



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

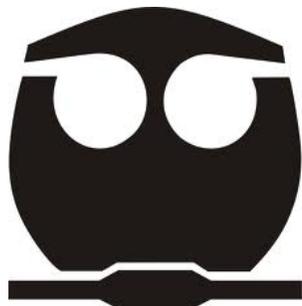
“IDENTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE PHAGE
DISPLAY DE MIMÓTOPOS DE EPÍTOPES
INMUNODOMINANTES EN LA PROTEÍNA SAT”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO-BIOLÓGICA

PRESENTA

ALEJANDRA BERROCAL PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Eduardo Bonilla Espinosa

VOCAL: Profesor: Patricia Elvira Berron Ruiz

SECRETARIO: Profesor: Ulises Hernández Chiñas

1er. SUPLENTE: Profesor: Enrique Ortega Soto

2° SUPLENTE: Profesor: Beatriz Ruiz Villafan

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA DEL DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.



Dr. Ulises Hernández Chiñas
ASESOR DEL TEMA



Alejandra Berrocal Pérez
SUSTENTANTE

Este trabajo de tesis se desarrolló con el apoyo del proyecto 82755 CONACYT “Respuesta Inmune Innata de Macrófagos Humanos a través de los Receptores Tipo Toll (TLRs), inducida por Toxinas de la familia SPATEs Secretadas por Cepas de *Escherichia coli* de diferentes grupos Patógenos”

RESUMEN

Las proteasas de Serina Autotransportadas por la familia *Enterobacteriaceae* (SPATES por sus siglas en inglés) se han relacionado con la virulencia de diferentes Enterobacterias, Sat es una proteasa de serina secretada por cepas de *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC), con un peso molecular de 107 kDa, su actividad biológica sobre células es citotoxina vacuolizante, produciendo daño al epitelio del riñón, contribuyendo a la patogénesis de infecciones de tracto urinario (ITU).

El diagnóstico rápido en ITU ocasionada por *E. coli* Uropatógena es necesario para implementar un tratamiento específico y oportuno de la infección, disminuyendo las complicaciones renales.

La detección específica de motivos inmunodominantes en la proteína Sat resulta de gran relevancia para la implementación de pruebas de identificación rápida de la proteína. Mediante el método de Phage Display se identificaron péptidos mimótopos fusionados genéticamente a la proteína III de la superficie del bacteriófago M13 por selección *in vitro* con anticuerpos anti-Sat. La selección de dichos péptidos confiere una herramienta útil para la obtención de anticuerpos

específicos que pueden ser empleados para el desarrollo de sistemas de diagnóstico rápido de UPEC.

Los motivos identificados en el presente trabajo son LKGGNHINLPST, MSPFAIDLTMVT y HPSTRPPLVGDN correspondientes a las clonas de fagos A1, B17 y B18 de los ensayos realizados. Estos motivos se identificaron en la secuencia primaria y terciaria de la proteína Sat. Sin embargo solo el motivo discontinuo AIDLTM es un mimótopo de Sat, esto se corroboró después de realizar un ensayo de ELISA y western-blot utilizando como antígeno la proteína Sat y los anticuerpos anti LxKGGN, anti-AIDLTM o anti-GDNP obtenidos en conejos después de inmunizarlos con las clonas A1, B17 y B18 respectivamente.

Los resultados obtenidos en este proyecto, son relevantes ya que se cuenta con bacteriófagos que presentan un motivo (AIDLTM) inmunodominante de Sat, como anticuerpos contra dicho motivo lo que permitirá en un futuro su empleo en el desarrollo de reactivos de inmunodiagnóstico para la detección oportuna de Sat en muestras clínicas.

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Infecciones de Tracto Urinario	1
I.1.1 <i>Escherichia coli</i> agente causal de ITU	2
I.1.2 <i>E. coli</i> Uropatógena (UPEC)	3
I.1.3 Colonización de UPEC	5
I.1.4 Sistemas de adquisición de hierro	7
I.1.5 Toxinas secretadas.	7
I.2 SPATEs	8
I.2.1 Sistema de Secreción Tipo V	9
I.3 Sat (Secreted Autotransporter Toxin)	12
I.3.1 Prevalencia de Sat en cepas de <i>E. coli</i>	14
I.4 Phage Display	15
I.4.1 Bacteriófago M13	16
I.4.2 Librerías de Péptidos al Azar	17
I.4.3 Biselección	19
I.4.4 Epítopes Discontinuos	20
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVO GENERAL	24
V. OBJETIVOS PARTICULARES	25
VI. MÉTODOS	26
VI.1 Obtención de la Proteína Sat	26
VI.2 Obtención de Anticuerpos anti-Sat	28
VI.3 Evaluación de la reactividad de sueros preinmunes	29
VI.4 Titulación de suero anti-Sat	30
VI.5 Obtención de IgGs	30
VI.6 Titulación de fagos	31
VI.7 Bioselección de Fagótopos	33
VI.8 Selección de las clonas de fagos	35
VI.9 Extracción del ADN de las clonas de fagos	36
VI.10 Obtención de la secuencia de aminoácidos de las Clonas	36
VI.11 Reactividad de las clonas de fagos	37
VI.12 Análisis de las Secuencias de Péptidos Mimótopos Seleccionados	38

VI.13 Modelo de Sat	38
VI.14 Obtención de Anticuerpos anti-fagótopos	39
VI.15 ELISA	39
VII. RESULTADOS	41
VII.1 Obtención y purificación de Sat	41
VII.2 Selección de conejos para la producción de anticuerpos anti-Sat	42
VII.3 Anticuerpos anti-Sat	42
VII.4 Obtención de IgG's anti-Sat	42
VII.5 Selección de Mimótopos de Sat	44
VII.6 Antigenicidad de los Fagótopos Seleccionados	44
VII.7 Extracción del ADN de Fagótopos seleccionados	45
VII.8 Secuencia de Aminoácidos de los Péptidos Mimótopos	46
VII.9 Alineamiento de las Secuencias de aminoácidos obtenidas en los fagótopos seleccionados contra las reportadas para diferentes SPATEs	48
VII.10 Ubicación de los mimótopos identificados sobre un Modelo tridimensional de Sat.	51
VII.11 Anticuerpos anti-Mimótopos	51
VII.12 Reactividad de los sueros antimimótopos contra tres diferentes SPATEs	53
VIII. DISCUSIÓN	55
IX. CONCLUSIONES	64
X. ANEXOS	65
X1. Abreviaturas	65
X2. Medios y soluciones	66
XI. BIBLIOGRAFÍA	75

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Infecciones de Tracto Urinario

Actualmente en nuestro país y en el mundo, las infecciones de tracto urinario (ITU) son comunes en humanos (Allsop *et al.*, 2010), dichas infecciones causan incomodidad en los pacientes, lo que conlleva a una pérdida de productividad laboral, predisposición a infecciones más severas y por tanto uso de terapias de antibióticos prolongadas; por lo que, dichas infecciones son un problema de salud pública a nivel mundial (Mobley *et al.*, 2010).

Las ITU son causadas por patógenos intracelulares oportunistas que toman ventajas del hospedador y poseen un repertorio de factores de virulencia para colonizar el tracto urinario (Wiles *et al.*, 2008). Se ha identificado a bacterias uropatógenas en la materia fecal, misma que infecta el área periuretral hasta la vejiga, causando cistitis, finalmente la bacteria puede ascender por los uréteres al riñón estableciendo una infección secundaria: pielonefritis aguda (Mobley *et al.*, 2010).

La bacteria comúnmente asociada a Infecciones de tracto Urinario es *Escherichia coli*, responsable de 80% de las ITU (Tabibian *et al.*, 2008) sin embargo, también se han asociado otros microorganismos en base a sus factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad para colonizar e infectar el tracto urinario como *Proteus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. (Tabibian *et al.*, 2008).

Los individuos con un alto riesgo de contraer una ITU son neonatos, niñas en edad escolar, mujeres sexualmente activas así como mujeres y hombres en edad adulta. Es posible que un 40% de las mujeres y un 12% de los hombres antes de los 20 o después de los 80 años de edad hayan presentado, al menos una vez ITU (Guyer *et al.*, 2002).

1.1.1 *Escherichia coli* agente causal de ITU

Escherichia coli (*E. coli*) es una especie bacteriana increíblemente diversa, con la capacidad de colonizar y persistir en numerosos nichos, tanto en el medio ambiente como en huéspedes animales incluyendo al humano (Croxen *et al.*, 2010). *E. coli* y otros comensales de la biota intestinal de los mamíferos a menudo forman una relación simbiótica con beneficios como la proporción de nutrientes al hospedero, señales clave para el desarrollo, regulación inmunológica y protección contra patógenos externos (Yan y Polk *et al.*, 2004). Algunas cepas de *E. coli* divergen de comensales, obteniendo un carácter más patógeno y la capacidad de causar enfermedad, tanto en el tracto intestinal como en otros lugares dentro del

huésped. Estas cepas patógenas de *E. coli* son agrupadas como *E. coli* diarreogénica y *E. coli* extraintestinal (EXPEC) (Kaper *et al.*, 2004).

Dentro de cada uno de estos grandes grupos, hay un conjunto de cepas conocidas como patotipos que comparten factores de virulencia y con resultados patológicos similares (Marrs *et al.*, 2005). Varios patotipos de *E. coli* diarreogénica dan lugar a la gastroenteritis, pero rara vez causa la enfermedad fuera del tracto intestinal. (Croxen *et al.*, 2010). Por otra parte EXPEC, han mantenido la capacidad de existir en el intestino sin consecuencias, pero tienen la capacidad para difundir y colonizar otros nichos de acogida incluyendo la sangre, sistema nervioso central, y las vías urinarias, lo que resulta en enfermedad (Croxen *et al.*, 2010).

1.1.2 *E. coli* Uropatógena (UPEC).

Dentro de las EXPEC, las cepas de *E. coli* Uropatógena (UPEC) son las más comúnmente asociadas con las enfermedades humanas. Estas bacterias son la causa principal de ITU (70-95%) y una gran parte de las infecciones urinarias nosocomiales (50%), lo que representa un alto costo médico en todo el mundo (Foxman, 2003). Las infecciones urinarias recurrentes o recidivantes son especialmente problemáticas en muchas personas, cepas de UPEC actúan como patógenos oportunistas intracelulares, aprovechando el comportamiento del sistema inmune y la sensibilidad mediante el empleo de diversos factores de virulencia para colonizar el tracto urinario. Se cree que un reservorio primario de las cepas UPEC es el tracto intestinal humano, en muchos casos la misma cepa responsable de una ITU es aislada con frecuencia de un coprocultivo a partir de la

misma persona (Wiles TJ *et al.*, 2008). En algunos casos, la difusión de una clona de UPEC puede ocurrir a través de alimentos contaminados o de otros consumibles dentro de una comunidad (Manges *et al.*, 2001). Por otra parte, cepas de UPEC aisladas de pacientes sexualmente activos a menudo coinciden con los aislados de sus parejas, lo que indica que las infecciones urinarias pueden ser de transmisión sexual (Wiles TJ *et al.*, 2008).

Una vez en el tracto urinario UPEC coloniza la vejiga, causando cistitis, puede ascender al riñón vía uréteres, causando pielonefritis (Wiles TJ *et al.*, 2008). Como respuesta del hospedador a la presencia de estos microorganismos en el tracto urinario, se genera producción de citocinas, neutrófilos y exfoliación de células epiteliales de vejiga así como la generación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno que funcionan como antimicrobianos. (Bower *et al.*, 2005)

UPEC lleva a cabo distintos mecanismos para evadir la respuesta del hospedador, los cuales permiten una colonización efectiva en el tracto urinario para persistir en él (Croxen *et al.*, 2010). Cepas virulentas de *E. coli*, asociadas a infecciones de tracto urinario expresan diferentes factores de patogenicidad mediante genes asociados a virulencia, que se encuentran en el cromosoma de UPEC codificados en Islas de Patogenicidad que han sido adquiridas por transferencia horizontal de genes (Croxen *et al.*, 2010). Entre estos factores se encuentran: la presencia de adhesinas o fimbrias P, necesarias para la adhesión a células uroepiteliales; un sistema de adquisición de hierro para sobrevivir en el ambiente extraintestinal, generación de toxinas autotransportadas por diversos sistemas de secreción para

ser ancladas a células epiteliales (Wiles *et al.*, 2008). Cepas de UPEC poseen considerables diferencias en el repertorio y niveles de expresión de los factores de virulencia (Cuadro 1) que pueden afectar el crecimiento bacteriano y su persistencia en el tracto urinario (Guyer *et al.*, 2008).

I.1.3 Colonización de UPEC

La habilidad de UPEC para unirse a los tejidos del hospedador, facilita su colonización en el tracto urinario y permite su invasión a células uroteliales a pesar del flujo de la orina (Wiles TJ *et al.*, 2008). En las células endoteliales de vejiga, UPEC es transferida al citosol de las células de sombrilla a través de compartimentos ácidos semejantes a endosomas o lisosomas, donde rápidamente se multiplica, formando, una estructura similar a una biopelícula en la cual se encuentran millones de bacterias. (Anderson *et al.*, 2003). Las células de vejiga, contienen numerosas bacterias que son inicialmente exfoliadas y el hospedador posee mecanismos con los cuales rápidamente se puede eliminar a las bacterias, a través del flujo de la orina. Sin embargo, este proceso permite que células epiteliales inmaduras en capas inferiores, queden expuestas después de la exfoliación, haciendo más susceptible a la infección (Wiles TJ *et al.*, 2008). Los compartimentos semejantes a endosomas están formados por redes de filamentos de actina, la replicación de estas uniones de actina hacen a la bacteria menos susceptible a antibióticos y por lo tanto, menos inmunogénica.

