen, Beatson et al. 2005; Andrade, Pardo et al. 2007). Sin embargo, no se ha reportado interacción entre EscN y SepL, por ello nos planteamos evaluar esta interacción mediante copurificación tipo *pull-down*.

#### **Interacción de la proteína SepL con EscN.**

Los plásmidos pATHeN y pMTpL, que codifican para His-EscN y SepL, respectivamente, se transformaron en *Salmonella* SJW1368. Se indujo la sobreproducción de proteínas con IPTG. Las células se lisaron mediante sonicación y la fracción soluble del lisado celular de His-EscN se mezcló con la de SepL. Esta mezcla se incubó por dos horas en agitación a 4°C y posteriormente se cargó en una columna con resina de níquel (Ni-NTA). Se lavó

con 60 mM de Imidazol, y al final, His-EscN se eluyó con 400 mM de Imidazol. Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. Como se puede observar en la figura 26A, además de His-EscN eluyen otras proteínas, una de las cuales corresponde con la masa molecular esperada para SepL. Para corroborar que en efecto SepL estuviera eluyendo junto con His-EscN, se realizó inmunodetección de esta proteína empleando anticuerpos anti-SepL (figura 26B) y se observó que ésta coeluye con His-EscN. Como control negativo se incubó la fracción soluble de un lisado celular conteniendo a SepL con la resina Ni-NTA y se trató de la misma manera que el *pull-down* (figura 26C).



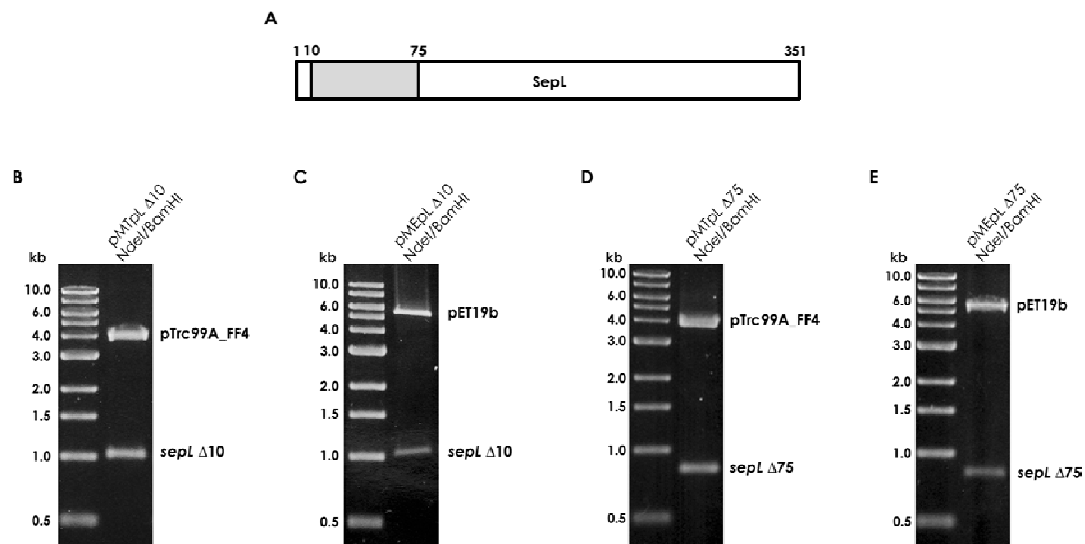
**Figura 26.** Interacción de SepL y EscN. (A) Copurificación de SepL con la proteína H-EscN. Se incubó por 2 horas en agitación a 4°C la fracción soluble de un lisado de células SJW1368/pATHeN con otro de SJW1368/pMTpL. Posteriormente se cargaron a una columna con resina Ni-NTA. Ésta se lavó con 60 mM de imidazol. Finalmente, las proteínas se eluyeron con 400 mM de imidazol. Las muestras se separaron por SDS-PAGE (15 %) y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. (B) Inmunodetección de SepL y EscN en las mismas muestras que en (A). Como control negativo se incubó la fracción soluble de un lisado de las células SJW1368/pMTpL,

que sobreexpresan a la proteína SepL, con la resina Ni-NTA. (C) Inmunodetección de SepL y EscN en las muestras del control negativo.

### Generación de versiones truncas de SepL.

Con el fin de analizar la región de SepL importante para la regulación de la secreción y la interacción con EscN se realizaron diversos recortes de esta proteína.

Se generaron dos versiones de SepL sin los primeros 10 y 75 aminoácidos. El gen *sepL* se amplificó con los oligonucleótidos *sepL10* y *sepLBamHIR*; y *sepLGlu76* y *sepLBamHIR*. Los productos de PCR se purificaron y digirieron con las enzimas NdeI/BamHI al igual que los vectores pTrc99A\_FF4 y pET19b en los cuales se clonaron. Se aisló DNA plasmídico de las colonias transformantes y se realizó análisis por restricción con las enzimas NdeI/BamHI de cada una de las construcciones (figura 27).



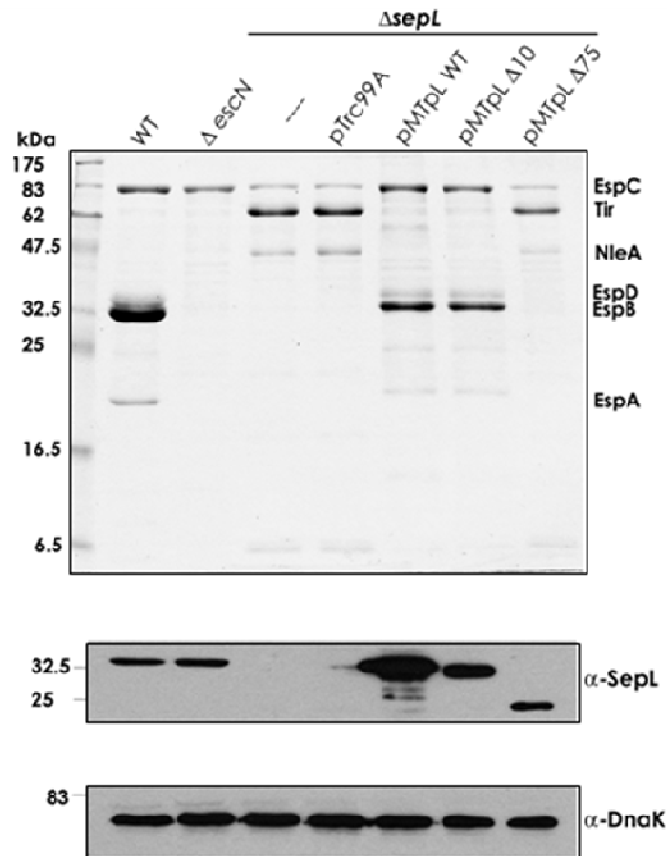
**Figura 27.** Generación de versiones truncas de SepL. (A) Esquema de SepL, indicando las deleciones de 10 y 75 aminoácidos. Electroforesis en gels de agarosa al 1 % del análisis de restricción de las siguientes construcciones: (B) pMTpL Δ10, (C) pMEpL Δ10, (D) pMTpL Δ75 y (E) pMEpL Δ75 con las enzimas NdeI/BamHI. Los tamaños de los fragmentos liberados son: *sepL*Δ10 1.02 kb, *sepL*Δ75 0.83 kb, pET19b 5.7 kb y pTrc99A\_FF4 4.1kb.

## **Funcionalidad de las versiones truncas de SepL.**

Para evaluar la funcionalidad de SepL  $\Delta 10$  y SepL  $\Delta 75$ , los vectores pMTpL  $\Delta 10$  y pMTpL  $\Delta 75$  se transformaron en la cepa EPEC  $\Delta sepL$  y se realizaron ensayos de secreción para ver si estas proteínas eran capaces de complementar la secreción de esta cepa a niveles silvestres.

Se analizó el perfil de secreción de las cepas EPEC WT,  $\Delta escN$ ,  $\Delta sepL$  y  $\Delta sepL$  complementada con el vector vacío pTrc99A, y las construcciones pMTpL WT, pMTpL  $\Delta 10$  y pMTpL  $\Delta 75$  (figura 28A). Como se había mencionado anteriormente la delección del gen  $\Delta escN$  abate totalmente la secreción; la cepa  $\Delta sepL$  hipersecreta efectores (Tir y NleA) y no secreta translocadores. Al complementar esta cepa con SepL WT sin ninguna etiqueta (pMTpL) se disminuye la secreción de efectores y se secretan translocadores (aunque no en los mismos niveles que la cepa silvestre). SepL  $\Delta 10$  tuvo el mismo efecto que SepL WT, es decir, restaura el fenotipo de una cepa  $\Delta sepL$ . Sin embargo, SepL  $\Delta 75$  no es capaz de completar esta cepa.

Se analizó la producción de SepL en las pastillas celulares de cada cepa para corroborar que las distintas versiones de esta proteína se produjeran a niveles similares. Como se puede observar en el panel inferior de la figura 28, SepL  $\Delta 75$  se produce a niveles similares a los de SepL en un fondo silvestre, por lo que el hecho de que SepL  $\Delta 75$  no sea funcional, no se debe a la estabilidad de la proteína. La proteína DnaK se empleó como control de carga (figura 28B).



**Figura 28.** Complementación de EPEC  $\Delta sepL$  con SepL WT  $\Delta 10$  y  $\Delta 75$ . (A) SDS PAGE del perfil de secreción (sobrenadantes) de las cepas EPEC WT,  $\Delta escN$ ,  $\Delta sepL$  y  $\Delta sepL$  complementada con el vector vacío (pTrc99A), SepL WT (pMTpL), SepL  $\Delta 10$  (pMTpL  $\Delta 10$ ) y SepL  $\Delta 75$  (pMTpL  $\Delta 75$ ). (B) Inmunodetección de SepL y DnaK en pastillas celulares.

### Pérdida de funcionalidad de SepL $\Delta 75$ .

Recientemente se observó en *Shigella flexneri* que la región N-terminal de MxiC (ortólogo de SepL), específicamente los primeros 30 aminoácidos de la proteína, es la necesaria para la interacción con Spa47 (ortólogo de EscN). Al realizar un alineamiento entre SepL y MxiC se pueden observar varios aminoácidos conservados en esta región (figura 29). De acuerdo con esto, el defecto de SepL  $\Delta 75$  podría deberse a la pérdida de interacción con EscN. Actualmente, en el laboratorio continuamos evaluando esta interacción.

**Región de interacción con la ATPasa**

```

MxiC      -----MLDVKNTGVFSSAFIDKLNAMTNSDDGDETAADAELD SGLANSKYIDSSDEMASAL
SepL      MANGIEFNQNPASVFNSNSLD FELESQQLTQKNSNTSSPLINLQNELAMITSSSLSETI
consensus mangi-----VF-S--iD-----n-----t-----L-N---i-sS--m---l

MxiC      SSF-INRRDLEKLEKGTNSDSQERILDGEEDEINHKIPD-LKRTLKDNLPDQDFIDRLKR
SepL      EGLSLGYRKGSARKKEEGTTIEKLLNEMQELLTLTDSDKIKELSLKNSGELLEQHDPTLAM
consensus ---si--R----K-----s-EriL---d-i-----DkIK----N--L-----L--

MxiC      YFKDPSDQVLAER-ELLNEKDLTAEQVESLTKIINEIISGSEKSVNAGINSALQAKLFGN
SepL      FGNMPKGEIVALISSLLQSKFVKIELKKKYAKLLDLLG--EDDWELALLSWLGVGELN-
consensus y---P---vIAL-s-LLn-K-l--E-----Kii-eii-gsE-----gi-S-i-----n

MxiC      KMKLEPQLLRACYRGPINGNISTTDQYIEWLGNFG-FNHRHTIVNFVEQSLIVDMDSEKP
SepL      --QEGIQKIKKLYEKAKDEDSENGASLLDWFMEIKDLPEREKHLKVIIRALSPDL SYMSS
consensus km-----Q-lr--Y-----ieW-----d---R---v-v---L--Dm-----

MxiC      SCNAYEFGFVLSKLIATKMIKIRTSDFVIFMKKLESSSLKDGSLSAEQLLLTLLYIFQYPSE
SepL      FEDKYRTSSIISDLCRILIFLS--LNNYTDIIAISIKKDKDVILNEMLSIIEHVNLT---
consensus -----vIS-L--I-m--tsdv-----l---Sl-KD--l---lL--l--if--pse

MxiC      SEQILTSVIDVSRASHEDSVVYQTYLSSVNESPHDIFKSESEREIAINILRELVTSA YRK
SepL      EDWLLSPSRVSI VEDKHVYYPHLLKEFFASLPDACFIDNEQRSNTLLMIGKVID--YKE
consensus -e-iL-S---VS-----y-----P---F-----R---i-il--lv-saYK-

MxiC      ELSR
SepL      DVM-
consensus el-r

```

**Figura 29.** Alineamiento de la secuencia primaria de MxiC de *Shigella flexneri* (Número de acceso en GenBank: AAP79009.1) y SepL de EPEC (Número de acceso en GenBank: AAC38393.1) realizado con ClustalW. Se indican los residuos de MxiC necesarios para la interacción con la ATPasa (Spa47). El asterisco rojo marca la delección de los primeros 75 aa de SepL. Los residuos marcados en azul denotan identidad de secuencia y los amarillos sustituciones conservativas.