Cuadro 1. Factores de virulencia asociados *E. coli* Uropatógena de diferentes aislamientos.

Genes	CFT073*	536*	UT189*	ABU 83972*	APEC-01*
Serotipo	O6:K2:H1	O6:K15:H31	O18:K1:H7	OR:K5:H-	O1:K1:H7
ADQUISICIÓN DE HIERRO					
Sideróforo de enterobactina	+	+	+	+	+
Sideróforo de Salmoquelina	+	+	+	+	+
Transporte Hierro-Manganeso	+	-	+	+	+
PILI					
fim (Tipo 1)	+	+	+	+/nf	+
pap (P)	++	+	+	+/nf	+
Sfa (S)	+	+	+	-	-
Foc (FiC)	+	+	-	+/nf	-
TOXINAS SECRETADAS					
Hly (hemolisina)	+	++	+	+/nf	-
Vat	+	+	+	?	+
Sat	+	-	-	?	-
UpaH	++	?	?	?	?

*CFT073 (*E. coli* aislada de una mujer con pielonefritis), 536 (Aislamiento de pielonefritis), UT189 (Aislamiento de cistitis), ABU 83972 (Bacteriuria asintomática por *E.coli*), APEC-01 (*E. coli* Patógena aviar) (+/nf: no funcional).

Los rearrreglos de fibras de actina durante la diferenciación terminal de células inmaduras infectadas, permiten incrementar la multiplicación de UPEC y recrudecer los síntomas clínicos (Wiles, *et al.*, 2008).

I.1.4 Sistemas de Adquisición de Hierro

Uno de los factores más importantes para procesos celulares de organismos eucariontes y procariontes es el hierro. Para su crecimiento, las bacterias necesitan concentraciones de hierro citoplasmáticas de $\sim 10^{-6}$ M, es por ello que llevan a cabo mecanismos para obtener hierro del hospedador (Wiles *et al.*, 2008). Esto incluye la expresión de sistemas de adquisición de hierro del medio, sideróforos. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que tienen una alta afinidad por el ion férrico (Fe^{+3}) el cual es insoluble como catión libre. La bacteria se une al sideróforo a través de receptores que facilitan el transporte de complejos hierro-sideróforo a través de la membrana y al interior del citosol (Wiles *et al.*, 2008).

I.1.5 Toxinas Secretadas

La secreción de proteínas para las bacterias ocupa un papel importante en adquisición de nutrientes, adaptación a diferentes medios, comunicación inter e intra-especies, y virulencia (Croxen *et al.*, 2010). En el caso de UPEC, la mayoría de las toxinas son secretadas por el sistema de secreción tipo III, como hemolisina (HlyA), la cual produce lisis celular debido a la formación de dos poros en células del hospedador. Otro sistema de secreción involucrado con la liberación de toxinas de *E. coli* extraintestinales, es el tipo V (Henderson *et al.*, 2004), sistema utilizado por serin proteasas “autosecretadas” por UPEC: Vat (del inglés Vacuolized Autotransporter Toxin), Sat (del inglés: Secreted Autotransported Toxin) y UpaH

(Proteína expresada en E. Coli CFT073), toxinas expresadas por diferentes aislamientos de UPEC (Cuadro 1).

I.2 SPATEs

Las SPATEs (del inglés *Serin Protease Autotransporter from Enterobacteriaceae*) son serin proteasas que, de manera general, se han definido como factores de virulencia de Enterobacterias (Henderson 2001, Yen 2008). Estas proteasas presentan dominios comunes para ser secretadas al medio externo por el sistema de secreción tipo V (Henderson 2004, Villaseca 2005), tales como:

- **Péptido señal:** se encuentra en la región amino terminal, éste dominio es importante para la translocación de la proteína en la región periplásmica (Fig. 1).
- **Dominio pasajero:** se localiza el sitio activo de la proteasa, conformado por los aminoácidos Histidina (base catalítica), Asparagina (Aminoácido electrofílico) y Serina (Aminoácido nucleofílico) (Fig. 1).
- **Dominio β -Barril o translocón:** se encuentra en el extremo carboxilo terminal, es una estructura de β -barril que, en conjunto con factores de ensamble de proteínas de la membrana externa (Yae/Omp85), participa en la secreción del dominio pasajero (Henderson *et al.*, 2004) (Fig. 1).

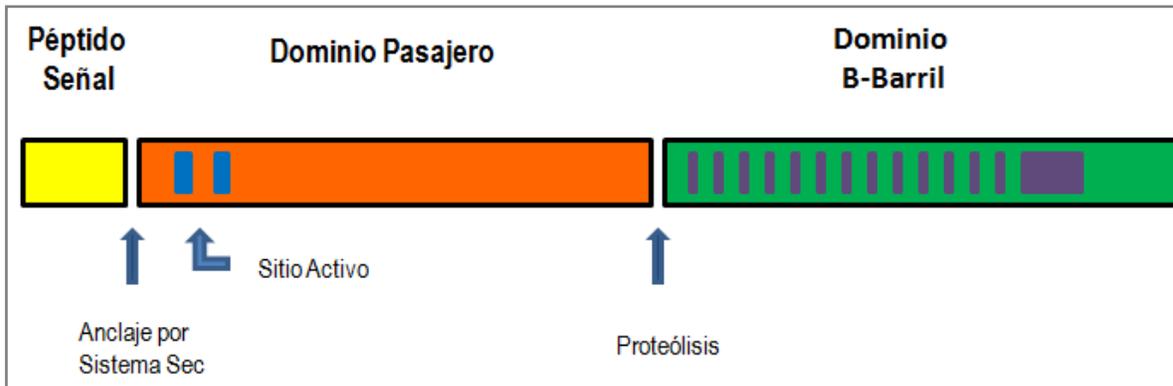


Figura 1. Modelo de una Serin Proteasa Autotransportada de Enterobacteriaceae (SPATE), con sus tres dominios característicos: Péptido señal (48-59 kDa), Dominio pasajero (<100 kDa) y Dominio β -Barril (277 kDa).

I.2.1 Sistema de secreción tipo V

El sistema de secreción Tipo V involucra la translocación del péptido señal de la proteína a través de la membrana interna por la vía del sistema Sec, posteriormente la proteína es ensamblada en la membrana externa y secretada al medio por la formación de un poro por el dominio del β -barril. (Figura 2).

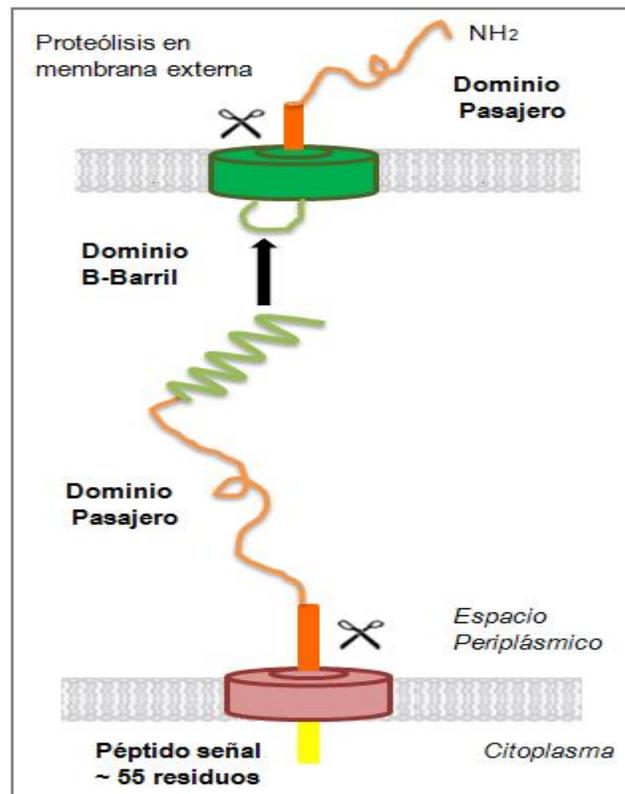


Figura 2. Sistema de secreción Tipo V, en el que intervienen los dominios: péptido señal, dominio pasajero y β -barril para el transporte de toxinas al medio. El Dominio Pasajero es transportado al espacio periplásmico a través del aparato Sec, posteriormente con ayuda de Proteínas Chaperonas se lleva a cabo el ensamblaje del β -Barril en la membrana externa, permitiendo la liberación de la Toxina (Dominio Pasajero) al medio.

La translocación de las SPATEs a la membrana interna por medio del aparato de secreción Sec se encuentra relacionado con el Péptido Señal del extremo Amino-terminal (motivo de 48-59 residuos de aminoácidos). El péptido señal interviene en la secreción pos-translacional de la proproteína. La extensión del péptido señal en la membrana interna previene el doblamiento en el espacio periplásmico, lo que podría interferir en el subsecuente transporte a través de la membrana externa.

Después de la translocación, el péptido señal es anclado y la proteína madura es transportada al espacio periplásmico, donde el dominio pasajero se encuentra en una conformación parcialmente doblada antes de la secreción a través de la membrana externa.

La región carboxilo terminal es doblada en el espacio periplásmico para obtener una conformación de β -barril, en ese caso es importante la presencia de proteínas chaperonas periplásmicas, se ha confirmado la presencia de éstas en proteínas diferentes a las SPATEs, específicamente éstas chaperonas reconocen la señal del carboxilo terminal en proteínas de membrana externa, las cuales son presentadas en el dominio translocador, por otro lado chaperonas específicas están involucradas directamente en el plegamiento periplásmico y la expresión de las SPATEs en la membrana externa.

Hasta el año 2011 se han caracterizado 15 SPATEs secretadas por *E. coli* y *Shigella* (Cuadro 2). De las cuales Sat, Vat, Tsh y Pic son secretadas por UPEC (Yen *et al.*, 2008).

Cuadro 2. SPATEs secretadas por *E. coli* y *Shigella flexneri*

Proteína	Microorganismo	Padecimiento	Función
AidA-B7A	ETEC	Diarrea	Desconocida
EatA	ETEC	Diarrea	Efecto citopático en células intestinales
EpeA	EHEC	Diarrea con sangre Colitis hemorrágica	Desconocido
EspC	EPEC	Diarrea	Enterotoxina
EspP	EHEC	Diarrea con sangre Colitis hemorrágica	Citotoxina
Pet	EAEC	Diarrea	Enterotoxina
Pic	EAEC, <i>Shigella flexneri</i>	Diarrea con sangre, shigelosis	Efecto citopático. Resistencia al suero, hemaglutinina
Pic U	UPEC	Infecciones de tracto Urinario	Proteasa
PssA	ETEC	Diarrea, daño renal	Citotoxina, Proteasa
Sat	UPEC	Infecciones de tracto Urinario	Citotoxina vacuolizante en riñón y vejiga
Sep A	<i>S. flexneri</i>	Shigelosis	Inflamación intestinal
SigA	<i>S. flexneri</i>	Shigelosis	Citotoxina
Tsh-APEC	APEC	Colibacilosis, septicemia	Hemaglutinina, adhesinas
Tsh-UPEC	UPEC	Infecciones de tracto urinario	Desconocido
Vat	APEC, UPEC	Colibacilosis, septicemia	Citotoxina vacuolizante

I.3 Sat (*Del inglés Secreted Autotransporter Toxin*)

Sat fue identificada por Guyer (1998), como una proteína de 107 kDa expresada en *E. coli* aislada de cultivos de sangre y orina de una paciente con pielonefritis aguda (*E. coli* CFT073), y se encuentra de manera predominante en *Escherichia coli* Uropatógena (Guyer *et al.*, 2000). El nombre de Sat (por sus siglas en inglés:

Secreted Autotransporter Toxin), le fue asignado por las actividades identificadas inicialmente para ésta proteína: actividad de serin-proteasa y actividades citotóxicas en células VERO y HK-2. (Guyer *et al*, 2002). Sat es miembro de la familia de las SPATEs, las cuales presentan tres dominios, un péptido señal de 49 aminoácidos, un dominio pasajero de 107 kDa en el cual se encuentra el motivo de serin proteasa (GDSGSG), el cual presenta una identidad del 63% con Pet (del inglés Plasmid Encoded Toxin): serin proteasa secretada por EAEC (Eslava *et al*, 1997), sin embargo no tienen la misma actividad. En la región carboxilo terminal se encuentra el dominio de β -Barril o translocón con un peso de 30 kDa (Henderson *et al.*, 2004).

El dominio pasajero de Sat, es la parte efectora que contribuye a la patogenicidad de UPEC, estudios al respecto, utilizando líneas celulares derivadas de vejiga (CRL-1749) y epitelio de riñón (CRL-1573), revelan que, la toxina tiene un efecto citotóxico sobre éstas líneas celulares, observando elongación de las células y aparente pérdida de funciones celulares, así como vacuolización del citoplasma en ambas líneas celulares (Guyer *et al.*, 2002).

En ratones infectados con la cepa CFT073, productora de Sat, se observaron cambios histológicos en riñones que indican disolución de la membrana glomerular y vacuolización de células del túbulo proximal (Guyer *et al.*, 2002). Estos estudios confirman que Sat produce daño en el epitelio del riñón durante infecciones de tracto urinario y que contribuyen a la patogénesis de estas infecciones (Guyer *et al.*, 2002).

I.3.1 Prevalencia de Sat en Cepas de *E. coli*.