**Nota:** En el apéndice II, III y IV se describen resultados adicionales obtenidos durante la realización de esta tesis, algunos de los cuales no forman parte del proyecto de SepL.

## DISCUSIÓN

La jerarquía de secreción de sustratos a través de los SST3 es un proceso altamente regulado, pues de ello depende el ensamblaje eficiente de un SST3 funcional. Este proceso se regula a distintos niveles: transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional como cambios conformacionales, interacciones proteicas y secreción de algunos componentes del sistema (Aldridge and Hughes 2002; Brutinel and Yahr 2008). A nivel proteico se han descrito dos mecanismos a través de los cuales se regula la jerarquía de secreción de sustratos (Deane, Abrusci et al. 2010). Estos mecanismos se conocen como *switches* o interruptores moleculares.

El segundo interruptor molecular en los SST3 de virulencia evita la salida de efectores hasta que se ensambla el poro de translocación. De esta manera, se controla que los efectores sean transportados directamente hacia el citosol de la célula hospedera.

Se han identificado diversas proteínas que actúan como reguladores a este nivel: SepL (EPEC), MxiC (*Shigella*), InvE (*Salmonella* SPI-1), SsaL (*Salmonella* SPI-2) y YopN/TyeA (*Yersinia*). La delección de los genes que codifican para estas proteínas no tiene efecto en la formación de la aguja sin embargo, resulta en la hipersecreción de efectores.

### **La proteína SepL de EPEC.**

En EPEC, la proteína SepL promueve la secreción de translocadores mientras que evita la de efectores (Deng, Puente et al. 2004; Deng, Li et al. 2005; Wang, Roe et al. 2008), además, interactúa con diversos componentes del SST3; sin embargo, se desconoce el papel específico de esta proteína y la funcionalidad de sus interacciones en la regulación de la jerarquía de secreción de sustratos. Es por ello que aun no se ha definido un modelo que explique el funcionamiento de este interruptor molecular en el contexto de sus interacciones.

En el presente trabajo se generaron herramientas bioquímicas y moleculares para el estudio y caracterización de la proteína SepL y se evaluaron algunas interacciones entre esta proteína y otros componentes del SST3.

La versión recombinante His-SepL, que tiene fusionadas 10 histidinas en el extremo N-terminal, se purificó en condiciones nativas mediante cromatografía de afinidad por níquel (figura 11). Se obtuvo una proteína pura con un alto rendimiento (~1mg de proteína por 200 mL de cultivo) a partir de la cual se generaron anticuerpos policlonales contra SepL en conejo.

Los anticuerpos generados contra SepL fueron inespecíficos (figura 12A), reconocían varias proteínas en las muestras analizadas; sin embargo, de todas las bandas observadas, había una que no se detectaba en las pastillas celulares de EPEC  $\Delta sepL$  (figura 12A, carril 4) y que correspondía con la masa molecular estimada para SepL. Las inmunoglobulinas (Ig's) se precipitaron con sulfato de amonio saturado y posteriormente se inmovilizaron empleando el lisado celular de la cepa  $\Delta sepL$ . Con esta metodología se eliminó el reconocimiento inespecífico de otras proteínas y se pudo identificar una sola banda correspondiente a SepL (figura 12B).

La delección del gen *sepL* abate la secreción de translocadores, EspA/B/D, y aumenta la de efectores (figura 13A). Previamente se reportó que en esta mutante no se afecta la transcripción de *tir* o *espB* y que los niveles intracelulares de ambas proteínas se mantienen constantes (Deng, Li et al. 2005). Sin embargo, en este trabajo y de forma reproducible, en las pastillas celulares del ensayo de secreción de la cepa  $\Delta sepL$  (figura 13B) no se observa Tir. Lo anterior puede atribuirse a que Tir se hipersecreta por lo que la poza intracelular de dicha proteína disminuye. Esta aparente contradicción en los resultados puede deberse a diferencias en las metodologías empleadas y se puede explicar tomando en cuenta que los ensayos de secreción se realizaron a densidades ópticas (D.O.) de ~1, mientras que en la mayoría de los reportes los hacen a D.O. de 0.8; y, dado que a mayores densidades ópticas la cantidad de proteínas secretadas también es mayor, por lo tanto, la poza intracelular disminuye (Schlumberger, Muller et al. 2005). Usando el mismo



razonamiento, para el caso de los translocadores esperaríamos lo contrario, que al no ser secretados, la poza intracelular aumentara; sin embargo, esto no ocurre ni en la mutante EPEC  $\Delta$ escN (figura 13B), en la que se abate totalmente la secreción. Esto sugiere un posible control post-transcripcional ya sea a nivel de la regulación de la traducción o bien, un equilibrio entre síntesis y degradación de proteínas no secretadas.

### **Complementación de la mutante $\Delta$ sepL.**

La funcionalidad de distintas versiones de SepL se evaluó mediante ensayos de complementación de la secreción de proteínas en una cepa EPEC  $\Delta$ sepL.

**Complementación de la secreción de translocadores.** Tanto la proteína SepL como His-SepL restauraron parcialmente la secreción de translocadores en una cepa EPEC  $\Delta$ sepL (figura 13A). En EPEC y EHEC, el gen *sepL* se co-transcribe con los demás genes del operón LEE4, que incluye a los de los translocadores, (*espA*, *espD*, *espB*, *cesD2*, *escF*, *orf29* y *espF*) (Mellies, Elliott et al. 1999). Sin embargo, recientemente se reportó que en EHEC el mRNA de *sepL* sufre procesamiento post-transcripcional por la RNAsa E, que lo separa del mRNA de los demás genes del transcrito (Lodato and Kaper 2009). La RNAsa E corta RNAs precursores para dar lugar a productos maduros y funcionales. El procesamiento de estos mRNAs genera transcritos con diferente estabilidad, lo cual contribuye a la regulación de la expresión genética (Nilsson, Naureckiene et al. 1996). La complementación parcial de la secreción de translocadores se atribuye a que la delección de *sepL* provoca cambios en el transcrito del LEE4 lo cual podría afectar el procesamiento pos-transcripcional de éste. De hecho, en una mutante en *sepL* donde se altera menos la estructura del transcrito (cambiando el marco de lectura del gen), se puede complementar totalmente la secreción de translocadores (Wang, Roe et al. 2008).

El hecho de que tanto SepL como His-SepL restauren la secreción de translocadores en un fondo  $\Delta$ sepL indica que se requiere la presencia de esta proteína para promover la secreción de translocadores y que una etiqueta en la región N-terminal de SepL no interfiere con su función de promover la

secreción de estos sustratos. Además, previamente se demostró que la interacción entre SepL y Tir no es importante para la regulación de la secreción de translocadores, puesto que una versión de SepL que carece que los últimos 11 aminoácidos no interactúa con Tir, pero sí complementa la secreción de translocadores en una cepa  $\Delta$ sepL (Wang, Roe et al. 2008). Adicionalmente, en este trabajo demostramos que la interacción entre SepL y EscN tampoco es importante para promover la secreción de translocadores (ver más adelante).

A pesar de que no se conoce el mecanismo a través del cual SepL promueve la secreción de translocadores, se reportó que InvE, el ortólogo de SepL en *Salmonella*, interactúa con los complejos chaperona-translocador (Kubori and Galan 2002). Además, recientemente se propuso que el ortólogo de SepL en *Shigella*, MxiC, podría optimizar el direccionamiento de estos complejos hacia el aparato de secreción (Martinez-Argudo and Blocker 2010), por lo que creemos que SepL podría estar jugando el mismo papel.

**Complementación de la secreción de efectores.** En cuanto a la complementación de la hipersecreción de efectores en la cepa  $\Delta$ sepL por SepL silvestre, se observó que la secreción de los efectores Tir y NleA se reduce a niveles de la cepa silvestre. Sin embargo, al realizar un análisis más detallado empleando anticuerpos específicos contra Tir, se observó que los niveles de Tir secretados al medio son indetectables (figura 13A). En 2008 se demostró que SepL interactúa con Tir, y que esta interacción evita la secreción prematura de este efector (Wang, Roe et al. 2008), por lo que probablemente, al sobreexpresar a SepL ésta interactúa con Tir y lo retiene en el citoplasma bacteriano, evitando así su secreción.

His-SepL no fue capaz de reducir la secreción de Tir (figura 13A). Dado que esta versión de SepL sí complementó la secreción de translocadores, suponemos que las funciones de SepL (promover la secreción de translocadores y evitar la secreción prematura de efectores) se pueden separar; y que la región amino de SepL pudiera jugar un papel importante en la regulación de la secreción de Tir.

Una versión de SepL que carece de los últimos 11 aminoácidos (SepL<sub>340</sub>) complementa la secreción de translocadores de una cepa  $\Delta sepL$ , interactúa con SepD y se asocia a membrana. Sin embargo, no complementa la hipersecreción de efectores. Este defecto se atribuye a que esta versión de SepL no interactúa con Tir, por lo que se propuso que dicha interacción es importante para evitar la secreción temprana de Tir (Wang, Roe et al. 2008), la cual es indispensable para la secreción de los demás efectores (Thomas, Deng et al. 2007).

La proteína recombinante His-SepL tiene un comportamiento similar a SepL<sub>340</sub>: complementa la secreción de translocadores (figura 13) e interactúa con SepD (figura 22); sin embargo, ésta sólo hipersecreta Tir (a diferencia de SepL<sub>340</sub> que hipersecreta varios efectores). Es difícil imaginar que la etiqueta de histidinas de His-SepL fusionada al extremo amino sea un impedimento estérico que evite la interacción con Tir, ya que como se mencionó, ésta se da a través del C-terminal de SepL. De hecho, la interacción SepL-Tir se demostró mediante copurificación tipo *pull-down* con las proteínas GST-SepL (SepL fusionada en el extremo N-terminal a la proteína glutatión S-transferasa) y His-Tir (Wang, Roe et al. 2008). El hecho de que a pesar de no regular la secreción de Tir, His-SepL pudiera interactuar con esta proteína, nos lleva a pensar que la interacción SepL-Tir no es el único mecanismo responsable de evitar su secreción temprana.

Previamente se reportó que la secreción de Tir es necesaria para la secreción de otros efectores (Thomas, Deng et al. 2007); sin embargo, al complementar una mutante  $\Delta sepL$  con His-SepL observamos que el único efector que continúa hipersecretándose es Tir y no así otros efectores como NleA. Estos datos sugieren que la hipersecreción de Tir no es el mecanismo, o al menos no el único, que promueve la secreción de otros efectores como se ha propuesto. A pesar de que no existe interacción directa entre SepL y otros efectores como NleA (Wang, Roe et al. 2008), el mecanismo adicional que regule su secreción debe ser dependiente de SepL, puesto que en una mutante  $\Delta sepL$  se hipersecreta NleA pero tanto SepL como His-SepL restauran la secreción de este efector a niveles silvestres (figura 13A). En el estudio realizado por Thomas

*et. al.* en 2007, llegan a la conclusión de que la secreción de Tir es indispensable para la secreción de los demás efectores ya que al eliminar a Tir en una cepa  $\Delta sepD$ , que hipersecreta efectores, se abate la secreción de otros efectores, como NleA. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, en la mutante  $\Delta sepD$  se disminuye la estabilidad de SepL (figura 18), por lo que los resultados obtenidos en ese estudio podrían deberse más bien a la reducción de los niveles de esta proteína en ese fondo genético; además, tomando en cuenta que SepL se asocia a la membrana de manera dependiente de SepD (Wang, Roe et al. 2008), en la mutante  $\Delta sepD$  muy probablemente también se afecta la localización de esta proteína. Adicionalmente, tomando en cuenta que NleA es un efector que no está codificado dentro del LEE podríamos especular que SepL, al igual que su ortólogo SsaL en *Salmonella* (Coombes, Brown et al. 2004), regula de manera diferencial la secreción de efectores codificados en el LEE de los Nle's (Non-LEE encoded), sin embargo, es necesario evaluar la secreción de más efectores en este fondo genético.