Guyer y cols. en el año 2000 describieron inicialmente la presencia de Sat en muestras de *E. coli* Uropatógenas, el gen de Sat se encontró en el 55% de las *E. coli* aisladas de pacientes con pielonefritis y el 22% de muestras de origen fecal; hasta la fecha se han realizado múltiples estudios que confirman la prevalencia del gen de Sat, no sólo en UPEC, sino en diferentes patótipos diarreogénicos de *E. coli* (Taddei *et al.*, 2003), como EPEC (*E. coli* Enteropatógena), ETEC (*E. coli* Enterotoxigénica) y EAEC (*E. coli* Enteroagregativa), en este último patotipo Sat es más frecuente después que en UPEC, así como también en *Shigella flexneri* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Distribución de Sat en aislamientos de *E. coli* diarreogénicas.

Patotipo	Aislamientos	Muestras positivas (%)
EPEC	24	3 (12.5)
ETEC	28	1(3.5)
EAEC	24	8 (33.3)
No adherente	90	2 (2.2)

Este último hallazgo tomado de Taddei y cols. (2003), fue confirmado por Boisen y cols. (2009), utilizando PCR, PCR Monoplex y Multiplex para detectar la presencia de genes que correspondan a SPATEs en cepas de EAEC aisladas de muestras clínicas. Ellos encuentran el gen *sat* en un 75% de las cepas de EAEC analizadas, y el gen *pet* en un 9.1% de las cepas EAEC (Fig. 3). Pet es otra SPATE prototipo de EAEC y asociada a la patogenia de este grupo de *E. coli*.

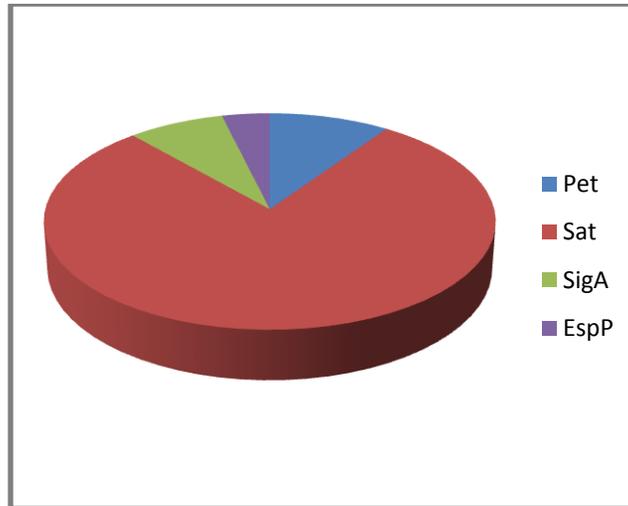


Figura 3. Frecuencia de Pet, Sat, SigA y EspP en muestras de *E. coli* Enteroagregativa

En otro estudio llevado a cabo en el laboratorio de Investigación Básica de la Facultad de Medicina, UNAM por Hernández-Chiñas y cols. (2009) encontraron la presencia del gen *sat* en un 27% de cepas EAEC aisladas de niños con diarrea.

Estos datos nos muestran que Sat es un marcador de virulencia de UPEC y EAEC, principalmente. La detección a tiempo de esta toxina puede determinar el uso de un tratamiento con antibióticos adecuados, ya que bacterias productoras de SPATEs se correlacionan con la persistencia de ITU. Phage Display es una metodología útil para la determinación de sitios inmunodominantes, el contar con anticuerpos específicos para Sat es un reactivo útil para su diagnóstico.

I.4 Phage Display

Es un sistema descrito por Smith en 1985, el cual se basó en la presentación de péptidos o proteínas a la superficie de bacteriófagos; con la realización de

estudios posteriores en la década de los 90 se ha permitido la aplicación de ésta metodología para el diseño de bibliotecas de péptidos que representan una fuente de secuencias para identificar sitios funcionales de diversos antígenos, modificaciones postraduccionales de diversas moléculas, y antagonistas de interacciones moleculares para la detección y tratamiento de agentes biológicos que constituyen problemas de salud pública, ya que son la causa de enfermedades que pueden prevenirse y tratarse al ser diagnosticadas oportunamente (Petrenko *et al.*, 2003).

Ésta técnica se basa en la bioselección *in vitro*, en la cual un péptido o proteína son fusionados genéticamente a proteínas de las superficie del fago filamentoso M13 (Smith y Scout, 1993). Esta fusión se lleva a cabo por el despliegue de un péptido o proteína en el exterior del bacteriófago, mientras que el ADN que codifica para la fusión se encuentra dentro del mismo fago. Esta fusión permite una rápida generación de moléculas-ligando expresadas sobre el fago, con altas afinidades de unión a un bajo costo y en poco tiempo (Santamaría, 2003).

I.4.1 Bacteriófago M13

Pertenece al género Inovirus, es el más comúnmente usado para la técnica de Phage Display. Mide aproximadamente 6.5 nm de diámetro y 930 nm de longitud, ésta constituido en un 87% de proteína (Fig. 4). Su genoma está constituido por una molécula de ADN de cadena sencilla, cerrado covalentemente, conformado

por 6400 nucleótidos. El ADN del fago se encuentra empaquetado por la proteína VIII, la principal proteína de la envoltura del fago (Santamaría, 2003).

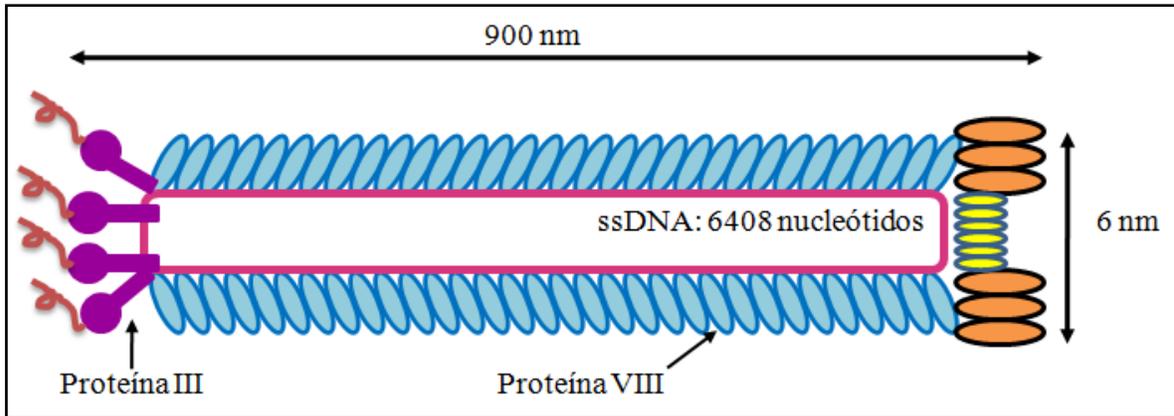


Figura 4. Modelo del Bacteriófago M13, en el cual se observan sus proteínas principales: la proteína VIII, donde se encuentra empaquetado el ADN y la proteína III a la cual se unen aminoácidos que generarán Péptidos Mimótopos.

Estos bacteriófagos utilizan el pili F de la bacteria *E. coli* como receptor para realizar el proceso de infección, éste proceso de infección productiva de los fagos M13 es de tipo lisogénico, debido a que el fago no lisa a la bacteria, esto facilita los procesos de obtención y purificación de las partículas virales (Santamaría, 2003).

I.4.2 Librería de Péptidos al Azar (*del Inglés Randomized Peptide Library*)

La mayoría de las librerías que existen en el mercado son de naturaleza universal, éstas pueden ser utilizadas para el mapeo de epítopes empleando anticuerpos monoclonales o policlonales, con los que se pueden seleccionar mimótopos de proteínas, carbohidratos e incluso lípidos, por lo que su aplicación es muy amplia

(Wang y Yu. 2004). Estas librerías además se pueden utilizar para la selección de agonistas y antagonistas, para identificar sustratos o inhibidores de enzimas, para el análisis de interacción proteína-proteína, así como en el diseño de anticuerpos catalíticos e incluso el desarrollo de vacunas (Bradkovic y cols. 2010).

En una Librería de péptidos al azar (RPLs), el número de aminoácidos de los péptidos fusionados al fago son variables (de 6 hasta 43 aa) y esto depende del número de oligonucleótidos constituidos por residuos al azar (X) codificado por un codón degenerado NNK o NNS (N=A, C, G o T; K= G o T; S= G o C), esto es para reducir la formación del codón de paro. En una librería de seis aminoácidos (X^6) son 64 millones de secuencias peptídicas diferentes codificadas por un billón de secuencias específicas NNK (Wang y Yu. 2004). La complejidad de la librería está restringida a aproximadamente de 10^9 a 10^{10} aminoácidos, principalmente por la limitada capacidad de transformación en *E. coli*. Los RPLs de péptidos largos en general son utilizados para el mimetismo de epítopes estructurales y los más cortos para formas no estructurales. En el caso de los péptidos cortos, se han introducido modificaciones como es el añadir cisteínas en los extremos, esto con el propósito de que se forme un asa (loop) que permita mimetizar epítopes estructurales (Hansson *et al.*, 1999).

Las bibliotecas de péptidos se han convertido en poderosas herramientas para la identificación de ligandos reconocidos por anticuerpos monoclonales y antisueros policlonales específicos de alguna infección o enfermedad (Petrenko *et al.*, 2003).

En el caso de enfermedades infecciosas las bibliotecas de péptidos han servido para desarrollar sondas que se utilizan en la detección de agentes biológicos tales como toxinas, bacterias, esporas y virus (Petrenko *et al.*, 2003).

I.4.3 Bioselección.

Una de las aplicaciones de este método es la selección de mimótopos de epítopes (biopanning o bioselección), donde se utilizan anticuerpos específicos de acuerdo a los pasos que a continuación se describen (Fig. 5) (Smith and Scout, 1993). El primer paso consiste en preparar la biblioteca primaria y proceder a exponer los fagos a la molécula blanco previamente inmovilizado (anticuerpo unido a una placa de ELISA). En la siguiente fase se procede a remover los fagos con baja afinidad al anticuerpo por medio de lavados (PBS-Tween). Posterior a la eliminación de los fagos con poca afinidad, se realiza la obtención de los fagos que se unieron al anticuerpo y realizar su amplificación en *Escherichia coli*. El último paso consiste en repetir el proceso (de tres a cuatro rondas), para que los fagos con secuencias peptídicas que presenten aminoácidos en común se incrementen (Smith and Scout, 1993).

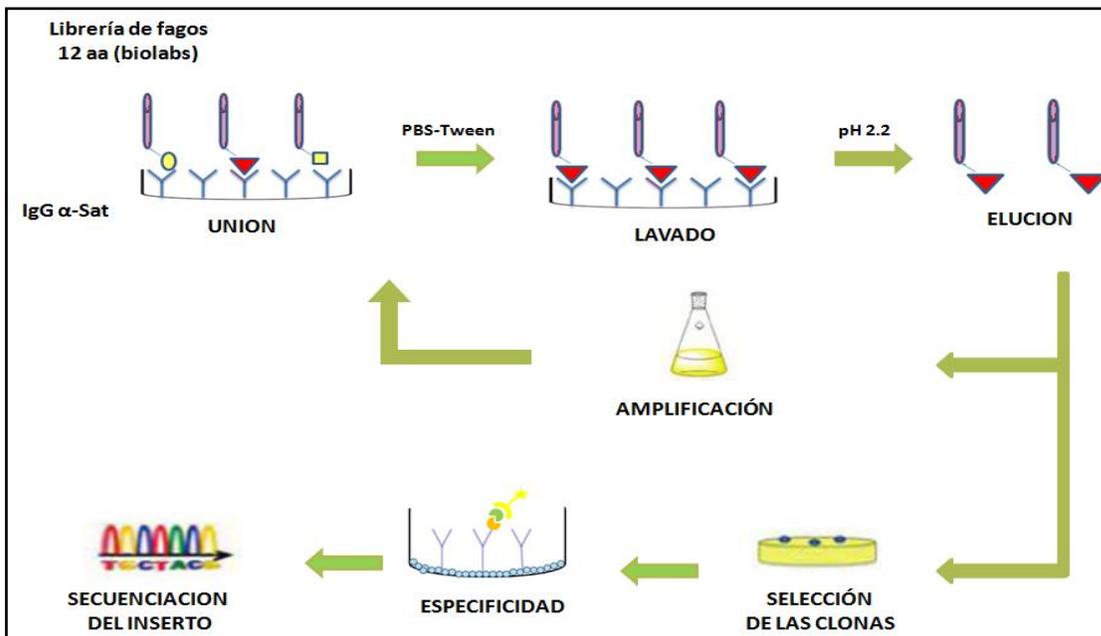


Figura 5. Biopanning en Phage Display. Esquema que ejemplifica la bioselección de Péptidos Mimótopos, en la cual una IgG es inmovilizada en una superficie, después de la adición e interacción con la Librería de Péptidos se realizan lavados para remover los fagos que no se unieron a la IgG, seguido de la elución de los fagos que expresan una secuencia inmunodominante y su amplificación. Este procedimiento se realiza 3 o 4 veces (rondas) para aumentar la especificidad de las clonas, posteriormente se seleccionan clonas individuales, para determinar su reactividad con la molécula selectora por ELISA y conocer su secuencia de aminoácidos a través de la secuencia de ssADN del fago.

I.4.4 Epítopes Discontinuos

Los sitios de unión del anticuerpo se encuentran en la superficie de la proteína, y generalmente no son una secuencia lineal continua, por lo contrario, los sitios de unión pueden ser secuencias de aminoácidos discontinuas, que pueden generar diversas estructuras, y que incluso si se conocen, y con ayuda de sistemas computacionales, pueden ser empleadas para generar modelos de estructura terciaria de las proteínas de interés.