#### **Efecto multicopia de SepL y His-SepL en EPEC.**

Por otro lado, también se evaluó el efecto de la sobreexpresión de *sepL* silvestre y *his-sepL* sobre un fondo silvestre (figura 14).

**Secreción de translocadores.** La secreción de translocadores no se afecta al sobreexpresar a *sepL* en un fondo silvestre, pero se ve ligeramente disminuida al sobreexpresar a *his-sepL*; sin embargo, también se ve reducida la proteína EspC, que se secreta de manera independiente del SST3 y se emplea como control de carga; por lo que la disminución en la secreción de translocadores se puede deber a diferencias en la cantidad de proteína cargada y no a un efecto de la sobreexpresión de *his-sepL*.

**Secreción de efectores.** Al igual que con los resultados de complementación, la sobreexpresión de His-SepL desreguló la secreción de Tir en la cepa silvestre y no así la de otros efectores como NleA. A pesar de que en este fondo genético está presente SepL silvestre, el hecho de que His-SepL haya desregulado la secreción de Tir probablemente se deba a que esta versión de

SepL es capaz de interactuar con proteínas como Tir y SepD (figura 22) y al ser sobreproducida interactúa con estas proteínas evitando así la formación de complejos proteicos funcionales con la proteína nativa.

### **Secreción de SepL: un efector aberrante.**

El reconocimiento de los sustratos que se secretan a través del SST3 requiere de una señal de secreción codificada en el extremo amino de la secuencia peptídica de las proteínas o el extremo 5' del mRNA (Sory and Cornelis 1994; Anderson and Schneewind 1997; Arnold, Jehl et al. 2010). Se ha reportado que la fusión de varias proteínas como la dihidrofolato reductasa, la  $\beta$ -galactosidasa y la glutatión S-transferasa a los sustratos, bloquean su secreción a través del sistema (Sorg, Miller et al. 2005; Riordan, Sorg et al. 2008). De todas las proteínas que pertenecen a la familia de YopN/TyeA (ej. SepL, SsaL, InvE, HrpJ y MxiC), sólo YopN y MxiC son sustratos del SST3, y su secreción es importante para su función (Cheng, Kay et al. 2001; Botteaux, Sory et al. 2009; Martinez-Argudo and Blocker 2010). En este trabajo se evaluó la secreción de SepL y como se había reportado previamente, SepL no se secreta (figura 12 y 13). Con esto descartamos que los efectos observados con His-SepL se deban a la falta de secreción de la proteína. Sin embargo, recientemente se reportó que SepL tiene una señal de secreción, ya que la fusión de los primeros 20, 50 y 70 aminoácidos de SepL a un reportero de  $\beta$ -lactamasa promueve su secreción en una cepa EPEC WT,  $\Delta sepD$  y  $\Delta sepL$ . Fusiones más grandes (170 aa de SepL) evitan la secreción del reportero, por lo que se llegó a la conclusión de que SepL se parece a un efector aberrante (Younis, Bingle et al. 2010). El hecho de que SepL sea un efector, sugiere que al igual que otros efectores, podría ser reconocido por la ATPasa EscN.

### **El papel de la ATPasa EscN en la jerarquía de secreción.**

EscN es la ATPasa del SST3 de EPEC (Pallen, Beatson et al. 2005; Andrade, Pardo et al. 2007). Además de energizar la secreción de proteínas mediante la hidrólisis de ATP, las ATPasas asociadas a los SST3 también se encargan de reconocer los complejos chaperona-efector. En EPEC, la chaperona CesT

interactúa con muchos efectores como Tir, Map, EspF, EspH, EspG, EspZ, NleA, NleG, NleH y NleH2 (Thomas, Deng et al. 2005; Thomas, Deng et al. 2007; Mills, Baruch et al. 2008). En 2005 se reportó que el complejo Tir-CesT interactúa con la ATPasa EscN, y se propuso que CesT juega un papel central en el reclutamiento de efectores hacia el SST3 vía EscN para su eficiente secreción (Thomas, Deng et al. 2005). Con base en estos antecedentes se puede suponer que la interacción de la ATPasa con los complejos chaperona-efector sea un punto de regulación para la secreción de esta clase de sustratos.

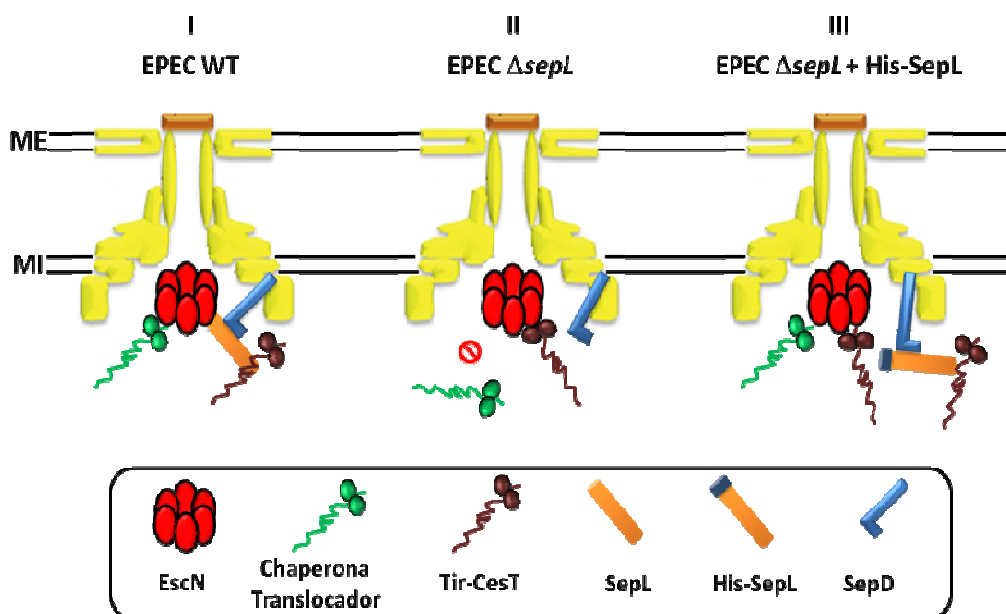
Mediante ensayos de copurificación tipo *pull-down* se determinó que SepL interactúa con EscN ya que His-EscN retiene de manera específica a SepL en la resina de Ni-NTA (figura 26). Hasta la fecha, sólo hay 2 reportes de interacción entre los ortólogos de estas proteínas en *Shigella* y *Chlamydomophila* (Stone, Johnson et al. 2008; Botteaux, Sory et al. 2009), sin embargo, no se sabe cuál es la funcionalidad de dicha interacción. Recientemente se propuso que el papel de MxiC (ortólogo de SepL) en la interacción con Spa47 (ortólogo de EscN) podría ser el de ocluir un sitio aceptor de efectores (Martinez-Argudo and Blocker 2010).

Adicionalmente, la interacción SepL-EscN se evaluó cambiando las etiquetas (His-SepL y EscN) pero no se observó la copurificación de estas proteínas (datos no mostrados). En el SST3 de *Shigella flexneri* se demostró que la región de interacción entre MxiC y Spa47 está dentro de los primeros 30 aminoácidos de MxiC (Botteaux, Sory et al. 2009). Al realizar un alineamiento de la secuencia primaria de SepL y MxiC (figura 29) se observó que en esa región hay varios aminoácidos conservados, aunque no existe una alta similitud. Sin embargo, no obstante la baja similitud que existe entre las proteínas pertenecientes a la familia de YopN/TyeA, su estructura tridimensional es semejante (Deane, Roversi et al. 2008). Tomando en cuenta que la región N-terminal de SepL es la que participa en la interacción con EscN podemos especular que las proteínas o péptidos fusionados a esta región de SepL son un impedimento estérico que bloquea la interacción con EscN, y probablemente por esta razón no se pudo observar interacción entre His-SepL y EscN mediante ensayos de *pull-down*.

El hecho de que His-SepL no interactúa con EscN y no regula la secreción de Tir, sugiere que además de las interacciones SepL-Tir y EscN-CesT/Tir, la interacción EscN-SepL también pudiera estar involucrada en la regulación de la secreción de efectores, o al menos de Tir. En cambio, la secreción de los translocadores no se regularía a través de la interacción entre SepL y EscN, puesto que His-SepL sí promueve la secreción de estos sustratos en un fondo  $\Delta sepL$ .

En 2004, se aisló una mutante puntual, L373P, en el C-terminal de InvC (la ATPasa del SST3 de *Salmonella*) que a pesar de tener la misma actividad hidrolítica que la ATPasa silvestre, no restauraba la secreción de una cepa  $\Delta invC$ . El defecto de esta mutación en InvC es que no interactúa con el complejo efector-chaperona SptP-SicP (Akeda and Galan 2005). Lo anterior sugiere que el extremo C-terminal de la ATPasa InvC, es responsable del reconocimiento de los complejos efector-chaperona.

En EscN no se sabe qué región es importante para el reconocimiento de los complejos efector-chaperona, pero se asume, dada la alta similitud entre las ATPasas, que este reconocimiento se da en la región C-terminal de la proteína (Zarivach, Vuckovic et al. 2007). Tampoco se ha mapeado el sitio de interacción de SepL en EscN sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo junto con el hecho de que SepL es considerado un efector aberrante, nos llevan a proponer que probablemente SepL y el complejo Tir/CesT compitan por el mismo sitio de unión en EscN. De esta manera se explicaría que His-SepL no complemente la hipersecreción de Tir en una mutante  $\Delta sepL$  ya que al no interactuar con EscN dejaría libre el sitio de reconocimiento del complejo Tir-CesT permitiendo que éste sea reconocido y se promueva la secreción de Tir (figura 30). Mientras que en un fondo silvestre, His-SepL interactúa con Tir y SepD, titulando a estas proteínas, evitando así la formación de complejos funcionales con la proteína SepL nativa y promoviendo la de complejos no funcionales que al no interactuar con la ATPasa dejan libre el sitio de reconocimiento del complejo Tir-CesT; esto explica que se promueva la secreción desregulada de Tir.



**Figura 30.** Esquema de la regulación de la secreción en EPEC WT,  $\Delta sepL$  y  $\Delta sepL$  complementada con His-SepL. I) En una cepa silvestre (EPEC WT) se secretan translocadores y niveles bajos de efectores. SepL regula positivamente la secreción de translocadores y evita la de efectores. SepL interactúa con SepD y Tir. La interacción SepL-Tir retiene a Tir en el citoplasma y evita que sea secretado. SepL también interactúa con la ATPasa EscN. Esta interacción se da en el sitio de reconocimiento del complejo Tir-CesT por lo que funciona como un mecanismo adicional para prevenir la secreción de este efector. II) En una cepa mutante  $\Delta sepL$ , Tir queda libre, de igual manera, el sitio de reconocimiento del complejo chaperona-efector queda expuesto, por lo que este efector se hipersecretará. Adicionalmente, la ausencia de SepL promueve la salida de otros efectores y evita la secreción de translocadores probablemente porque los complejos chaperona-translocador ya no son reconocidos por EscN. III) His-SepL no complementa la hipersecreción de Tir en una mutante  $\Delta sepL$  debido a que no interactúa con EscN y deja expuesto el sitio de reconocimiento del complejo Tir-CesT, por lo que Tir puede ser secretado, sin embargo, la interacción SepL-EscN no es importante para la secreción de translocadores, pero, la presencia de His-SepL es suficiente para promover la secreción de estos sustratos. MI: Membrana interna, ME: Membrana externa.

Se realizaron recortes de 10 y 75 aminoácidos del N-terminal de SepL y se evaluó su funcionalidad mediante ensayos de complementación de la secreción de proteínas (figura 28). A diferencia de SepL  $\Delta 10$  que complementó la secreción de proteínas de una cepa  $\Delta sepL$ , SepL  $\Delta 75$  no restauró la secreción. A pesar de que los niveles intracelulares de SepL  $\Delta 75$  son menores que los de SepL silvestre o SepL  $\Delta 10$ , éstos son similares a los de la proteína SepL nativa (pastillas celulares de EPEC WT) por lo que descartamos que la estabilidad de la proteína esté relacionada con la falta de funcionalidad.

El alineamiento entre MxiC y SepL (figura 29) muestra que dentro de la región eliminada en SepL  $\Delta 75$ , se encuentra la región de interacción entre MxiC y Spa47. Por lo anterior suponemos que el defecto de esta versión trunca de



SepL es la interacción con EscN. Sin embargo, es difícil reconciliar la idea de que His-SepL (que no interactúa con EscN) complementa la secreción de translocadores pero no la de Tir; mientras que SepL  $\Delta 75$ , que en teoría tampoco debería interactuar con EscN, no complementa la secreción de translocadores ni de efectores. Se han descrito varias interacciones entre los ortólogos de SepL y otros componentes del sistema, y poco se sabe acerca de las regiones de interacción y la funcionalidad de éstas, por lo que en realidad, la falta de funcionalidad de SepL  $\Delta 75$  se podría atribuir a una de las múltiples interacciones descritas. Podría ser, que además de no interactuar con EscN tampoco interactuara con los complejos chaperona-translocador (como se propuso para InvE, su ortólogo en *Salmonella*) (Kubori and Galan 2002) y que por eso no complemente ninguna de sus funciones. Sin embargo todas estas propuestas se tienen que evaluar experimentalmente.

#### **SepL y sus ortólogos en *Salmonella*: regulación de la jerarquía de secreción.**

Recientemente se describió el mecanismo mediante el cual se regula la secreción de translocadores y efectores a través del SST3 codificado en la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella enterica* (SPI-2: *Salmonella* pathogenicity island 2). Este SST3 se expresa a pH 5; las bacterias crecidas *in vitro* a este pH secretan translocadores y niveles muy bajos de efectores. La proteína SsaL, miembro de la familia de proteínas YopN/InvE/MxiC/SepL, forma un complejo proteico con las proteínas SpiC y SsaM. Este complejo permite la secreción de translocadores a pH 5, mientras que evita la de efectores. Un cambio en el pH (de 5 a 7.2) promueve la disociación y degradación del complejo SsaL/SpiC/SsaM, lo cual resulta en la secreción de efectores (Yu, McGourty et al. 2010).

Con el fin de evaluar la participación de otras proteínas del SST3 en la regulación de la secreción de efectores se realizaron búsquedas iteradas en las bases de datos para identificar a los ortólogos de SpiC y SsaM en EPEC. Mediante PSI-BLAST se identificó a Orf12 y SepD como ortólogos de SsaM y SpiC, respectivamente (figura 16 y 17). La proteína Orf12 está codificada por el primer marco de lectura abierto del operón LEE3 (*orf12*). La delección de este

gen causa un fenotipo igual al de las mutantes  $\Delta sepL$  y  $\Delta sepD$  (Miguel-Díaz, no publicado): no secreta translocadores e hipersecreta efectores, lo anterior indica que Orf12, al igual que SepL y SepD, está involucrado en la regulación de la secreción de sustratos a través del SST3 de EPEC.

En el laboratorio, recientemente se observó que SepL, SepD y Orf12 forman un complejo proteico al igual que sus ortólogos en *Salmonella* (Miguel-Díaz, no publicado). Además, parece que la formación del complejo es importante para la estabilidad de las proteínas, ya que en un fondo  $\Delta sepD$  y  $\Delta orf12$  se disminuyen los niveles intracelulares de SepL (figura 18). Esto sugiere que el mecanismo de regulación de la secreción de sustratos en EPEC podría ser similar al propuesto en *Salmonella*.

SsaM (Orf12 en EPEC) interactúa directamente con SpiC (SepD), y para que esta interacción ocurra, se requieren los últimos 18 aminoácidos de SsaM (Yu, Liu et al. 2004). Cuando se elimina esta región se evita la formación del complejo SsaM/SpiC/SsaL. Además, en ausencia de SpiC, SsaL (SepL) no copurifica con SsaM (Yu, McGourty et al. 2010). Estos resultados sugieren que: no existe interacción directa entre SsaL y SsaM y que SpiC funciona como puente entre estas 2 proteínas o que *in vivo* se requieren las 3 proteínas para la formación del complejo.

Las interacciones individuales entre los componentes del complejo SepL/SepD/Orf12 se evaluaron empleando distintas metodologías. Se observó la copurificación específica de SepL con SepD (figura 21 y 22) y mediante el sistema de doble híbrido en levadura observamos, por primera vez, que Orf12 interactúa con SepD (figura 24d y 24f), sin embargo, empleando esta metodología no pudimos observar interacción entre Orf12 y SepL (figura 25e).

Previamente se reportó la interacción entre SepL y SepD mediante el sistema de doble híbrido en levadura (Creasey, Delahay et al. 2003); sin embargo, en este trabajo, a pesar de observar la interacción de estas proteínas mediante copurificación, ésta no se pudo identificar empleando el sistema de doble híbrido. Dado que, a pesar de estar reportado, con esta metodología no se

identificó ninguna interacción entre SepL y otras proteínas del SST3 (SepD, EscN y Orf12) no podemos concluir que Orf12 no interactúa con SepL y por lo tanto estos resultados no nos permiten definir si se requieren las tres proteínas para la formación del complejo o si SepD funciona como puente entre SepL y Orf12.

Se han descrito diversas interacciones entre SepL y varios componentes del SST3 (SepD, Tir, EscD, EscN y Orf12). La estructura cristalográfica de MxiC sugiere que estas proteínas tienen una forma elongada, por lo que gran parte de su superficie queda expuesta a interacciones con otra proteínas. Sin embargo, es probable que no todas las interacciones descritas ocurran al mismo tiempo, y que la interacción dinámica entre todas estas proteínas sea el mecanismo a través del cual se regule temporalmente la jerarquía de secreción de sustratos por SepL.

### **Modelo de regulación de la jerarquía de secreción en EPEC.**

Con base en los resultados obtenidos, el modelo propuesto para la regulación de la secreción en *Shigella* (Martinez-Argudo and Blocker 2010) se modificó y adaptó a EPEC (figura 31).

Existen tres posibles estados de secreción:

**Secreción apagada:** Mientras se ensambla la aguja el complejo SepL/SepD/Orf12 bloquea la secreción de efectores. SepL interactúa con Tir y EscN, de esta manera Tir es secuestrado en el citoplasma y además, el sitio de reconocimiento de los complejos chaperona-efector es obstruido.

Los translocadores son las proteínas requeridas para la formación del poro de translocación en la célula hospedera. En EPEC corresponden a las proteínas EspA, EspB y EspD; sus ortólogos en *Shigella* son IpaD, IpaC e IpaB, respectivamente. En *Shigella* no se ensambla un filamento largo como en EPEC, en su lugar, la proteína IpaD forma una pequeña estructura en la punta de la aguja denominada "tip". Recientemente se propuso que el tip está conformado por 4 subunidades de la proteína IpaD y una de IpaB (Johnson,

Roversi et al. 2007) y que durante este estado de secreción (apagada) adopta una conformación cerrada que mantiene al SST3 inactivo (Veenendaal, Hodgkinson et al. 2007).

En EPEC no sabe hasta qué punto se ensambla el SST3 en esta fase debido a que el medio en el que se crece (DMEM) mimetiza la primera señal de secreción (contacto celular), y los complejos que se purifican ya se encuentran en la segunda fase de secreción (de translocadores).

Sin embargo, quizá las proteínas EscU y Orf16, que conforman el primer interruptor molecular y que al igual que SepL también promueven la secreción de translocadores, participen durante este estado de secreción promoviendo una secreción "basal" de translocadores. De esta manera, el ensamblaje del SST3 de EPEC en este estado de secreción sería similar al de *Shigella*.

**Secreción de translocadores:** La primera señal, probablemente el contacto celular (Veenendaal, Hodgkinson et al. 2007), promueve el ensamblaje de un poro de translocación funcional. SepL regula de manera positiva este mecanismo, probablemente optimizando el direccionamiento de los translocadores al aparato de secreción.

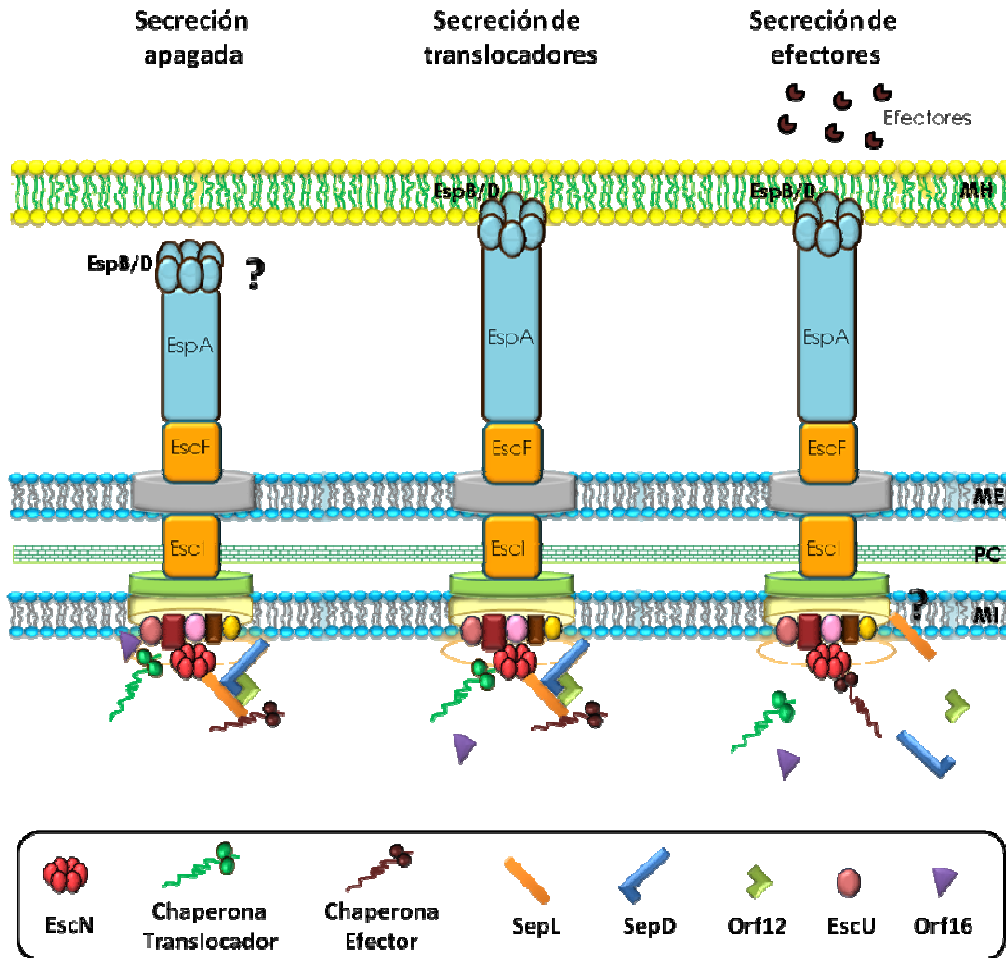
En *Shigella*, una vez que se da el contacto celular, IpaB se ensambla en la membrana del enterocito, esto provoca un cambio conformacional que abre el heteropentámero y recluta a IpaC para que se forme un poro de translocación funcional en la membrana del enterocito (Veenendaal, Hodgkinson et al. 2007).

**Secreción de efectores:** Una segunda señal, probablemente transmitida a través del filamento y la aguja (Martinez-Argudo and Blocker 2010), promueve la disociación y degradación del complejo SepL/SepD/Orf12, con esto, Tir y el sitio de reconocimiento de los complejos chaperona-efector en EscN quedan libres y se promueve la secreción de efectores. Al degradarse SepL, la secreción de translocadores ya no se regula positivamente. Como SepL no se degrada completamente, otro mecanismo debe estar funcionando para

evitar su papel como promotor de la salida de translocadores y represor de la salida de efectores; éste último podría regularse a través de la interacción entre SepL-EscD ya que la región de interacción es la misma que para SepL-Tir (los últimos 11 aa de SepL).

Cuando se ensambla el poro de translocación del SST3 de *Shigella* en la membrana del hospedero, se detecta una segunda señal que promueve la secreción de MxiC (ortólogo de SepL) y con ello la secreción de efectores (Martinez-Argudo and Blocker 2010).

Es de notarse que al final, en ambos sistemas, tanto SepL como MxiC deben dejar de cumplir sus función (promover la secreción de translocadores y evitar la de efectores) en determinado momento. Sin embargo, cada organismo ha desarrollado mecanismos diferentes, mientras que en EPEC y *Salmonella* SepL y SsaL se degradan (Yu, McGourty et al. 2010), en *Shigella* y *Yersinia* MxiC y YopN se secretan (Cheng, Kay et al. 2001; Deane, Roversi et al. 2008; Botteaux, Sory et al. 2009).