Los anticuerpos son altamente específicos a la estructura de la proteína que reconocen y pueden ser reconocidos por epítopes continuos o discontinuos. Los epítopes discontinuos proveen información estructural que revela segmentos de la secuencia primaria que se encuentran en la conformación nativa de la proteína, (Padlan 1996) y además pueden revelar cambios estructurales de las proteínas durante su función, ya que pueden ser reconocidas de diferentes formas estructurales (Conte *et al.*, 1999). El método de Phage Display puede ser de utilidad para reconocer epítopes continuos y discontinuos de anticuerpos, y así obtener información de la estructura conformacional de las proteínas (Mumey *et al.*, 2003).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las Infecciones de Tracto Urinario son un problema de Salud Pública tanto en la comunidad como en infecciones intrahospitalarias, hasta el momento, el diagnóstico de laboratorio requiere por lo menos 48 horas para definir la etiología, lo que implica un retraso en el tratamiento, o la implementación de tratamientos erróneos que llevan a infecciones subsecuentes. Los datos epidemiológicos señalan a *Escherichia coli* Uropatógena, productora de Sat como uno de los principales agentes del padecimiento. Por lo expuesto anteriormente, resulta necesario contar con sistemas que permitan realizar el diagnóstico rápido y específico. El contar con anticuerpos específicos que identifiquen la presencia de Sat en muestras clínicas contribuirá a implementar un tratamiento adecuado poco tiempo después de la aparición del cuadro clínico, lo que de manera consecuente disminuirá las complicaciones de la infección por UPEC.

III. HIPÓTESIS

El método de Phage Display es un procedimiento que permite la detección de motivos inmunodominantes de Sat, Serin Proteasa Autosecretada por diferentes Enterobacterias, mismos que podrán utilizarse para la generación de anticuerpos específicos contra la proteasa.

IV. OBJETIVO GENERAL

- Determinar Motivos Inmunodominantes de la proteína Sat, empleando el método de Phage Display.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener anticuerpos policlonales anti-Sat en conejos.
- Evaluar la reactividad de los sueros anti-Sat con la proteína homóloga.
- Seleccionar fagótopos que expresan mimótopos (péptidos) de epítopes inmunodominantes de Sat.
- Obtener las secuencias de aminoácidos de los mimótopos seleccionados a partir de la secuencia del ADN de los fagótopos seleccionados.
- Obtener anticuerpos de las clonas que expresen mimótopos de Sat.
- Evaluar la reactividad de los anticuerpos anti-mimótopo contra la proteína Sat.

VI. MÉTODOS

VI.1 Obtención de la Proteína Sat

La cepa 49766 (O?:H10), productora de las toxinas Pic y Sat fue inoculada en Medio Luria (LB) con Ampicilina (100 µg/mL), incubada durante 24 h a 37°C, una vez obtenido crecimiento en las placas, se transfirió un inóculo a tubos con 3 mL caldo luria con ampicilina (100 µg/mL), incubando 4h a 37°C en agitación continua (200 rpm). Transcurrido este tiempo y obteniendo un crecimiento bacteriano, se transfirió un inóculo de 1 mL (0.1%) a matraces con 1L de Medio Luria con ampicilina a la misma concentración, incubando 18 hrs a 37°C, y agitación continua (200 rpm).

Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 12 000g (Sorvall RC), por 20 min a 4°C, el sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio al 60% (361 g de sal/litro), dejando en reposo la solución a 4 °C toda la noche. Transcurrido el tiempo, la solución se centrifugó a 12 000g (Sorvall RC), 20 min, 4°C con la finalidad de obtener las proteínas totales, el precipitado se resuspendió en 4 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.02M, pH 8.2, el excedente de sal fue eliminado por diálisis con la misma solución, por 2 días (4 recambios).

Las proteínas obtenidas fueron concentradas, utilizando unidades de filtración centrifugables con un punto de corte de 50 kDa (Millipore), utilizando una fuerza centrífuga de 3000 g (Sorvall RC) durante 15 min, 4°C, la muestra retenida por la membrana se transfirió a tubos eppendorf manteniendo las muestras a -20°C.

Electroforesis (SDS-PAGE).

Para evaluar la presencia de la proteína en las muestras, se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8%, en condiciones desnaturizantes, con 0.1% (P/V) de dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE), en presencia de β -mercaptoetanol (Laemmli, *et al.*, 1970). Con medidas de 6.5cm x 8.5 cm y 1mm de grosor. La separación de las proteínas se llevó a cabo con buffer de corrida, aplicando un voltaje de 120 V, (voltaje constante). Posteriormente el gel se tiñó con Azul de Comassie R (Bio-Rad, USA) por 15 min, y desteñido con Solución de Metanol/ácido acético 30%/10% (v/v). El perfil electroforético fue comparado con pesos moleculares de proteínas conocidas. (Page Ruler™ Plus prestained protein ladder, Fermentas®, USA)

Concentración de proteínas

La cuantificación de las proteínas presentes se realizó por el Método de Bradford: en tubos de microcentrifuga (1.6 mL) se colocaron, 2, 5, 10 y 15 μ L de la proteína, ajustando a un volumen de 800 μ L con agua destilada y a todas las muestras se

les adicionaron 200µL de Reactivo de Bradford (Bio-Rad, USA), el contenido se homogenizó en un vórtex y se incubaron a temperatura ambiente por 15 min. Transcurrido el tiempo, las muestras se transfirieron a celdas de plástico (Bio-Rad®) para determinar los valores de absorbancia en un espectofotómetro (Spectronic®) utilizando una longitud de onda de 595 nm.

Con los valores de absorbancia de las muestras se calculó la concentración de las proteínas en base a una curva patrón, realizada con albumina sérica bovina (BSA).

VI.2 Obtención de Anticuerpos anti-Sat

Antes de iniciar con el esquema de inmunización se evaluó la presencia de anticuerpos anti-Sat (en un ensayo de western-blot) en los conejos a emplear, para ello se tomó una muestra de sangre de 1.5 mL de la vena marginal de la oreja.

La fracción correspondiente a Sat (107 kDa) se identificó y fue extraída del gel, mezclándola con PBS estéril, hasta obtener una suspensión homogénea. Esta muestra fue inoculada vía intradérmica en conejos Nueva Zelanda (Bioterio CINVESTAV, IPN) de 2.5 Kg, administrando 5 dosis del inmunógeno, en periodos de 15 días. En la última dosis se realizó una sangría en la vena marginal de la oreja del conejo y se evaluó la respuesta del suero contra Sat, debido a que el título de anticuerpos fue alto, se procedió a sangrar a los conejos por punción cardíaca. Para activar los factores de coagulación, la sangre extraída se incubó 1h a 37°C, el suero fue obtenido mediante centrifugación a 2000g (Sorvall RT

6000D), 15 min a 4 °C, y conservado a -20°C hasta su uso. Como testigo negativo se utilizó el suero de conejo obtenido antes de la primera inmunización.

VI. 3 Evaluación de la reactividad de sueros preinmunes

Después de separar la proteína Sat por electroforesis (SDS-PAGE al 8%), se transfirió a una membrana de Nitrocelulosa (Millipore), (Towbin, 1979), empleando amortiguador Tris (0.25% P/V), glicina (1.2 P/V) y metanol (16.6% P/V), a 200 mA (Amperaje constante) durante 90 min. La transferencia de las proteínas se evaluó con el colorante Rojo de Ponceau (0.01%), que posteriormente fue eliminado con PBS. Los espacios libres en la membrana fueron bloqueados (5% P/V Leche descremada/PBS) durante toda la noche a 4°C, la membrana se lavó 3 veces (5 min c/u) con PBS-Tween 0.1% (v/v). Para determinar la presencia de anticuerpos, se adicionó el suero de los conejos en diluciones 1:50 y 1:100 en PBS-L y se incubó 1h a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados para eliminar el exceso de suero, y posteriormente se agregó IgG de conejo marcada con fosfatasa alcalina (Zymed[®], USA), a una dilución 1:3500, incubando 1h a temperatura ambiente, nuevamente se realizaron 3 lavados con las mismas condiciones. La reacción fue visualizada adicionando BCIP/NBT (Sigma Aldrich[®], USA).

VI.4 Titulación del suero Anti-Sat.

La obtención de anticuerpos anti-Sat se evaluó por western-blot (ver sección VI.3) utilizando diferentes diluciones del suero (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200). Para hacer la reacción visible se adicionó IgG de Conejo marcada con Fosfatasa alcalina (Zymed, USA) (1:3500), incubando 1h a 37°C y finalmente se adicionó el sustrato BCIP/NBT.

VI.5 Obtención de IgGs

Las IgGs presentes en el suero de los conejos fueron obtenidas utilizando una columna de afinidad de proteína G agarosa (Bio-Rad[®], USA) en base al método descrito por el proveedor con algunas modificaciones hechas por Gazarian y cols. (2000).

En microtubos de 1.6 mL se colocaron 250 µL de proteína G, se centrifugaron 30 seg. a 3 000 rpm, el sobrenadante fue desechado. La proteína G se equilibró con 1mL de Buffer de Unión, se mezcló manualmente para después centrifugar 30 seg. a 3000 rpm el sobrenadante fue descartado; este procedimiento se realizó tres veces.

Un volumen de 500 µL del suero se mezcló con 250 µL de la resina Proteína G-agarosa (Bio Rad) la muestra se incubo por 20 min. a Temperatura Ambiente (TA), realizando agitaciones en intervalos de 2 min.

Transcurrido el tiempo, los tubos se centrifugaron a 300 g, durante 30 seg, el sobrenadante fue descartado y el precipitado se lavó 5 veces con 1 mL de Buffer

de unión (Glicina 0.1 M, pH 9.0), centrifugando en cada lavado con las mismas condiciones empleadas hasta entonces. Las muestras se colocaron en hielo, para evitar la desnaturalización de las proteínas. El complejo formado Agarosa-Proteína G-IgG fue disociado con 1.5 mL de Solución Amortiguadora de elución (Glicina-HCl 0.1 M, pH 2.2), la mezcla se centrifugó a 500 g por 30 seg., el sobrenadante (IgG purificada) se ajustó a pH 8.0 con trisma base 2M (pH 9.1). Los eluidos se mantuvieron a -20°C para después ser liofilizadas. La pureza de las IgG obtenidas del suero se analizó por SDS-PAGE (15%).

VI.6 Titulación de fagos

Para la titulación de los fagos fue necesario:

- **Cultivo de *E. coli* ER2738 (New England Bio Labs).** Se Inoculó 5-10 mL de medio LB con la cepa de *E. coli* ER2738, el cultivo se incubó a 37°C por 18 hrs con agitación constante (220rpm).
- **Agarosa Top.** La Agarosa Top se fundió en el microondas y se dispensaron 3 mL en tubos de cultivo estériles que se mantuvieron a 45 °C. Un tubo por cada dilución del fago.
- **Placa de LB/IPTG-Xgal.** Las placas se pre-calientan a 37°C antes de utilizarse.
- **Diluciones del fago.** Se realizaron diluciones seriadas del fago en medio LB.

Para que se llevara a cabo la infección se mezcló 10 μ L de cada dilución con 200 μ L del cultivo de la cepa *E. coli* E2738, se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente por 1-5 min. (fig. 6).

Transcurrido el tiempo, se transfirieron las células infectadas a tubos de cultivo con agarosa top a 45°C mezclando por inversión e inmediatamente se vaciaron sobre las placas de LB/IPTG/Xgal precalentadas (Fig. 6). Solidificada la agarosa top, se invirtieron las cajas y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente se contó el número de unidades formadoras de placas, este valor se multiplica por el factor de dilución.

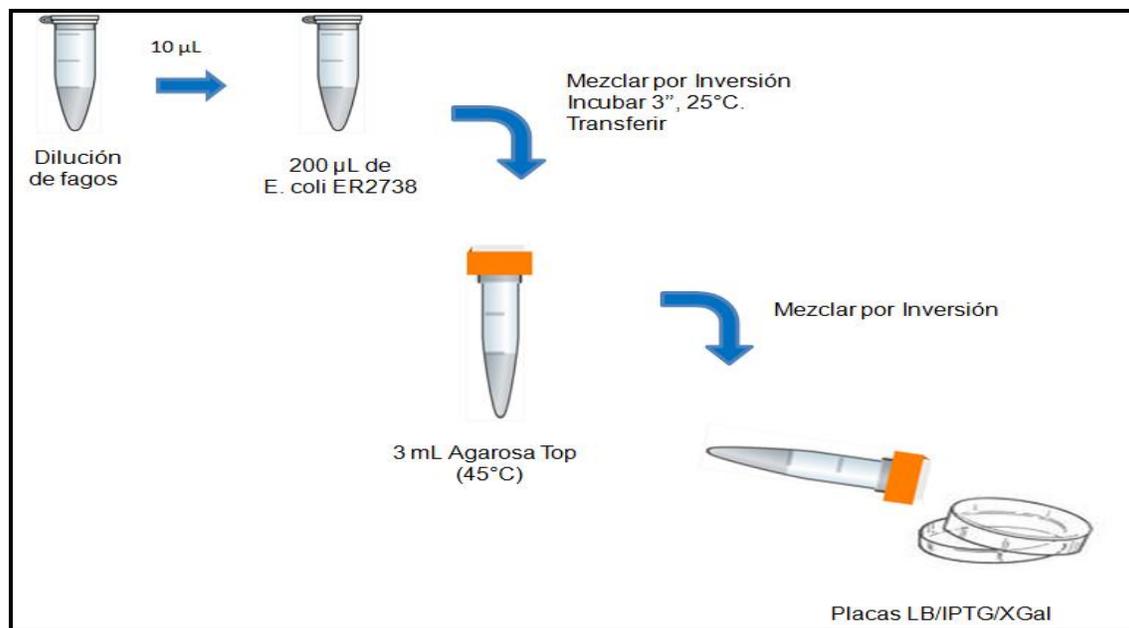


Fig. 6. Titulación de fagos. Los fagos M13 de la biblioteca (New England Bio Labs.) se amplificaron utilizando la cepa *E. coli* ER2738, y el número de unidades formadoras de placas se pudo visualizar sobre una placa de agarosa top/LB.