**Figura 31.** Modelo de regulación de la secreción de translocadores y efectores a través del SST3 de EPEC. Existen tres estados de secreción: *Secreción apagada*, una vez que se ensambla la aguja se secretan niveles basales de translocadores pero no se forma un poro de secreción funcional. Esta secreción "basal" es promovida por las proteínas EscU y Orf16 del interruptor molecular 1. Se bloquea la secreción de efectores a través de la interacción de SepL con Tir y EscN; *Secreción de translocadores*, el contacto con la célula hospedera es la señal que promueve la secreción de translocadores y el ensamblaje de un poro de translocación funcional, SepL participa regulando positivamente este mecanismo, probablemente optimizando el direccionamiento de estos sustratos hacia la base del sistema; *Secreción de efectores*, una segunda señal, promueve la disociación del complejo SepL/SepD/Orf12 y con ello la degradación de estas proteínas. Tir y el sitio de reconocimiento de los complejos chaperona-efector en EscN quedan libres y con ello se promueve la secreción de efectores. Probablemente cuando se deshace el complejo SepL/SepD/Orf12, el remanente que queda de SepL interactúe con EscD (proteína que forma el anillo citoplásmico de la membrana interna). MI: membrana interna. PC: pared celular. ME: membrana externa. MH: membrana del hospedero.

La naturaleza de las señales que activan la secreción a través del SST3 es aun desconocida, sin embargo, se piensa que la primera señal, que activa la secreción de translocadores, indica el contacto de la bacteria con la membrana del hospedero, y la segunda, que promueve la secreción de efectores, indica el ensamblaje de un poro de translocación funcional en la

membrana del mismo. Recientemente se demostró que cuando se detecta el pH citosólico por *Samonella*, se promueve la degradación del complejo SsaL/SpiC/SsaM y con ello la secreción de efectores (Yu, McGourty et al. 2010). En EPEC se ha visto que la eliminación del calcio del medio promueve la secreción de efectores y reduce la de translocadores (Deng, Li et al. 2005). Esto concuerda con las condiciones fisiológicas con las que se encuentra EPEC al colonizar el tracto gastrointestinal, ya que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen extracelular es de  $\sim 2.5$  mM, mientras que la concentración citosólica (dentro de los enterocitos) es muchas menor, de 100-300 nM.

Por último, para entender aun más la manera en que SepL regula la secreción a través del SST3, se deben evaluar las interacciones con los componentes del SST3 en diferentes estados de secreción para determinar la dinámica temporal de dichas interacciones.

## CONCLUSIONES

La proteína SepL de EPEC promueve la secreción de translocadores y evita la de efectores; y esta regulación en la especificidad de secreción de sustratos se da a través de interacciones dinámicas entre SepL y otros componentes del SST3.

SepL interactúa con EscN. Una versión de SepL con 10 histidinas fusionadas en el extremo N-terminal no disminuye la secreción de Tir a niveles silvestres en un fondo  $\Delta sepL$ , además, no interactúa con EscN. Por lo anterior, concluimos que esta interacción es importante para la regulación de la secreción de efectores y proponemos que el sitio de interacción de SepL en EscN posiblemente sea el mismo en el cual se reconocen los complejos chaperona-efector.

La versión de SepL que carece de los primeros 75 aminoácidos no es capaz de promover la secreción de translocadores, por ello, sugerimos que la región N-terminal de SepL pudiera estar involucrada en la regulación positiva de la secreción de estos sustratos y que esta regulación podría darse a través del reconocimiento de los complejos chaperona-translocador.

La estabilidad de SepL disminuye en los fondos genéticos  $\Delta sepD$  y  $\Delta orf12$ , además, esta proteína interactúa con SepD, que a su vez, interactúa con Orf12. Proponemos que la formación del complejo heterotrimérico SepL/SepD/Orf12 es importante para la regulación de la jerarquía de secreción ya que posiblemente, cuando se detecta el ensamblaje de un poro de translocación funcional en la membrana del enterocito, este complejo se disocia y esto conlleva a la secreción de efectores.



## PERSPECTIVAS

Para evaluar la hipótesis de que SepL interactúa con EscN en el mismo sitio donde son reconocidos los complejos chaperona-efector se plantea mapear el sitio de interacción de SepL en EscN. Asimismo, se planea determinar la región de SepL que interactúa con EscN, esto con el fin de identificar aminoácidos importantes para dicha interacción y realizar mutantes puntuales que no interactúen y nos permitan determinar la funcionalidad de esta interacción.

Con el fin de dilucidar la participación de SepL en la regulación positiva de la secreción de translocadores se planea evaluar la interacción entre esta proteína y los complejos chaperona-translocador.

Adicionalmente, se propone evaluar la interacción de SepL  $\Delta 75$  con distintos componentes del SST3 para determinar a qué se debe su falta de complementación.

Se plantea determinar la estabilidad de SepL en la doble mutante EPEC  $\Delta sepD \Delta orf12$ , con la finalidad de dilucidar la importancia de la formación del complejo SepL/SepD/Orf12 en la estabilidad de dicha proteína y en la regulación de la secreción de sustratos.

Se evaluará la interacción entre SepL y Orf12 mediante inmunoréplica de afinidad (*far western*) o coimmunoprecipitación.

Por último, se propone evaluar *in vivo* las interacciones de SepL con distintos componentes del SST3 en diversas condiciones de crecimiento; en presencia y ausencia de calcio.

## APÉNDICE I

### Medios de cultivo, antibióticos y soluciones.

#### o Medios de cultivo.

Eagle modificado por Dulbecco (DMEM):

Disolver un sobre de DMEM (Gibco) en 800 mL de agua desionizada

NaHCO<sub>3</sub> 44 mM

HEPES 0.1 M

Ajustar el pH a 7.1

Agregar 100 L de piridoxal a 40 mg/mL

Aforar a un litro

Filtrar con membrana de 0.22 m

Luria Bertani (LB):

10 g de Bactotripton

5 g de Extracto de levadura

5 g de Cloruro de sodio (NaCl)

10 mL de solución timina-tiamina.

Llevar a 1 L, si se hacen placas de agar, agregar 15 g de Bactoagar

Synthetic Defined (SD):

6.7 g de Yeast nitrogen base without aminoacids

0.6 g de Dropout supplement (-Leu -Trp ó -Leu -Trp -His - Ade)

15 g de agar (solo para placas de agar)

800 mL de agua desionizada

100 mL de la solución de aminoácidos al 10X (L-Histidina 200 mg/mL, L-Leucina 1000 mg/mL, L-Adenina 200 mg/mL, L-Triptófano 200 mg/mL)

Ajustar pH a 5.8, aforar a 950 mL con agua desionizada y esterilizar. Dejar enfriar y agregar glucosa a una

concentración final del 2 % (50 mL de una solución estéril al 40 %).

Yeast Peptone Dextrose Adenine (YPDA):

20 g de Peptona

10 g de extracto de levadura

15 mL de adenina hemisulfatada al 0.2%

15 g de Bactoagar (sólo para placas de agar)

Disolver en 950 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 6.5 y esterilizar. Dejar enfriar y agregar glucosa a una concentración final del 2 % (50 mL de una solución estéril al 40 %).

o **Antibióticos.**

Ampicilina (50 mg/mL): Disolver en agua y filtrar (filtro de 0.22  $\mu$ m)

Cloranfenicol (25 mg/mL): Disolver en etanol.

Estreptomicina (10 mg/mL): Disolver en agua y filtrar.

Kanamicina (20 mg/mL): Disolver en agua y filtrar.

Tetraciclina (5 mg/mL): Disolver en etanol.

o **Soluciones.**

Acetato de litio (LiAc):

Para preparar una solución al 1 M:

Disolver 6.6 g de acetato de litio en 100 mL de agua desionizada y esterilizar.

Amortiguador de carga:

Tris-HCl 50 mM pH 6.8

SDS 4 %  
Azul de bromofenol 0.2 %  
Glicerol 40 %

Amortiguador PBS:

NaCl 137 mM  
KCl 2.7 mM  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM  
Ajustar pH a 7.4

Amortiguador TAE 1X:

Tris 40 mM  
Ácido acético glacial al 1.2%  
EDTA 1 mM pH 8

Amortiguador TN:

NaCl 500 mM  
Tris pH 7.5 20 mM

Amortiguador TTBS:

Tris-HCl 20 mM  
NaCl 150 mM  
Tween 0.1 %

Azul de Coomassie:

Disolver 6 mg de Coomassie brilliant blue R-250 en:  
150 mL de metanol  
30 mL de ácido acético  
120mL de agua desionizada

Bromuro de Etidio:

Preparar el stock a 10 mg/mL y disolverlo a una concentración final de 0.001 mg/mL en amortiguador TAE 1X.

Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>):

Para una solución al 0.1 M

Disolver 1.1 g en 100 mL de agua desionizada y esterilizar.

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF):

Para preparar una solución 100 mM:

Disolver 1.74 g de PMSF en 100 mL de isopropanol.

Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG):

Para una solución 100mM:

Disolver 476 mg de IPTG en 20 mL de agua desionizada y filtrar.

Polietilenglicol (PEG) 3500 50% w/v:

Disolver 5 g de PEG 3500 en 10 mL de agua desionizada y esterilizar.

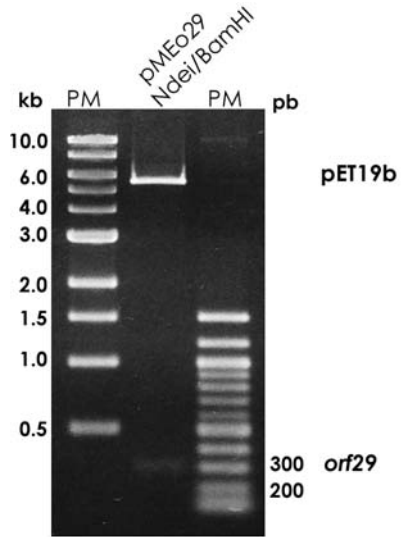
Sulfato de amonio saturado (SAS):

Para preparar 100 mL:

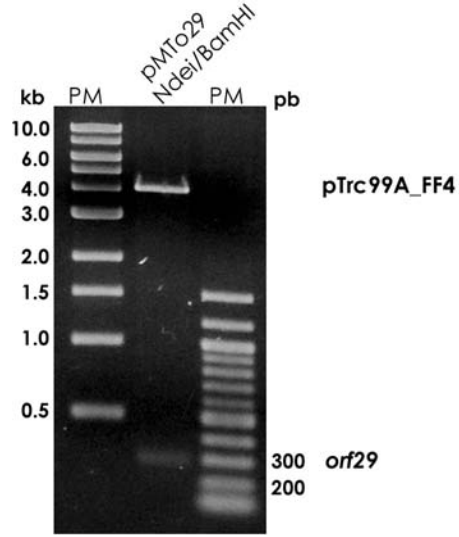
Agregar 80 g de sulfato de amonio a 100 mL de agua desionizada. Disolver con calor (50 °C aproximadamente) y dejar enfriar el temperatura ambiente. Ajustar el pH a 7 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y filtrar la solución.

**APÉNDICE II**  
**Plásmidos construidos.**

Nombre	Inserto	Tamaño del inserto	Sitios de clonación	Vector de clonación	Procedencia
<b>pMEo29</b>	<i>orf29</i>	0.28 kb	NdeI/BamHI	pET19b	Subclona de pMTo29
<b>pMTo29</b>	<i>orf29</i>	0.28 kb	NdeI/BamHI	pTrc99A_FF4	Subclona de pAMo29

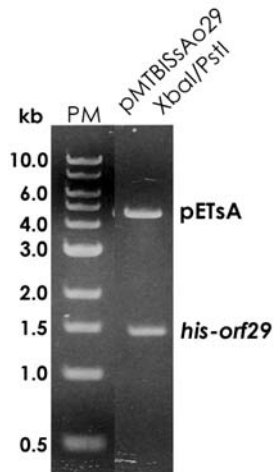


Análisis de restricción del plásmido pMTo29 con las enzimas NdeI/BamHI.



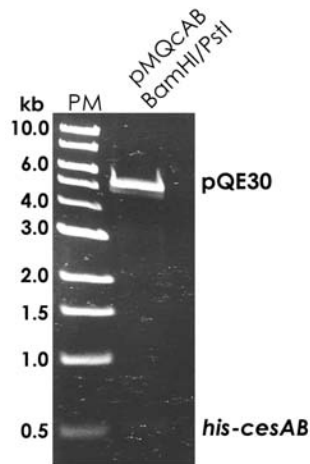
Análisis de restricción del plásmido pMEo29 con las enzimas NdeI/BamHI.