VI.7 Bioselección de Fagótopos

Para la Bioselección, se empleó una librería de péptidos lineales de 12 aminoácidos (Ph.D.-12™ Phage display Peptide Library Kit. New England Bio Labs. Inc. [Beverly, MA, USA]). Las secuencias de péptidos desplegadas al azar (2.7×10^9 transfectantes), están fusionadas a la proteína PIII del fago filamentoso M13 a través de un espaciador con los aminoácidos Gly-Gly-Gly-Ser. El procedimiento se llevó a cabo en base al Método descrito por Smith y Scout (1993).

A partir de una solución de 100µg/mL de IgG anti-Sat en 0.1M NaHCO₃ (pH 8.6), se adicionaron 150 µL a 2 pozos de una microplaca de poliestireno (MaxiSoport), la placa se cubrió y se colocó en una cámara húmeda para incubar toda la noche a 4°C con agitación suave.

Para eliminar las IgGs no adheridas a las placas, se realizaron 6 lavados con PBS-T (0.1%, V/V). Posteriormente se adicionaron 300 µL de buffer de bloqueo (PBS-1% BSA) a cada pozo, incubando 1h a 4°C sin agitación. La solución de bloqueo se descartó y se realizaron 6 lavados con PBS-Tween 0.1% (V/V).

Para la selección de los péptidos mimótopos, se agregó a un pozo 2×10^{10} unidades formadoras de placa (ufp) en 100 µl de PBS-T de la biblioteca original y 2×10^{10} ufp de la biblioteca amplificada previamente al otro pozo, la placa se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Para eliminar los

fagos que no se unieron, se realizaron 10 lavados a los pozos con PBS-T (0.1%, V/V).

La elución de los fagos unidos al anticuerpo se llevó a cabo adicionando 100 μ L de buffer de elución (glicina-HCl 0.1N pH 2.2). Los eluatos (fagos eluidos) se transfirieron a un microtubo de 600 μ L, neutralizando la muestra con 15 μ L de Tris-base 2M. La cuantificación de los fagos se realizó mediante la infección de la cepa ER2738 de *E. coli* por el método antes descrito (ver sección VI.6).

Para continuar con la segunda ronda, el eluato obtenido se amplificó de acuerdo al Manual Ph.D.-12TM de New England BioLabs, un 75% del eluato se agregó a 30 ml del cultivo ER2738 (en fase log temprana) y se incubaron a 37 °C con agitación vigorosa por 4.5 horas. Después de este tiempo el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 6000 g a 4°C (Sorvall RC), el sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar con las condiciones antes mencionadas para garantizar la eliminación de las bacterias. Todo el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, el cual contenía $\frac{1}{4}$ de volumen de 20% (V/V) de polietilenglicol (PEG) con 40% de NaCl (P/V) (PEG-NaCl); se agitó suavemente y se dejó precipitar a 4 °C durante toda la noche.

El precipitado obtenido se centrifugó durante 10 minutos a 6000 g, el sobrenadante se eliminó y el botón se resuspendió en 1mL de PBS para realizar una segunda centrifugación. El nuevo sobrenadante se volvió a precipitar utilizando $\frac{1}{4}$ de volumen de PEG-NaCl, después de mezclarlo se dejó precipitar en hielo durante una hora a 4 °C, nuevamente se realizó una centrifugación con las

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

VI.8 Selección de las clonas de fagos

Los fagos obtenidos en la cuarta ronda fueron cuantificados sin ser amplificados, para ello 10 µL del eluato se mezclaron con 200 µL de cultivo de noche de la cepa *E. coli* ER2738 por 3 minutos, esta mezcla se transfirió a 4 mL de agarosa top (55°C) y fue vaciada a cajas Petri con Medio LB/XGal/IPTG. Este procedimiento se realizó por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

De estos dos cultivos se seleccionaron al azar 18 ufp, con una punta estéril para micropipeta de 200 µL. Cada placa se colocó en un tubo con 3 mL de medio 2xYT, y 50 µL de cultivo en fase Log de la cepa *E. coli* ER2738. Incubando 4.5 h a 37°C y agitación constante (200 rpm). El cultivo se transfirió a microtubos de 1.7 mL y se centrifugó 30 seg. a 14 000g, el sobrenadante obtenido se transfirió a dos tubos, el primero, se empleó para purificar y mantener los fagos; el segundo para extraer el ADNss de las clonas seleccionadas.

VI.9 Extracción del ADN de las clonas de fagos

Al sobrenadante del cultivo de la cepa *E. coli* ER2738 infectada con una de las 18 clonas seleccionadas, se le agregaron 400 µL de PEG-NaCl y se incubó por 1h a 4°C para precipitar los fagos, transcurrido el tiempo, la mezcla se centrifugó por 10 min a 6 000 g 4°C, el precipitado se resuspendió en 100 µl de amortiguador de yoduro (1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 4M NaI), de inmediato se le adicionaron 250 µl de etanol absoluto, incubando 10 min a 4°C. Posteriormente la mezcla se centrifugó por 10 min, 4°C, el precipitado (ADNss) se resuspendió en 15 µL de agua inyectable (Sambrook *et al.*, 2001). Para visualizar el ADNss extraído, se sometió a un campo electroforético en un gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado en luz ultravioleta.

VI.10 Obtención de la Secuencia de Aminoácidos de los fagos seleccionados.

El ADNss de las 18 clonas seleccionadas al azar, se envió al Laboratorio de Análisis y Química del ADN en la Unidad UBIPRO de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México, para el servicio de secuenciación y análisis del ADNss. De manera general, para la obtención de la secuencia de nucleótidos, a las muestras se les realizó la reacción de secuencia con química BigDye V3.1, basada en la reacción de Sanger, en la cual se emplea una ADN polimerasa I para sintetizar una cadena complementaria a un templado de ADN de cadena sencilla. La polimerización inicia a partir de un extremo de un oligonucleotido iniciador de la secuencia (primer) apareado a la

cadena sencilla. Para la síntesis de la cadena complementaria se requiere de un iniciador (oligonucleótido sintético) y de la mezcla de los 4 dNTP más el análogo correspondiente para cada reacción. Con esto se producen términos de la cadena que esta sintetizándose y se generan fragmentos de distintos tamaños. Estos se resuelven en geles de Poliacrilamida-urea 8M. El método automatizado empleado en este caso, usa iniciadores con marcadores fluorescentes distintos unidos a los 4 iniciadores que indican las 4 reacciones (A, G, C y T) y cada uno con el análogo correspondiente. Entonces, todos los fragmentos que tienen incorporados los iniciadores pueden ser detectados simultáneamente con un láser que los hace emitir fluorescencia y ésta se detecta en un fotomultiplicador que lee directamente el paso de los fragmentos, acoplados a un computadora. La purificación del producto se llevó a cabo con columnas centri-sep y la lectura de la secuencia se realizó por electroforesis en secuenciador automático de capilares 3100 Genetic Analyzer. Estas secuencias se tradujeron a secuencia de aminoácidos mediante una tabla del código genético.

VI.11 Reactividad de las clonas de fagos

La reactividad de las clonas seleccionadas por biopanning con la IgG anti-Sat fue determinada mediante un ensayo de ELISA indirecto, se cubrieron los pozos de una placa de ELISA (Maxi Soport Costar) con 15 µg/mL de IgG anti-Sat en NaHCO₃ 0.1M (pH 8.6), la placa se incubó toda la noche a 4°C, al día siguiente se realizaron 2 lavados con PBS-Tween (0.5% V/V) (solución de lavado), posteriormente, para cubrir los espacios libres en la placa se adicionaron 250 µL de BSA en PBS (w/v), a una concentración de 5 mg/mL, incubando 1 h a 37°C.

Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS-Tween (0.5% V/V). Para después adicionar 1×10^{10} - 1×10^{11} ufp en 200 μ L de PBS, incubando 1 hora a 37°C, para eliminar la carga de fagos se realizaron 6 lavados con solución de lavado. La reactividad IgG-fago fue identificada con el anticuerpo anti-M13 obtenido en ratón (New England) a una dilución de 1:1000 con 1 h de incubación a 37°C. Después de 6 lavados con PBS-Tween (0.5% V/V) se adicionó, para evidenciar la reacción 200 μ L de IgG de ratón marcada con Fosfatasa alcalina en una dilución 1:1000, finalmente la cantidad de anticuerpo secundario unido fue estimado por la adición del sustrato de Fosfatasa Alcalina (Millipore) en Amortiguador de Dietanolamina incubando a 37 °C por 20 min., posteriormente se realizó la lectura de absorbancias a 405 nm en un lector de ELISA (MR580, Dynatech). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

VI. 12 Análisis de las Secuencias de Péptidos Mimótopos Seleccionados.

Las secuencias de aminoácidos obtenidas de las clonas de ambos lotes fueron alineadas contra la secuencia de la Proteína Sat, utilizando el programa BioEdit.

VI. 13 Modelo de Sat.

Este modelo fue desarrollado por el alumno de Doctorado Domingo Meza adscrito al Laboratorio de Salud Publica de la Facultad de Medicina de la UNAM mediante el programa TASSER disponible en el sitio web <http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/>

VI. 14 Obtención de anticuerpos anti-fagótopos

Para la obtención de anticuerpos dirigidos contra los fagótopos, se seleccionaron 3 clonas (Sat-A1, Sat-B17, Sat B18). Los fagos (10^{15} ufp) fueron diluidos en 100 μ L de PBS con adyuvante incompleto de Freud, la emulsión fue administrada vía intradérmica a conejos Nueva Zelanda de 2.5 Kg. Veinte días después de la primera inmunización se realizaron dos inmunizaciones cada 15 días con 10^{13} ufp de cada una de las tres clonas. En las dos últimas inmunizaciones se tomó una muestra de sangre de la vena marginal de la oreja del conejo, para valorar el título de anticuerpos. Dos semanas después de la última inmunización se realizó punción cardiaca a los conejos para la obtención de sangre. El suero de los conejos fue almacenado para su posterior evaluación. La reactividad de los anticuerpos anti-fagótopo contra la proteína Sat se observó por ensayos de ELISA y Western-blot (ver sección VI.6), utilizando siempre como control negativo el suero pre-inmune de los conejos.

VI.15 ELISA

La determinación de la reactividad de los anticuerpos contra la Proteína Sat, se realizó colocando 0.8 μ g/pozo de la proteína Sat purificada por métodos cromatográficos (Purificada previamente en mi servicio social en el Laboratorio de Investigación Básica del Departamento de Salud Pública. Fac. Medicina UNAM) en una placa de ELISA (High Binding, COSTAR), se incubó toda la noche a 4°C, transcurrido el tiempo, los espacios libres fueron bloqueados con BSA/PBS (1%, W/V), posteriormente, se colocaron los sueros obtenidos de los conejos en una

dilución 1:50, incubando 1 h a 37°C; se empleó como anticuerpo secundario IgG de ratón marcada con fosfatasa alcalina (Millipore), en dilución 1:10 000, para identificar la reacción antígeno-anticuerpo, usando las mismas condiciones de incubación, finalmente la reacción fue visualizada con el sustrato de la Fosfatasa Alcalina en Buffer de Dietanolamina en un lector óptico a 405 nm. Entre cada una de las etapas se realizaron lavados con PBS-Tween (0.1%).

VII. RESULTADOS

VII.1 Obtención y purificación de Sat

En este ensayo se identificó a partir del sobrenadante del cultivo de la cepa de *E. coli* enteroagregativa 49766 precipitado con sulfato de amonio al 60%, una fracción de proteína con un peso aproximado de 107 kDa (Fig.7). La identidad de la proteína Sat se realizó mediante un ensayo de western blot que se reveló con anticuerpos policlonales de conejo anti Sat y anti Pet, ésta última proteína con alta homología con Sat.

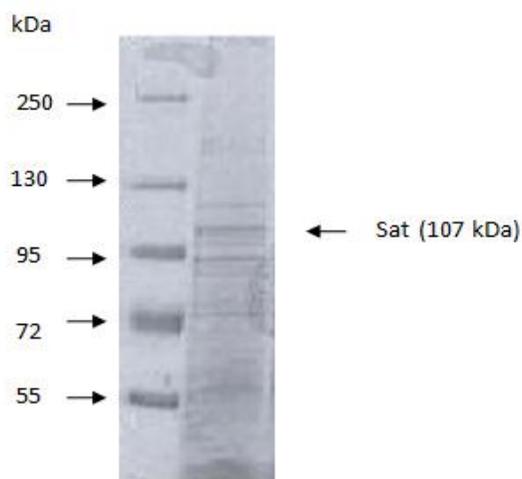


Fig. 7. Obtención de la Proteína Sat por precipitación con Sulfato de Amonio. La proteína se obtuvo a partir del sobrenadante del cultivo de la cepa 49766, precipitada con Sulfato de Sodio.

VII.2 Selección de conejos para la producción de anticuerpos anti-Sat.

Con el propósito de obtener IgG anti Sat en cantidad suficiente para realizar el estudio, se procedió a inmunizar conejos con la fracción de 107 kDa obtenida previamente. Por el método de Western-blot, se realizó un análisis previo del suero de ocho conejos para corroborar que no presentaban anticuerpos anti-Sat. Los resultados mostraron que todos los conejos estaban libres de anticuerpos contra la proteína Sat por lo que se eligió uno al azar para realizar la inmunización.

VII.3 Anticuerpos anti-Sat

Después de cuatro dosis se obtuvo el suero del conejo y por Western Blot se evaluó la reactividad de éste contra Sat, los resultados mostraron que el suero reaccionaba aunque con baja intensidad hasta una dilución de 1:1600.

VII.4 Obtención de IgG's anti-Sat.

Para los ensayos de biopanning se utilizó IgG anti-Sat, ésta se obtuvo a partir de la afinidad del anticuerpo a la proteína G acoplada a la agarosa, obteniendo 0.417 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, la presencia de las cadenas pesadas (50 kDa) y ligeras (25 kDa) de las Inmunoglobulinas se visualizaron por SDS-PAGE (Fig 8). La capacidad de las IgG para reconocer Sat se evaluó por Western blot, el resultado mostró reactividad contra Sat (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) incluso con una concentración de 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la inmunoglobulina. Al igual que con el suero completo, se observó reconocimiento de una fracción de aproximadamente 100 kDa, tal hecho sugiere que se trata de un fragmento de degradación de la misma proteína Sat (Fig. 9).

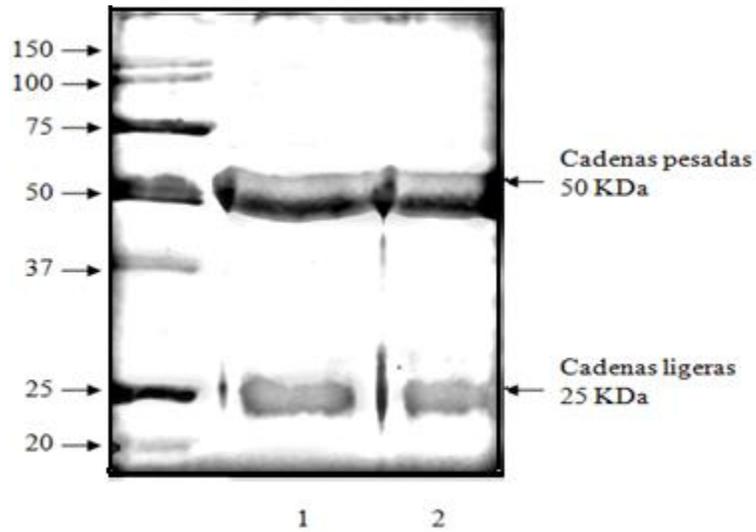


Fig. 8. Purificación de IgG's anti-Sat. El eluido de la cromatografía de afinidad (Proteína G-agarosa) se sometió a un campo electroforético en SDS PAGE (12%), en el se observan las cadenas pesadas y ligeras de las Inmunoglobulinas, con pesos moleculares de 50 kDa y 25 kDa respectivamente.

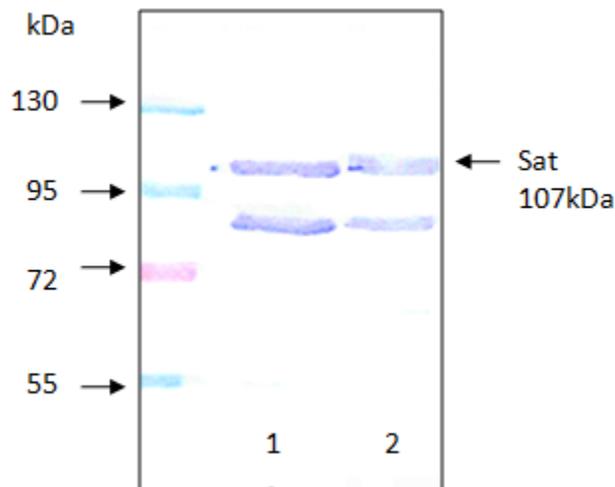


Fig. 9 Reactividad de las IgG's anti-Sat obtenidas en conejo. Se utilizó una concentración de 20 μg de proteína total en cada carril, la IgG anti-Sat se ajustó a 4.0 μg (1:100) y 2.0 μg (1:200) y la reacción se visualizó utilizando anti IgG de conejo marcada con fosfatasa alcalina. Carriles 1 y 2, respuesta con la concentración de 4 μg y 2 μg de IgG respectivamente.

VII.5 Selección de Mimótopos de Sat

Con las IgG anti Sat purificadas se realizaron cuatro ensayos de bioselección de mimótopos, después de la cuarta ronda se cuantificaron los fagos y se obtuvieron concentraciones de 10^4 y 10^5 ufp con las bibliotecas Ph.D 12 mer y Ph.D 12 mer amplificada (ver material y métodos) respectivamente (cuadro 4). De cada una de las bibliotecas se seleccionaron 18 fagos (placas), cada uno de ellos se amplificó (propagó) por separado para realizar los estudios posteriores.

Cuadro 4. Títulos de Fagos presentes en los eluidos de las Rondas de la Bioselección

Ronda de Bioselección	Eluido (ufp/mL)	
	Biblioteca Original Ph. D 12 mer A	Biblioteca amplificada Ph. D 12 mer B
1	-	1×10^4
2	1×10^4	1×10^5
3	1×10^5	1×10^5
4	1×10^4	1×10^5

VII.6 Antigenicidad de los Fagótopos Seleccionados.

Cada fago se etiquetó con un número consecutivo y una letra (A y B) la letra “A” se le asignó a los fagos obtenidos con la biblioteca Ph.D 12 mer (A1, A2, A3, etc.) y “B” a los seleccionados de la biblioteca amplificada (B1, B2, B3, etc). Las 36 clonas se analizaron individualmente para evaluar su reactividad contra el anticuerpo anti-Sat, los resultados muestran que aunque las 36 clonas reaccionaban las lecturas de DO eran diferentes. Al respecto, cuando se consideró un valor superior a 0.5, 13 de las clonas A y 15 B mostraron respuesta positiva con las IgG de conejo anti-Sat. Sin embargo, cuando el criterio de lectura fue superior

a 1.0 DO, solo dos (A1 y A11) de la primera biblioteca y tres (B5, B17 y B18) de la biblioteca amplificada mostraron reactividad con las IgG anti Sat (Fig.10).

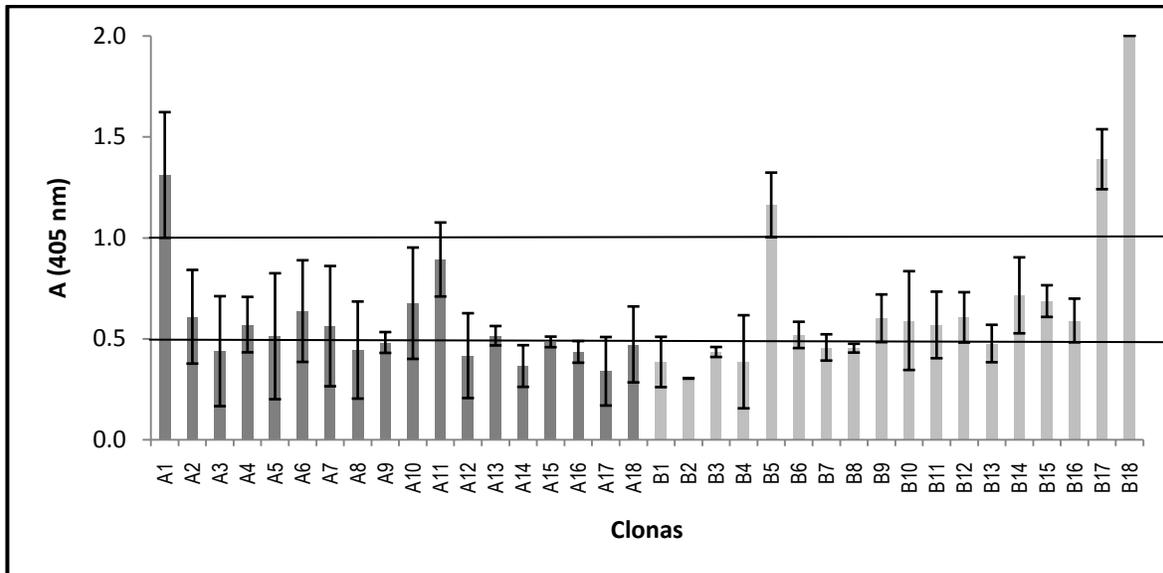


Fig. 10. Reactividad de los fagótopos seleccionados en la cuarta ronda del Biopanning. En el ensayo de ELISA se utilizó la IgG anti-Sat a una concentración de 0.8 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ y 1×10^{12} fagótopos. La reacción se visualizó con un anticuerpo monoclonal anti-M13 y como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcada con Fosfatasa Alcalina a una dilución de 1:1000. Las barras oscuras corresponden al ensayo utilizando la biblioteca Ph.D 12 mer y las barras claras con la biblioteca Ph.D 12 mer amplificada.

VII. 7 Extracción del ADN de Fagótopos seleccionados.

Para conocer la secuencia de aminoácidos de los péptidos fusionados a la proteína III de cada fagótopo, se realizó la extracción de ADNss de las 36 clonas seleccionadas. Al evaluar por electroforesis en gel de agarosa la presencia del material genético, solo en 26 (72%) de las muestras se observó una banda de 6400 pb que corresponde al ADNss del fago M13.

VII. 8 Secuencia de Aminoácidos de los Péptidos Mimótopos.

El ADN de las 26 clonas referidas se envió a secuenciar y con estas se realizó la traducción para conocer los aminoácidos que conformaban a los péptidos mimótopos. El análisis de 13 de las secuencias obtenidas de las clonas del grupo A, mostró en 7 de ellas (53.8 %) la secuencia PxAID (prolina, cualquier aminoácido, alanina, isoleucina y ácido aspártico). Las secuencias de las otras 6 clonas aunque, no fueron compartidas entre ellas, la mayoría presentaba los aminoácidos prolina, leucina, serina y asparagina (Cuadro 5).

Cuadro 5. Secuencias de aminoácidos de los péptidos obtenidos en las clonas de la biblioteca original Ph. D 12 mer, así como su frecuencia y valor de reactividad por ELISA.

Clonas	Secuencia de aminoácidos de los péptidos	Frecuencia	ELISA
A5, A6, A8, A15, A16	M S P F A I D L T M V S	5/13	0.636±0.252
A10	G S P K P K A I D S Y H	1/13	0.675±0.276
A2	R P L W S A I D R P G	1/13	0.608±0.232
SECUENCIA COMUN	P A I D - x	7/13	
A1	L K G G N H I N L P S T	1/13	1.311±0.975
A3	N P S W Q K L N A P Q T	1/13	0.438±0.272
A4	A D T Y N I L T W L S Q	1/13	0.569±0.137
A7	L L L S P P I S P S S N	1/13	0.562±0.298
A9	L P F Y A L V N S Q S T	1/13	0.481±0.052
A18	N R S M T V K N L S P Q	1/13	0.471±0.188

Con relación a las secuencias obtenidas del ADNss de las clonas del grupo B, en tres de ellas (23 %) se obtuvo la secuencia SPFAID (Cuadro 6), que es similar a la secuencia compartida entre diferentes fagos del grupo A (Cuadro 5). Por otro lado

la clona B15 con la secuencia DLKAGV**SPDISL** presenta aunque no con la misma distribución los aminoácidos SPDI identificados en las clonas B5, B17 y B6. Al evaluar con el anticuerpo anti Sat la antigenicidad de las clonas con secuencias comunes, se observó que las 7 clonas del grupo A con la secuencia PXAID daban una lectura promedio de 0.6 DO. Sin embargo, resulto interesante observar que la clona A1 con la secuencia LKGGNHINLPST, dió una lectura de 1.3 DO que fue de las más altas (Cuadro 5, fig. 10). El mismo análisis con las clonas del grupo B que presentaron una secuencia compartida mostraron lecturas de 1.3 DO (B5 y B17) y 0.6 DO (B6 y B15), al igual que lo observado con las clonas del grupo A dos clonas del grupo B (B16 y B18), que no tenían la secuencia compartida presentaron las lecturas de DO más altas (Cuadro 6, fig. 10).

Cuadro 6. Secuencias de aminoácidos de los péptidos obtenidos en las clonas de la biblioteca propagada Ph. D 12 mer Grupo B, así como su frecuencia y valor de reactividad por ELISA.

Clonas	Secuencia de aminoácidos de los péptidos	Frecuencia	ELISA
B5 y B17	M S P F A I D L T M V S	2/13	1.391±0.861
B6	L Q S P F A I D F S T N	1/13	0.518±0.065
B15	D L K A G V S P D I S L	1/13	0.686±0.078
SECUENCIA COMUN	S P F A I D	4/13	
B2	Y A D L L Q P F G V D V	1/13	0.303±0.001
B3	L K G G N H I N L P S	1/13	0.434±0.025
B4	P Y F S Y H S N I S P Q	1/13	0.385±0.231
B7	K D S V R T R K D P V R	1/13	0.456±0.065
B9	L Q P V A T A K D P V W	1/13	0.601±0.118
B12	N P K V L N T I L T P Q	1/13	0.605±0.124
B14	W I W W N A E T P P V	1/13	0.714±0.188
B16	P F Q W T S T N M T P Q	1/13	1.333±0.943
B18	H P S T R P P L V G D N	1/13	2.00±0.000

VII.9 Alineamiento de las Secuencias de aminoácidos obtenidas en los fagótopos seleccionados contra las reportadas para diferentes SPATEs.