Nombre	Inserto	Tamaño del inserto	Sitios de clonación	Vector de clonación	Procedencia
<b>pMTBISsAo29</b>	<i>his-orf29</i>	1.4 kb	XbaI/PstI	pETsA	Subclona de pMEo29



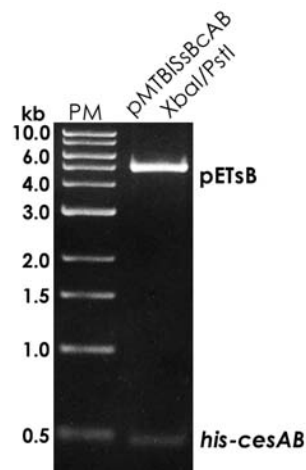
Análisis de restricción del plásmido pMTBISsAo29 con las enzimas XbaI/PstI

Nombre	Inserto	Tamaño del inserto	Sitios de clonación	Vector de clonación	Procedencia
<b>pMQcAB</b>	<i>cesAB</i>	0.32 kb	BamHI/PstI	pQE30	Subclona de pMMcAB



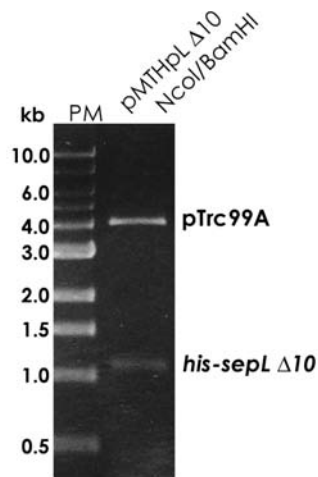
Análisis de restricción del plásmido pMQcAB con las enzimas BamHI/PstI.

Nombre	Inserto	Tamaño del inserto	Sitios de clonación	Vector de clonación	Procedencia
<b>pMTBISsBcAB</b>	<i>his-cesAB</i>	0.5 kb	Sall/XhoI-PstI	pETsB	Subclona de pMQcAB

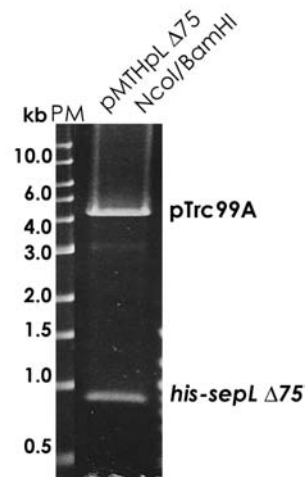


Análisis de restricción del plásmido pMTBISsBcAB con las enzimas XbaI/PstI.

Nombre	Inserto	Tamaño del inserto	Sitios de clonación	Vector de clonación	Procedencia
<b>pMTHpL Δ10</b>	<i>sepL</i> Δ10	1.02 kb	NcoI/BamHI	pTrc99A	Subclona de pMEpL Δ10
<b>pMTHpL Δ75</b>	<i>sepL</i> Δ75	0.83 kb	NcoI/BamHI	pTrc99A	Subclona de pMEpL Δ75

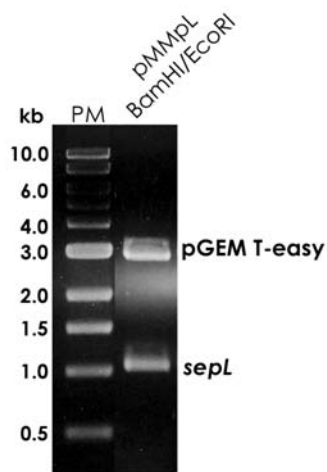


Análisis de restricción del plásmido pMTHpL Δ10 con las enzimas NcoI/BamHI.



Análisis de restricción del plásmido pMTHpL Δ75 con las enzimas NcoI/BamHI.

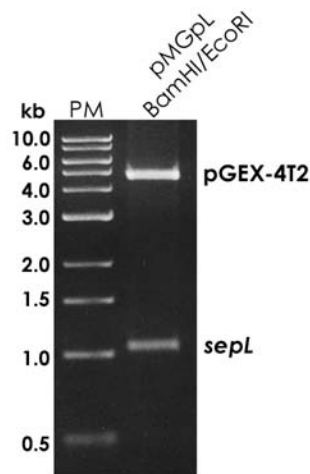
Nombre	Inserto	Tamaño del inserto	Sitios de clonación	Vector de clonación	Procedencia
<b>pMMpL</b>	<i>sepL</i>	1.05 kb	BamHI/EcoRI	pGEM T-easy	PCR DNA de EPEC WT <sup>Strp</sup>



Análisis de restricción del plásmido pMMpL con las enzimas BamHI/EcoRI.

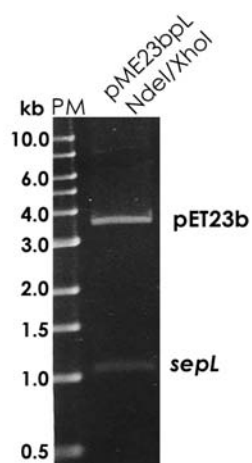


Nombre	Inserto	Tamaño del inserto	Sitios de clonación	Vector de clonación	Procedencia
pMGpL	<i>sepL</i>	1.05 kb	BamHI/EcoRI	pGEX-4T2	Subclona de pMMpL



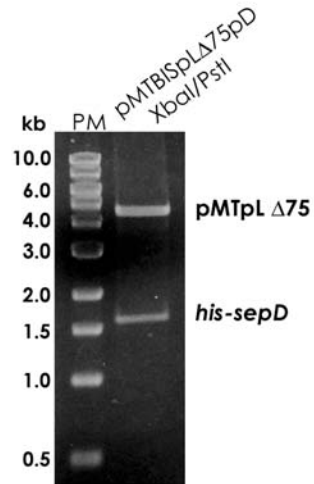
Análisis de restricción del plásmido pMGpL con las enzimas BamHI/EcoRI.

Nombre	Inserto	Tamaño del inserto	Sitios de clonación	Vector de clonación	Procedencia
pME23bpL	<i>sepL</i>	1.05 kb	NdeI/XhoI	pET23b	PCR DNA de EPEC WT <sub>Strp</sub>



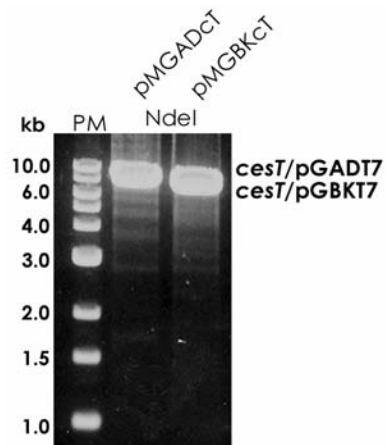
Análisis de restricción del plásmido pME23bpL con las enzimas NdeI/XhoI.

Nombre	Inserto	Tamaño del inserto	Sitios de clonación	Vector de clonación	Procedencia
<b>pMTBISpLΔ75pD</b>	<i>his-sepD</i>	1.6 kb	XbaI/PstI	pMTpL Δ75	Subclona de pAEpD



Análisis de restricción del plásmido pMTBISpLΔ75pD con las enzimas XbaI/PstI.

Nombre	Inserto	Tamaño del inserto	Sitios de clonación	Vector de clonación	Procedencia
<b>pMGADcT</b>	<i>cesT</i>	0.47 kb	Acl- NdeI/BamHI	pGADT7	pOMcT
<b>pMGBKcT</b>	<i>cesT</i>	0.47 kb	Acl- NdeI/BamHI	pGBKT7	pOMcT

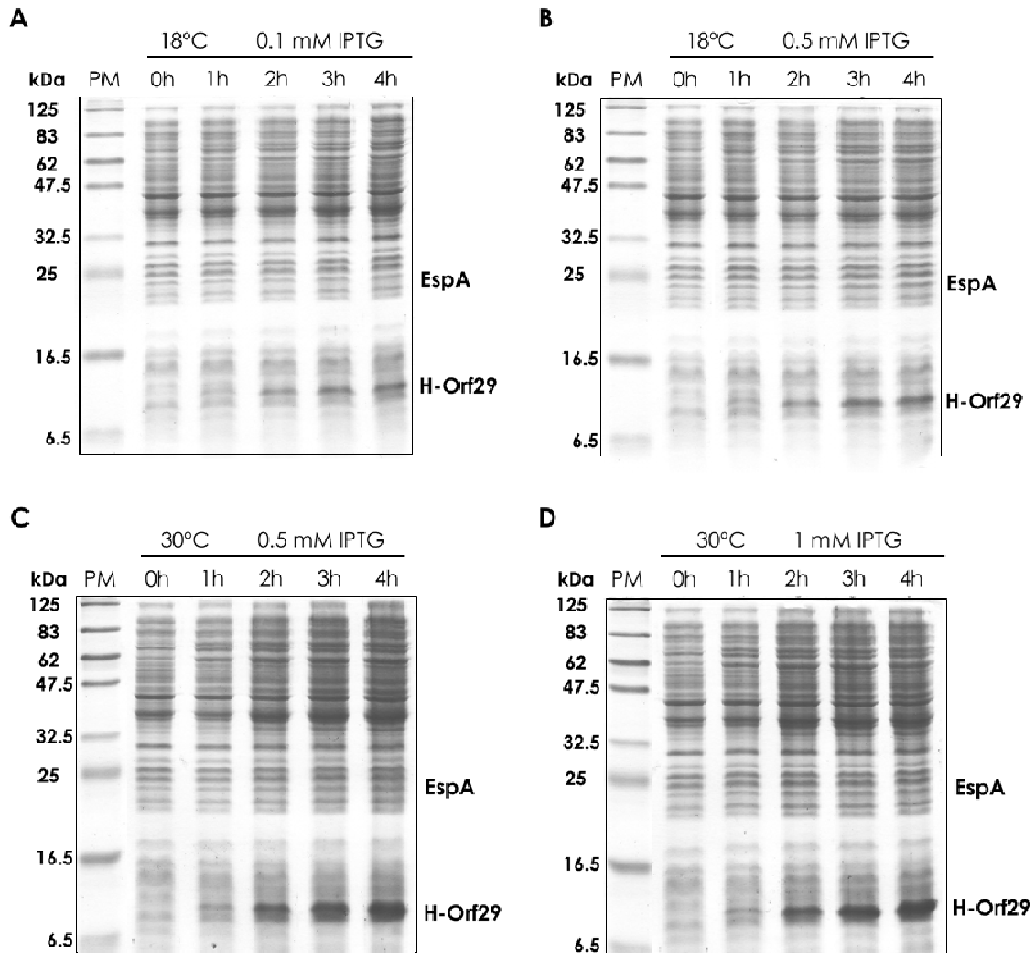


Análisis de restricción de los plásmidos pMGADcT y pMGBKcT con la enzima NdeI.

## APÉNDICE III

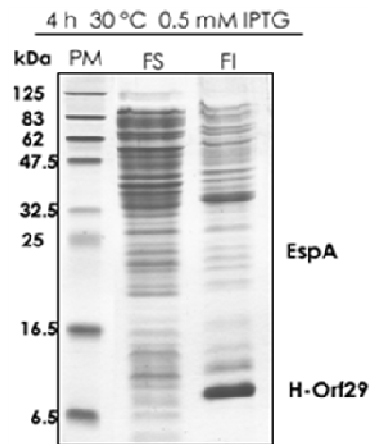
### Sobreproducción y purificación de proteínas.

#### ○ Pruebas de sobreproducción de His-Orf29 y EspA.



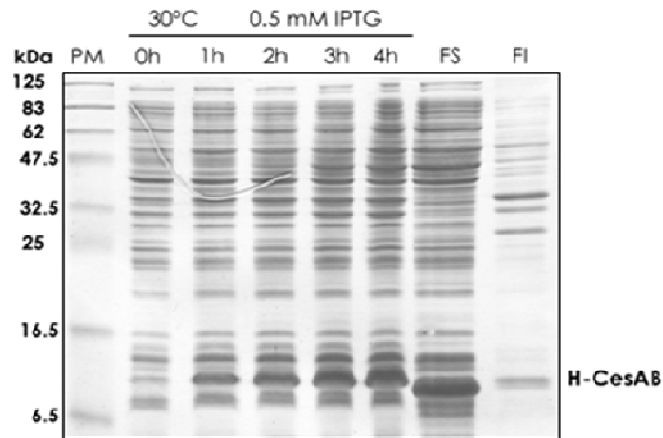
Sobreproducción de His-Orf29 y EspA. El plásmido pMTBISsAo29 se transformó en células SJW1368 y se indujo la sobreexpresión de *his-orf29* y *espA* a 18 °C con (A) 0.1 y (B) 0.5 mM de IPTG y a 30 °C con (C) 0.5 y (D) 1 mM de IPTG. Bajo ninguna condición se observó una inducción clara de EspA.