Como ya se hizo referencia al analizar las secuencias de aminoácidos de las clonas se encontró que en varias de estas (A5, A6, A8, A15, A16, B5 y B17) se identificó la secuencia **MSPFAIDLTMVS** en todas ellas, dicha observación sugiere que el péptido seleccionado es mimótopo de un sitio inmunodominante de Sat. Para corroborar nuestra hipótesis se realizó el alineamiento de la secuencia (**MSPFAIDLTMVS**), sobre la secuencia lineal reportada para Sat y otras SPATEs. El resultado mostró que en Sat la secuencia **AIDLTM** se localiza entre los aminoácidos 553 a 570, 756 a 765 en el dominio pasajero y 1182 a 1188 en el translocón (Cuadro 7), asimismo la secuencia **DLTM** se identificó en Pet, en los aminoácidos 1180 a 1191 que corresponden a la misma ubicación que presentan en Sat. Con respecto a la SPATE SigA el mismo motivo (**LDLFTGLTM**) se localiza en el dominio de β -barril o translocón de la proteína, aunque, el primer aminoácido de este motivo es sustituido por una isoleucina, cabe señalar que ambos son aminoácidos alifáticos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Ubicación del motivo AIDLTM obtenido en la secuencia de aminoácidos de las clonas A5, A6, A8, A15, A16, B5 y B17, presente en las de diferentes SPATEs.

		Secuencia de aminoácidos															
Secuencia consenso		M	S	P	F	A	I	D					L	I	M	V	S
SPATEs																	
Sat	⁷⁴⁸ Q N S M F T T K G I D I S G E L I M M G ⁷⁶⁷																
	⁵⁵³ A K L I L D G S V E V S N A S L I M Q G ⁵⁷²																
		¹¹⁸⁴ W K D Q G M N L I M K D ¹¹⁹⁵															
Pet		¹¹⁸⁰ W K D Q G M N L I M K D ¹¹⁹¹															
SigA		¹⁰⁶⁰ G L D L F T G L I M T Y ¹⁰⁷¹															

Previamente se hizo referencia que la clona del fago A1 no presenta una secuencia de aminoácidos compartida con otras clonas, y que en el ensayo de ELISA indirecta dio una lectura de DO de las más altas (Cuadro 5 y Fig. 10). Al analizar en el ensayo de alineamiento la secuencia LKGGNHINLPST que presenta dicha clona (A1), se identificó que el motivo LxGGN se localiza tanto en Sat como en Pic (Cuadro 8). El mismo análisis pero con la clona B18 que también mostró una reactividad alta (2.0 DO) contra las IgG anti Sat (Cuadro 6), se identificó que la secuencia HPSTRPALVGDN presenta los aminoácidos GDN, al realizar el análisis de alineamiento contra diferentes SPATEs, se observó que estos se encuentran en 8 de 20 de las secuencias de SPATEs analizadas incluyendo a Sat (Cuadro 9). Sin embargo, dicho motivo (GDN) no se puede considerar mimótopo

de un epítipo de Sat y de otras SPATEs, ya que existe el criterio que define que un epítipo debe estar integrado por un mínimo de 5 aminoácidos.

Cuadro 8. Motivo LXGGN presente en la secuencia de aminoácidos de la clona A1 identificada en Sat y Pic.

Toxina	Secuencia consenso											Clonas	
Péptido Mimótopo	L	K	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	H	I	N	L	P	S	T	A1
Sat	⁷⁸⁹ L	S	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	A	N	F	I	A	R	⁸⁰⁰ N	
Pic	¹⁰⁵⁵ T	S	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	T	K	W	I	L	D	¹⁰⁶⁷ G	

Cuadro 9. Motivo GDN, obtenido en la secuencia de aminoácidos de la clona B18, presente en diferentes SPATEs.

Toxina	Dominio Pasajero	Dominio β-Barril
Péptido Mimótopo	HPSTRPPLVGDN	
Clona B18		
Sat		⁸⁷⁸ TKDSMVRFT <u>GDN</u> ⁸⁸⁹
Pic	⁴⁰⁸ VTWKVNGV <u>GDN</u> ⁴¹⁹	⁸⁵⁵ YLTGDGYDLT <u>GDN</u> ⁸⁶⁷
Tsh	⁴⁰⁹ VNWQVNGVK <u>GDN</u> ⁴²⁰	¹³³⁷ YGVGLNARFGDN ¹³⁴⁸
Hbp	⁴⁰⁹ VNWQVNGVK <u>GDN</u> ⁴²⁰	
SepA	⁴¹³ VLWQVNGV <u>GDN</u> ⁴²⁴	
SigA	³⁸² VEWNVKGV <u>GDN</u> ³⁹³	
EspC	³⁷⁹ TFKGAGLDI <u>GDN</u> ³⁹⁰	
	³⁹³ VDWNVKGVV <u>GDN</u> ⁴⁰⁴	
Vat	⁴⁰⁸ VNWQVNGVK <u>GDN</u> ⁴¹⁹	¹³³⁷ YGVGLNARFGDN ¹³⁴⁸

VII.10 Ubicación de los mimótopos identificados sobre un modelo tridimensional de Sat.

Un modelo tridimensional de la proteína Sat diseñado por el programa TASSER elaborado por un integrante del laboratorio y el cual tomo como molde la estructura descrita para la hemoglobin proteasa (Otto y cols 2005), se identificó que el motivo AIDLTM, identificado en diferentes fagótopos (Cuadros 5, 6 y 7), se ubica en dos asas de la estructura de hélice β de la proteína Sat (Figura 11).

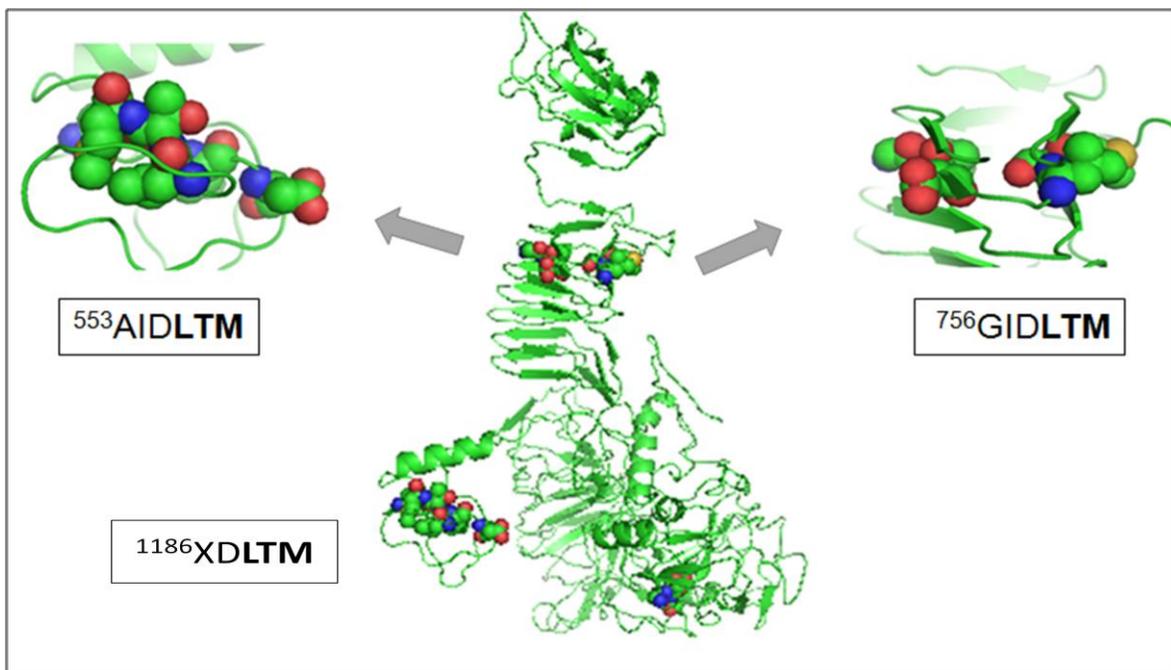


Figura 11. Modelo Tridimensional de la Proteína Sat. A). Se muestra con esferas de colores la localización en dos partes del Dominio Pasajero de la Proteína, del Péptido AIDLTM (Mimótopo) localizado en las posiciones 563 y 756 de la proteína Sat, identificado en diferentes fagótopos (Cuadro 7).

VII. 11 Anticuerpos anti-Mimótopos

Para corroborar que los motivos LKGGNHINLPST (Clona A1), MSPFAIDLTMVT (Clona B17) y HPSTRPPLVGDN (Clona B18), correspondían a mimótopos de epítopes inmunodominantes de Sat se inmunizaron conejos con cada una de las clonas y se evaluó la reactividad de los sueros contra Sat. El suero de los tres conejos analizado por un ensayo de ELISA mostró que el suero del conejo inmunizado con la clona de fago B17 dio una respuesta intensa incluso a partir de la primera dosis de inmunización (Fig. 12). Con respecto a los sueros obtenidos con A1 y B18, la reactividad del suero de la clona A1 después de la tercera dosis fue cuatro veces menor que la obtenida en el mismo lapso con B17. El mismo ensayo con los anticuerpos de la clona B18 mostraron una reactividad dos veces menor que la obtenida con B17.

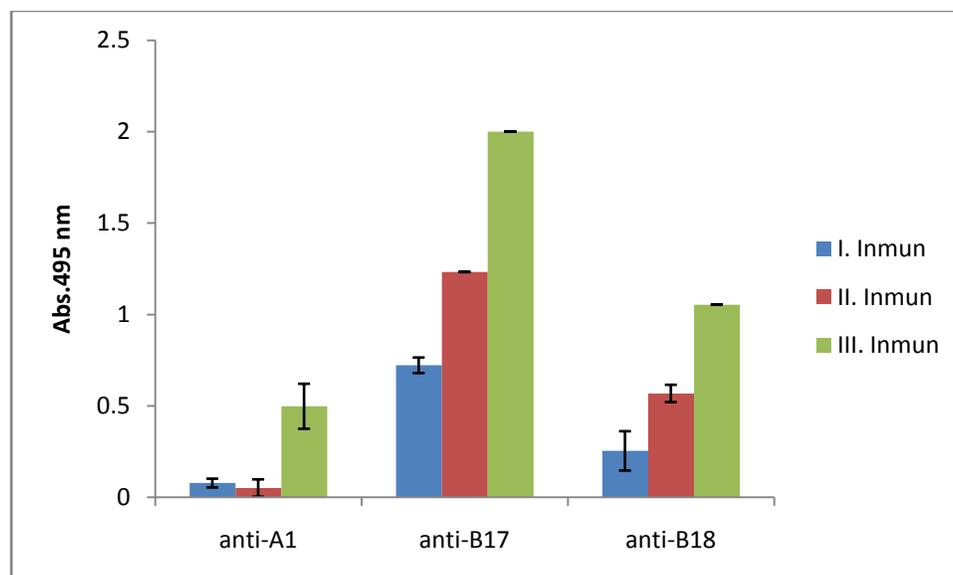


Fig. 12 Reactividad de sueros anti-fagotópos (A1, B17 y B18) contra la Proteína Sat. Respuesta obtenida por ELISA para cada una de las inmunizaciones, el valor de suero preinmune para cada clona fue restado de las muestras para sus respectivos valores de densidad óptica a 405 nm .

VII. 12 Reactividad de los sueros antimimótopos contra tres diferentes SPATEs

Se evaluó por ensayo de western blot la especificidad de los sueros contra las proteasas Pet, Pic y Sat, los resultados mostraron que los anticuerpos anti- B17 reaccionaron con fracciones purificadas de las proteínas Pic (110 kDa) y Sat (107 kDa), en el ensayo se observó además que estos reconocían una banda de 90 kDa, resultado similar al que se observó con el suero de conejo anti-Sat (Figs. 13 y 14). Con respecto a la respuesta del suero del conejo inmunizado con la clona B18, éste mostró reacción en la región del peso molecular de las proteínas Pic y Sat, así como con la fracción de 80 kDa identificada por el suero de las clona B17 (Fig. 14). Con respecto a la respuesta del suero del conejo inmunizado con la clona A1, este no reaccionó con ninguna de las tres proteasas, sin embargo, reconoció la fracción de 80 kDa identificada por los sueros anti B17 y anti B18 (Fig. 14).

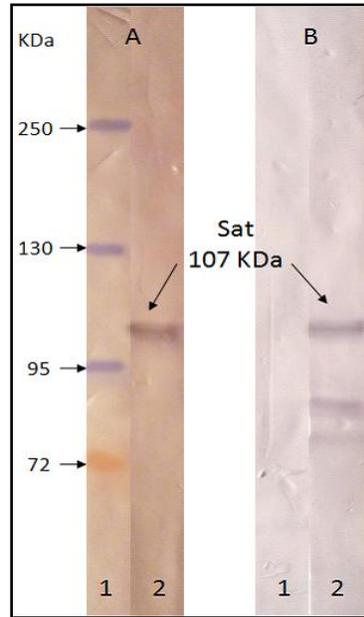


Fig. 13 Respuesta del suero anti-B17 contra Sat. Western Blot revelado con IgG purificada del suero anti-B17, la reacción se hizo evidente utilizando anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa. Carriles: A) IgG anti-Sat (1:200); B2) Suero anti-B17 (1:200).