- **Prueba de solubilidad de His-Orf29 y EspA.**



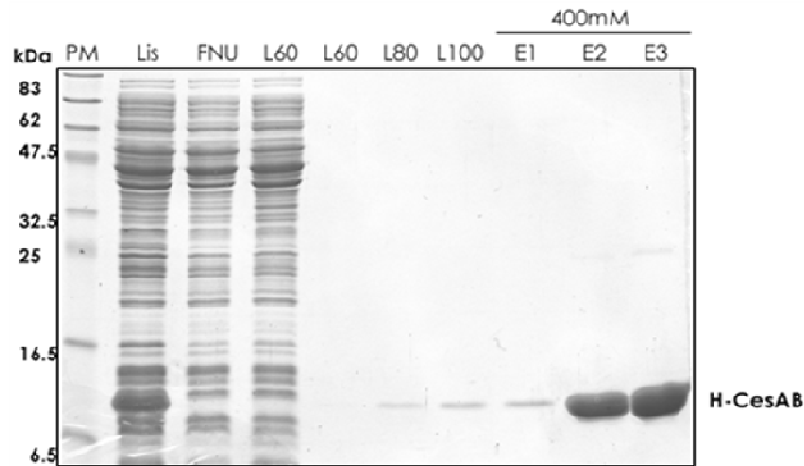
Fraccionamiento celular de células SJW1368 transformadas con el plásmido pMTBISsAo29. La sobreproducción de las proteínas se realizó a 30 °C con 0.5 mM de IPTG por 4 horas. His-Orf29 se observa en la fracción insoluble, sin embargo, EspA no se observa.

- **Sobreproducción y solubilidad de His-CesAB.**



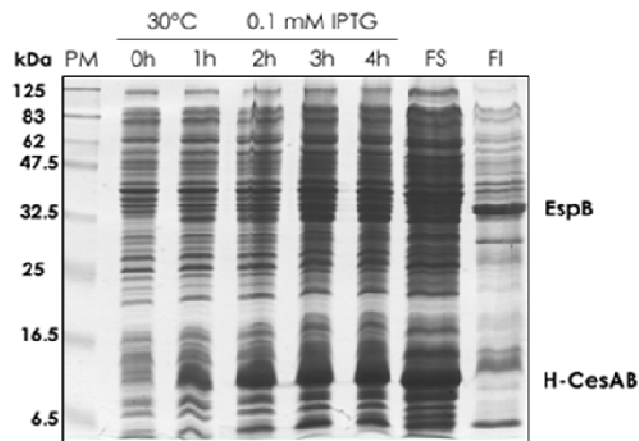
Sobreproducción y solubilidad de His-CesAB. El plásmido pMQcAB se transformó en células M15 y se indujo la sobreexpresión de *his-cesAB* a 30 °C con 0.5 mM de IPTG. Se observó una clara sobreproducción de His-CesAB. Al realizar fraccionamiento celular se observa que His-CesAB queda en la fracción soluble.

○ **Purificación de His-CesAB.**



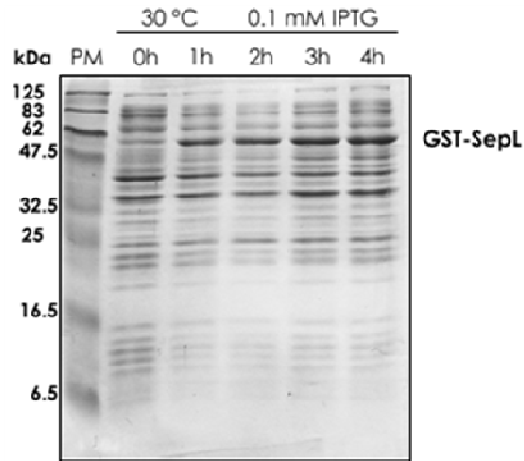
Purificación de His-CesAB mediante cromatografía de afinidad por níquel. La fracción soluble de un lisado celular de células M15 transformadas con el plásmido pMQcAB (Lis) se cargó en una columna con resina de níquel; se dejó eluir la fracción no unida (FNU) y se lavó la columna con concentraciones crecientes de imidazol (60, 80 y 100 mM). Al final se eluyó la proteína con 400 mM de imidazol.

○ **Prueba de sobreproducción y solubilidad de His-CesAB y EspB.**



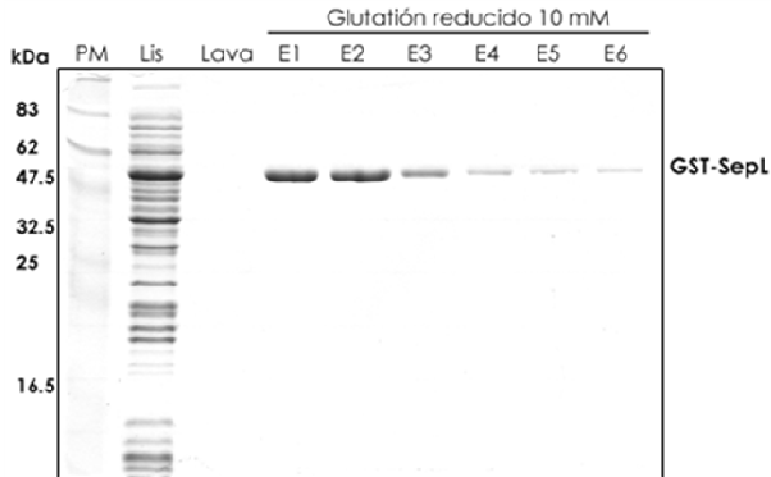
Sobreproducción y solubilidad de His-CesAB y EspB. El plásmido pMTBISsBcAB se transformó en células SJW1368 y se indujo la sobreexpresión de *his-cesAB* y *espB* a 30 °C con 0.1 mM de IPTG. Se observó la sobreproducción de His-CesAB y EspB. Al realizar fraccionamiento celular se observa que His-CesAB queda en la fracción soluble mientras que EspB en la fracción insoluble.

○ **Sobreproducción de GST-SepL.**



Sobreproducción de GST-SepL. El plásmido pMGpL se transformó en células BDP y se indujo la sobreexpresión de *gst-sepL* a 30 °C con 0.1 mM de IPTG. Se observó la sobreproducción de GST-SepL.

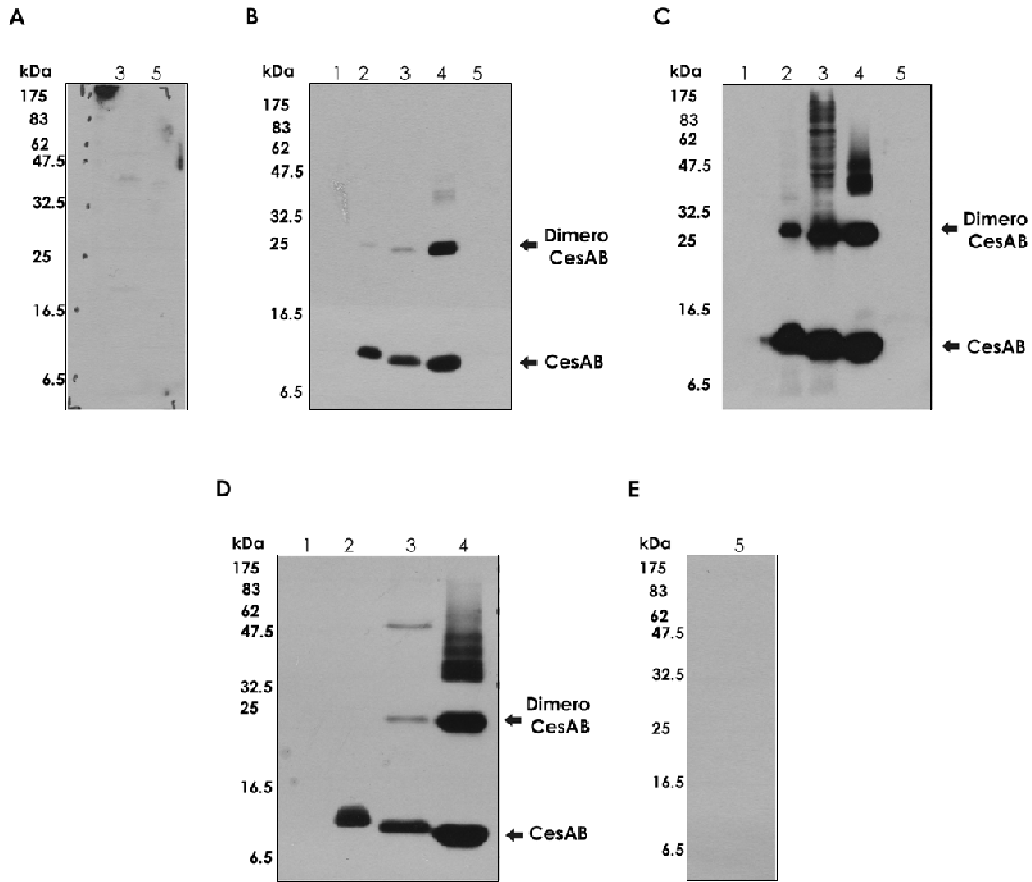
○ **Purificación de GST-SepL.**



Purificación de GST-SepL. La fracción soluble de un lisado celular de células BDP transformadas con el plásmido pMGpL (Lis) se incubó con resina Glutación Sefarosa 4B; posteriormente se lavó 6 veces con 30 mL de amortiguador PBS + 1% de Tween. Al final, GST-SepL se eluyó con 10 mM de glutatión reducido.

## APÉNDICE IV

### Anticuerpos anti-CesAB.



Anticuerpos policlonales anti-CesAB. Inmunodetección contra CesAB utilizando: (A) suero pre-inmune a una dilución 1: 10 000, (B) suero generado en conejo anti-CesAB, primer sangrado 1:10 000, (C) segundo sangrado 1:20 000 y (D) tercer sangrado 1:20 000 y (E) 1:5 000. Como anticuerpos secundario se usó GAR 1:10 000. Las muestras empleadas son las siguientes: (1) Tiempo 0 y (2) 4 de una inducción de His-CesAB, (3) la fracción soluble de un lisado celular de His-CesAB, (4) la elución de una purificación de His-CesAB y (5) la pastilla celular de EPEC WT.

## REFERENCIAS

- Abe, H., I. Tatsuno, et al. (2002). "Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Infect Immun* **70**(7): 3500-3509.
- Akeda, Y. and J. E. Galan (2004). "Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains." *J Bacteriol* **186**(8): 2402-2412.
- Akeda, Y. and J. E. Galan (2005). "Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion." *Nature* **437**(7060): 911-915.
- Aldridge, P. and K. T. Hughes (2002). "Regulation of flagellar assembly." *Curr Opin Microbiol* **5**(2): 160-165.
- Amann, E., B. Ochs, et al. (1988). "Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*." *Gene* **69**(2): 301-315.
- Anderson, D. M. and O. Schneewind (1997). "A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*." *Science* **278**(5340): 1140-1143.
- Andrade, A., J. P. Pardo, et al. (2007). "Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN." *Arch Biochem Biophys* **468**(1): 121-127.
- Arnold, R., A. Jehl, et al. (2010). "Targeting effectors: the molecular recognition of Type III secreted proteins." *Microbes Infect* **12**(5): 346-358.
- Auerbach, H. S., R. D. Baker, et al. (1984). "Molecular mechanism for feedback regulation of C4 biosynthesis in guinea pig peritoneal macrophage." *J Exp Med* **159**(6): 1750-1761.
- Bartel, P., C. T. Chien, et al. (1993). "Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system." *Biotechniques* **14**(6): 920-924.
- Botteaux, A., M. P. Sory, et al. (2009). "MxiC is secreted by and controls the substrate specificity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus." *Mol Microbiol* **71**(2): 449-460.
- Brutinel, E. D. and T. L. Yahr (2008). "Control of gene expression by type III secretory activity." *Curr Opin Microbiol* **11**(2): 128-133.
- Bustamante, V. H., F. J. Santana, et al. (2001). "Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression." *Mol Microbiol* **39**(3): 664-678.
- Campellone, K. G. and J. M. Leong (2003). "Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7." *Curr Opin Microbiol* **6**(1): 82-90.
- Cleary, J., L. C. Lai, et al. (2004). "Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin." *Microbiology* **150**(Pt 3): 527-538.
- Coombes, B. K., N. F. Brown, et al. (2004). "Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL." *J Biol Chem* **279**(48): 49804-49815.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." *Nat Rev Microbiol* **4**(11): 811-825.
- Creasey, E. A., R. M. Delahay, et al. (2003). "Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*." *Microbiology* **149**(Pt 8): 2093-2106.
- Chen, H. D. and G. Frankel (2005). "Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis." *FEMS Microbiol Rev* **29**(1): 83-98.
- Cheng, L. W., O. Kay, et al. (2001). "Regulated secretion of YopN by the type III machinery of *Yersinia enterocolitica*." *J Bacteriol* **183**(18): 5293-5301.



- Dale, C., G. R. Plague, et al. (2002). "Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12397-12402.
- Day, J. B., F. Ferracci, et al. (2003). "Translocation of YopE and YopN into eukaryotic cells by Yersinia pestis yopN, tyeA, sycN, yscB and lcrG deletion mutants measured using a phosphorylatable peptide tag and phosphospecific antibodies." Mol Microbiol **47**(3): 807-823.
- Dean, P. and B. Kenny (2009). "The effector repertoire of enteropathogenic E. coli: ganging up on the host cell." Curr Opin Microbiol **12**(1): 101-109.
- Dean, P., M. Maresca, et al. (2005). "EPEC's weapons of mass subversion." Curr Opin Microbiol **8**(1): 28-34.
- Deane, J. E., P. Abrusci, et al. (2010). "Timing is everything: the regulation of type III secretion." Cell Mol Life Sci **67**(7): 1065-1075.
- Deane, J. E., P. Roversi, et al. (2008). "Structures of the Shigella flexneri type 3 secretion system protein MxiC reveal conformational variability amongst homologues." J Mol Biol **377**(4): 985-992.
- Deng, W., Y. Li, et al. (2005). "Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens." Infect Immun **73**(4): 2135-2146.
- Deng, W., J. L. Puente, et al. (2004). "Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3597-3602.
- Diepold, A., M. Amstutz, et al. (2010). "Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome." EMBO J **29**(11): 1928-1940.
- Edqvist, P. J., J. Olsson, et al. (2003). "YscP and YscU regulate substrate specificity of the Yersinia type III secretion system." J Bacteriol **185**(7): 2259-2266.
- Elliott, S. J., L. A. Wainwright, et al. (1998). "The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic Escherichia coli E2348/69." Mol Microbiol **28**(1): 1-4.
- Feldman, M. F. and G. R. Cornelis (2003). "The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa." FEMS Microbiol Lett **219**(2): 151-158.
- Ferracci, F., J. B. Day, et al. (2004). "Expression of a functional secreted YopN-TyeA hybrid protein in Yersinia pestis is the result of a +1 translational frameshift event." J Bacteriol **186**(15): 5160-5166.
- Ferracci, F., F. D. Schubot, et al. (2005). "Selection and characterization of Yersinia pestis YopN mutants that constitutively block Yop secretion." Mol Microbiol **57**(4): 970-987.
- Forsberg, A., A. M. Viitanen, et al. (1991). "The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in Yersinia pseudotuberculosis." Mol Microbiol **5**(4): 977-986.
- Frankel, G., A. D. Phillips, et al. (1998). "Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli: more subversive elements." Mol Microbiol **30**(5): 911-921.
- Galan, J. E. and H. Wolf-Watz (2006). "Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines." Nature **444**(7119): 567-573.
- Gauthier, A. and B. B. Finlay (2003). "Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic Escherichia coli." J Bacteriol **185**(23): 6747-6755.
- Gauthier, A., J. L. Puente, et al. (2003). "Secretin of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization." Infect Immun **71**(6): 3310-3319.
- Guttman, J. A. and B. B. Finlay (2008). "Subcellular alterations that lead to diarrhea during bacterial pathogenesis." Trends Microbiol **16**(11): 535-542.
- He, S. Y., K. Nomura, et al. (2004). "Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 181-206.

- Ide, T., S. Laarmann, et al. (2001). "Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic Escherichia coli." Cell Microbiol **3**(10): 669-679.
- Ide, T., S. Michgehl, et al. (2003). "Differential modulation by Ca<sup>2+</sup> of type III secretion of diffusely adhering enteropathogenic Escherichia coli." Infect Immun **71**(4): 1725-1732.
- Iriarte, M., M. P. Sory, et al. (1998). "TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of Yersinia Yop effectors." EMBO J **17**(7): 1907-1918.
- Iwabuchi, K., B. Li, et al. (1993). "Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization." Oncogene **8**(6): 1693-1696.
- Jarvis, K. G., J. A. Giron, et al. (1995). "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 **92**(17): 7996-8000.
- Johnson, S., P. Roversi, et al. (2007). "Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD." J Biol Chem **282**(6): 4035-4044.
- Journet, L., C. Agrain, et al. (2003). "The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler." Science **302**(5651): 1757-1760.
- Kalman, D., O. D. Weiner, et al. (1999). "Enteropathogenic E. coli acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals." Nat Cell Biol **1**(6): 389-391.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, et al. (2004). "Pathogenic Escherichia coli." Nat Rev Microbiol **2**(2): 123-140.
- Kenny, B., A. Abe, et al. (1997). "Enteropathogenic Escherichia coli protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract." Infect Immun **65**(7): 2606-2612.
- Kenny, B., R. DeVinney, et al. (1997). "Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells." Cell **91**(4): 511-520.
- Knutton, S., I. Rosenshine, et al. (1998). "A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic Escherichia coli involved in protein translocation into epithelial cells." EMBO J **17**(8): 2166-2176.
- Kresse, A. U., F. Beltrametti, et al. (2000). "Characterization of SepL of enterohemorrhagic Escherichia coli." J Bacteriol **182**(22): 6490-6498.
- Kubori, T. and J. E. Galan (2002). "Salmonella type III secretion-associated protein InvE controls translocation of effector proteins into host cells." J Bacteriol **184**(17): 4699-4708.
- Levine, M. M., E. J. Bergquist, et al. (1978). "Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive." Lancet **1**(8074): 1119-1122.
- Levine, M. M. and R. Edelman (1984). "Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis." Epidemiol Rev **6**: 31-51.
- Lodato, P. B. and J. B. Kaper (2009). "Post-transcriptional processing of the LEE4 operon in enterohaemorrhagic Escherichia coli." Mol Microbiol **71**(2): 273-290.
- Lorenz, C. and D. Buttner (2009). "Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen Xanthomonas campestris pv. vesicatoria." J Bacteriol **191**(5): 1414-1428.
- Macnab, R. M. (1999). "The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus." J Bacteriol **181**(23): 7149-7153.
- Martinez-Argudo, I. and A. J. Blocker (2010). "The Shigella T3SS needle transmits a signal for MxiC release, which controls secretion of effectors." Mol Microbiol **78**(6): 1365-1378.
- McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, et al. (1995). "A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1664-1668.
- McDaniel, T. K. and J. B. Kaper (1997). "A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K-12." Mol Microbiol **23**(2): 399-407.

- Mellies, J. L., A. M. Barron, et al. (2007). "Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation." Infect Immun **75**(9): 4199-4210.
- Mellies, J. L., S. J. Elliott, et al. (1999). "The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler)." Mol Microbiol **33**(2): 296-306.
- Mills, E., K. Baruch, et al. (2008). "Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*." Cell Host Microbe **3**(2): 104-113.
- Moriya, N., T. Minamino, et al. (2006). "The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock." J Mol Biol **359**(2): 466-477.
- Mota, L. J., L. Journet, et al. (2005). "Bacterial injectisomes: needle length does matter." Science **307**(5713): 1278.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." Clin Microbiol Rev **11**(1): 142-201.
- Nilsson, P., S. Naureckiene, et al. (1996). "Mutations affecting mRNA processing and fimbrial biogenesis in the *Escherichia coli* pap operon." J Bacteriol **178**(3): 683-690.
- O'Connell, C. B., E. A. Creasey, et al. (2004). "SepL, a protein required for enteropathogenic *Escherichia coli* type III translocation, interacts with secretion component SepD." Mol Microbiol **52**(6): 1613-1625.
- Ogino, T., R. Ohno, et al. (2006). "Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **188**(8): 2801-2811.
- Ohnishi, K., F. Fan, et al. (1997). "The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly." J Bacteriol **179**(19): 6092-6099.
- Ohnishi, K., Y. Ohto, et al. (1994). "FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **176**(8): 2272-2281.
- Pallen, M. J., S. A. Beatson, et al. (2005). "Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion." BMC Microbiol **5**: 9.
- Pallen, M. J., S. A. Beatson, et al. (2005). "Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective." FEMS Microbiol Rev **29**(2): 201-229.
- Riordan, K. E., J. A. Sorg, et al. (2008). "Impassable YscP substrates and their impact on the *Yersinia enterocolitica* type III secretion pathway." J Bacteriol **190**(18): 6204-6216.
- Rothbaum, R., A. J. McAdams, et al. (1982). "A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants." Gastroenterology **83**(2): 441-454.
- Ryu, J. and R. J. Hartin (1990). "Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2." Biotechniques **8**(1): 43-45.
- Sal-Man, N., E. Biemans-Oldehinkel, et al. (2009). "Structural microengineers: pathogenic *Escherichia coli* redesigns the actin cytoskeleton in host cells." Structure **17**(1): 15-19.
- Saldana, Z., A. L. Erdem, et al. (2009). "The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*." J Bacteriol **191**(11): 3451-3461.
- Schlumberger, M. C., A. J. Muller, et al. (2005). "Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12548-12553.
- Sekiya, K., M. Ohishi, et al. (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 U S A **98**(20): 11638-11643.
- Sorg, I., S. Wagner, et al. (2007). "YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome." EMBO J **26**(12): 3015-3024.

- Sorg, J. A., N. C. Miller, et al. (2005). "Rejection of impassable substrates by Yersinia type III secretion machines." *J Bacteriol* **187**(20): 7090-7102.
- Sory, M. P. and G. R. Cornelis (1994). "Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from Yersinia enterocolitica into HeLa cells." *Mol Microbiol* **14**(3): 583-594.
- Stone, C. B., D. L. Johnson, et al. (2008). "Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN (Cpn0707) of Chlamydomonada pneumoniae." *J Bacteriol* **190**(20): 6580-6588.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, et al. (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol* **185**: 60-89.
- Sukhan, A., T. Kubori, et al. (2001). "Genetic analysis of assembly of the Salmonella enterica serovar Typhimurium type III secretion-associated needle complex." *J Bacteriol* **183**(4): 1159-1167.
- Tenaillon, O., D. Skurnik, et al. (2010). "The population genetics of commensal Escherichia coli." *Nat Rev Microbiol* **8**(3): 207-217.
- Thomas, N. A., W. Deng, et al. (2007). "Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic Escherichia coli." *J Biol Chem* **282**(40): 29634-29645.
- Thomas, N. A., W. Deng, et al. (2005). "CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic Escherichia coli." *Mol Microbiol* **57**(6): 1762-1779.
- Tobe, T. and C. Sasakawa (2001). "Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli in host cell adherence and in microcolony development." *Cell Microbiol* **3**(9): 579-585.
- Tree, J. J., E. B. Wolfson, et al. (2009). "Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic Escherichia coli." *Trends Microbiol* **17**(8): 361-370.
- Veenendaal, A. K., J. L. Hodgkinson, et al. (2007). "The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion." *Mol Microbiol* **63**(6): 1719-1730.
- Viswanathan, V. K., K. Hodges, et al. (2009). "Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea." *Nat Rev Microbiol* **7**(2): 110-119.
- Wang, D., A. J. Roe, et al. (2008). "Hierarchical type III secretion of translocators and effectors from Escherichia coli O157:H7 requires the carboxy terminus of SepL that binds to Tir." *Mol Microbiol* **69**(6): 1499-1512.
- Wilson, R. K., R. K. Shaw, et al. (2001). "Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic Escherichia coli." *Cell Microbiol* **3**(11): 753-762.
- Ye, Q. and H. J. Worman (1995). "Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast." *Exp Cell Res* **219**(1): 292-298.
- Yip, C. K., T. G. Kimbrough, et al. (2005). "Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly." *Nature* **435**(7042): 702-707.
- Younis, R., L. E. Bingle, et al. (2010). "SepL resembles an aberrant effector in binding to a class 1 type-III secretion chaperone and carrying an N-terminal secretion signal." *J Bacteriol*.
- Yu, X. J., M. Liu, et al. (2004). "SsaM and SpiC interact and regulate secretion of Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system effectors and translocators." *Mol Microbiol* **54**(3): 604-619.
- Yu, X. J., K. McGourty, et al. (2010). "pH sensing by intracellular Salmonella induces effector translocation." *Science* **328**(5981): 1040-1043.
- Zarivach, R., W. Deng, et al. (2008). "Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS." *Nature* **453**(7191): 124-127.
- Zarivach, R., M. Vuckovic, et al. (2007). "Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system." *Nat Struct Mol Biol* **14**(2): 131-137.