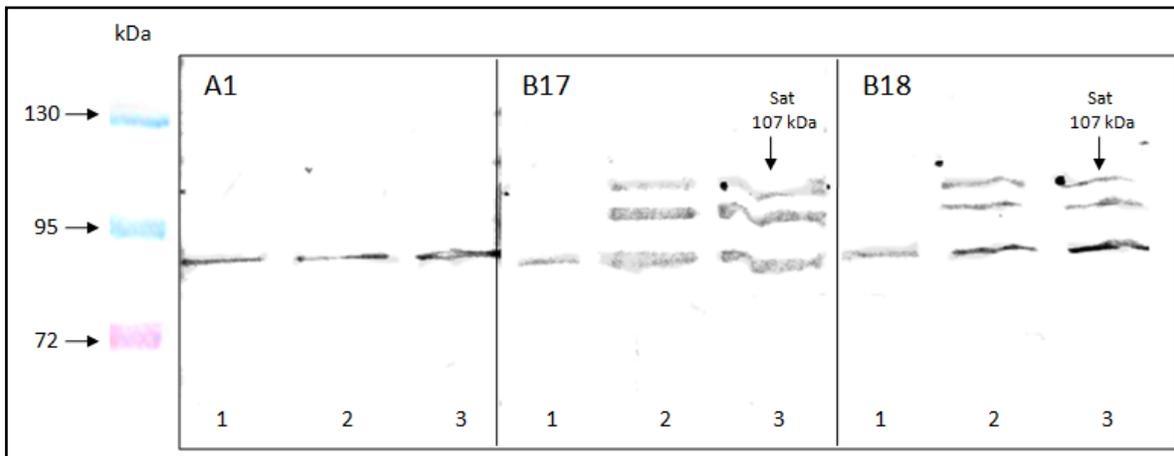


Fig. 14. Reactividad de los sueros anti-fagótopos (A1, B17 y B18) contra las proteínas Pet, Pic y Sat. Ensayo de Western Blot para visualizar la reactividad de los sueros antifagótopos A1 (LKGGNHINLPST), B17 (MSPFAIDLTMVT) y B18 (HPSTRPPLVGDN) contra las proteínas Pet (carril 1), Pic (carril 2) y Sat (carril 3). Todos los sueros anti-fagótopos se utilizaron a una dilución 1:200. La visualización se realizó utilizando anti IgG (1:1000) de conejo marcada con peroxidasa y revelando con (Rojo de Ponceau).

VIII. DISCUSIÓN

Sat es un miembro de las SPATEs identificada originalmente en *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) cuyo gen (*sat*) se localiza en la isla de patogenicidad II (PAI-II_{CFT073}) de la cepa CFT073 (Guyer *et al.*, 2000). El gen de Sat, ha sido identificado por métodos moleculares principalmente en cepas UPEC (Guyer y cols. 2002, Greta y cols. 2010), aunque, recientemente se ha mostrado su presencia tanto en cepas de *Shigella* (Roy *et al.*, 2006), como en *E. coli* enteroagregativa (Boisen *et al.*, 2009).

Algunas de las propiedades biológicas de Sat se han relacionado con el motivo de serina (Dutta *et al.*, 2002, Maroncle *et al.*, 2006), sin embargo, en otras más que participan con la virulencia de UPEC, EAEC y *Shigella* (Guyer *et al.*, 2002, Boisen *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2006), los motivos implicados aún no han sido identificados.

En un estudio previo realizado por Hernández-Chiñas y cols. (2009), utilizando el método de Phage Display identificaron en Pet SPATE con alta identidad con Sat, algunos motivos no relacionados con el de serina que participan en la inducción de propiedades biológicas relacionadas con la patogénesis de EAEC.

En este trabajo con el procedimiento de Phage display, se realizó la selección de fagos que expresaban péptidos mimótopos (fagótopos) de epítopes inmunodominantes de Sat. Para la detección de epítopes se emplearon anticuerpos policlonales obtenidos en conejos, contra la proteína Sat purificada. Con estos anticuerpos se procedió a realizar la bioselección de epítopes inmunodominantes de Sat, para tal efecto se emplearon dos bibliotecas de péptidos (Ph.D 12mer [A] y Ph.D 12mer previamente propagada en *E. coli* ER2738 [B]) a partir de las cuales se seleccionaron 18 clonas al azar de cada ensayo (A y B). Las 36 clonas de fagos seleccionadas fueron evaluadas en relación a la reactividad que presentaban contra la IgG anti-Sat utilizada en la bioselección, los resultados mostraron que la mayoría de las clonas reaccionaban fuertemente con el anticuerpo, aunque cuatro de ellas (A1, B5, B17 y B18) mostraron una reactividad mayor evaluada esta por los valores de DO obtenidos (Fig. 10). Otros trabajos de Phage Display, utilizando anticuerpos policlonales han seleccionado clonas que presentan mimótopos de epítopes (Hernández Chiñas y cols, 2009, Gazarian KG y cols, 2000, Palacios-Rodríguez y cols, 2007).

Con el propósito de conocer la secuencia o secuencias de aminoácidos de los péptidos mimótopos de Sat seleccionados, se realizó la extracción y secuenciación del ADNss de las 36 clonas de fagos (Hernández Chiñas y cols, 2009, Gazarian KG y cols, 2000, Palacios-Rodríguez y cols, 2007). Sin embargo sólo se pudo obtener la secuencia de 26 de las clonas (72%). El motivo de la falla con 10 de las clonas fue debido a una deficiente propagación de los fagos y de manera consecuente a una cantidad menor del material genético a la requerida

para realizar la secuenciación del mismo (200 ng/mL). La diferencia puede estar relacionada con situaciones técnicas como pueden ser la calidad del ADN molde, la baja propagación del fago asociado al crecimiento de la bacteria o la recuperación del fago después de la precipitación con polietilenglicol. No obstante el resultado es satisfactorio, ya que la mayoría de los autores recomiendan la selección al azar de entre ocho y diez clonas de fagos para realizar la secuenciación del material genético. En el trabajo el hecho de haber incrementado el número de clonas (18) seleccionadas en cada grupo (A y B), nos permitió obtener resultados de acuerdo a lo reportado por otros autores que han utilizado el método de Phage Display (Hernández Chiñas y cols, 2009, Gazarian KG y cols, 2000, Palacios-Rodríguez y cols, 2007).

La traducción de la secuencia de ADNss a la de aminoácidos de los péptidos mimótopos seleccionados, mostró que 11 (42.3 %) de ellos presentan la secuencia consenso **PxAID**. El análisis de los resultados al considerar la biblioteca de fagos empleada mostró que siete correspondían a la biblioteca Ph.D. 12 mer original (A) y cuatro a la amplificada (B) previamente (Cuadros 5 y 6). La diferencia en el número de clonas que mostraron la secuencia consenso en los ensayos A y B probablemente se debe a que en la Biblioteca que se propaga antes de realizar la selección (ensayo B), existe una mayor diversidad de clonas disminuyendo el número de clonas con secuencias comunes.

De las 11 clonas con la secuencia consenso **PxAID**, siete de ellas corresponden al mismo fagótopo, lo anterior se concluye en razón de que presentan un péptido con la misma secuencia (**MSPFAIDLTMVS**). Al realizar el análisis entre el ensayo A y

B, encontramos que cinco (39%) de las clonas del ensayo A (A5, A6, A8, A15 y A17) y dos (16%) del B (B5 y B17) presentaban dicha secuencia (Cuadros 5 y 6). Esta observación confirma que es más conveniente utilizar la biblioteca con fagos sin amplificar previamente (ensayo A), que la amplificada (ensayo B). Una recomendación hecha por el Manual Ph.D.-12 TM (New England Biolabs), es que se realice la secuenciación de las clonas obtenidas en la tercera y cuarta ronda de selección (biopanning), en este trabajo utilizamos cuatro rondas debido a que cuando se analizaron las secuencias de las clonas obtenidas en la tercera ronda de selección, no se obtuvo una secuencia consenso. Esta observación ha sido reportada en otros estudios en los que sólo han podido tener clonas con secuencias compartidas después de cuatro amplificaciones (Wu J. *et al*, 2009).

Sin embargo, resulta interesante observar que, aunque las 11 clonas seleccionadas presentaban el mismo péptido al realizar los ensayos de ELISA para evaluar su respuesta ante el anticuerpo utilizado para seleccionarlos, las clonas B5 y B17 mostraron lecturas del doble de la densidad óptica que las clonas A5, A6, A8, A15 y A17 (Figura 10). No tenemos una explicación a esta observación ya que ambos grupos de fagos tienen la misma secuencia de aminoácidos, sin embargo, este mismo tipo de resultados ha sido reportado por otros autores (Gazarian T. y cols, 2000, Gevorkian G. y cols. 2005) quienes señalan que la distribución del anticuerpo en los pozos de la placa de ELISA pudiera estar relacionado, al respecto señalan que un porcentaje alto de los anticuerpos quede anclado con la región Fc expuesta y no fija al plástico lo que da lugar a una menor interacción con el fago.

El 90% de las secuencias de aminoácidos de las 26 clonas seleccionadas presentan Prolina (P), resultados semejantes han sido reportados previamente (Hernandez-Chiñas *et al.*, 2009) en la caracterización de motivos inmunodominantes de Pet y Pic SPATEs de la misma familia de Sat. La prolina es un aminoácido con una conformación estructural que forma un ángulo de 65°, por tal motivo en una secuencia los aminoácidos cercanos a la Prolina forman plegamientos-β, conformación estructural que favorece la unión al anticuerpo (Kay *et al.*, 2000).

Al analizar la ubicación de la secuencia consenso PxAID en la secuencia reportada para Sat, se encontró que el motivo AID se localiza en dos regiones, en la primera (⁵⁵³AKLILDGSVNTKNDVEVSNASLTM⁵⁷²) el epítipo es discontinuo (⁵⁵³AxxIxD⁵⁵⁸) y en la segunda secuencia (⁷⁵³TTKGIDISGELTMMG⁷⁶⁷) el primer aminoácido del motivo AID es sustituido por una glicina (⁷⁵⁶GID⁷⁵⁸), ambos aminoácidos (glicina y alanina) presentan una cadena lateral con las mismas propiedades bioquímicas (alifáticos no polares, con carácter hidrofóbico). Después del motivo AID se localizaron en ambas secuencias los aminoácidos Leucina, Treonina y Metiotina (⁵⁵³AxxIxDxxxxxxxxxxxxLTM⁵⁷² y ⁷⁵⁶GIDxxxxLTM⁷⁶⁵), que se encuentran en la secuencia peptídica MSPFAIDLTMVS de las clonas seleccionadas en un mayor porcentaje en los dos ensayos (A5, A6, A8, A15, A16, B5 y B17), ambos motivos (AID; LTM) forman un epítipo discontinuo. Existe información que señala que en general en la superficie de las proteínas los anticuerpos reconocen epítipos discontinuos (Padlan, 1996). Al respecto se sabe que inmovilizando un anticuerpo sobre una superficie sólida y después exponerlo

a una librería de péptidos (Phage display), permite seleccionar péptidos con secuencia de un epítipo continuo o discontinuo, con esta metodología varios investigadores han identificado al igual que nosotros un epítipo discontinuo (Palacios-Rodriguez y cols. 2007, Mumey BM y cols. 2003).

Los epítopes discontinuos proporcionan información estructural de la proteína, ya que, pueden revelar segmentos distantes de la secuencia principal que se encuentran en estrecha proximidad espacial en la proteína nativa (Mumey *et al.*, 2003). Al analizar sobre un modelo estructural de la proteína Sat, los aminoácidos que forman los epítopes discontinuos ⁵⁴³AxIxDxxxxxxxxxLTM⁵⁶⁶ y ⁷⁵²GIDxxxxLTM⁷⁶¹ se ubicaron en dos asas (loops) dentro de la región de hélices β (Fig. 14). La primera secuencia AID a pesar de estar separada por 11 aminoácidos, al observar la estructura terciaria de la proteína se identifica que se encuentran muy cercanas, lo que sugiere que esto contribuya a una buena interacción con el anticuerpo. La región de hélices β fue descrita por Otto y cols. (2005) cuando resolvieron la estructura de la hemoglobina proteasa de *E. coli*, dichos autores describieron que esta región tiene una similitud con Pertactina proteína de 70 kDa (autotransportada) secretada por *Bordetella pertussis* pero que permanece anclada a la membrana de la bacteria (Otto BR *et al.*, 2005). La pertactina funciona como adhesina y esta propiedad está relacionada con el motivo RGD (arginina-glicina-asparagina), sin embargo, este último no se identificó en la secuencia lineal de Sat (Novatny P *et al.*, 1991), aunque, ambas proteínas (Pertactina y Sat) comparten características como una alta inmunogenicidad (Inatsuka CS *et al.*, 2010).

Para confirmar si el motivo AIDLTM, identificado en la secuencia lineal y estructural de Sat, es un epítoto inmunodominante de la proteína, se realizaron ensayos de ELISA y Western-blot con Sat utilizando para evaluar el suero del conejo inmunizando con la clona de fagos B17 que presenta la secuencia MSPFAIDLTMV/S. Los resultados de ambos ensayos (Figs 13 y 14) mostraron una reactividad evidente del suero anti-AIDLTM contra la proteína, lo que demuestra que este motivo es un componente del epítoto inmunodominante de la proteína Sat. En el ensayo de Western blot además de la reactividad del suero anti-AIDLTM con la proteína Sat, también se observó reacción contra dos fracciones de la proteína de aproximadamente 80 y 82 kDa (Fig. 14), este resultado sugiere que puede tratarse de una degradación de Sat en la que se encuentra el motivo.

Las clonas A1 y B18 fueron las que mostraron la reactividad más alta con el anticuerpo anti-Sat (Fig. 10), la secuencia de aminoácidos de los péptidos expresados por ambas clonas (LKGGNHINLPS y HPSTRPPLVGDN respectivamente), se buscaron en la secuencia primaria y terciaria de Sat; se observó que solo tres aminoácidos GGN (A1) y GDN (B18) se localizaban dentro de la secuencia lineal de Sat y otras SPATEs (Cuadros 8 y 9). Sin embargo, no se pueden considerar motivos de la proteína ya que existe el criterio de que tres aminoácidos no son suficientes para conformar un epítoto. No obstante considerando la respuesta observada en el ensayo de ELISA con ambos fagótopos (Fig. 10), es probable de que dentro de la secuencia peptídica de las clonas A1 y B18 exista un mimótopo de Sat. Para corroborar lo anterior se obtuvieron anticuerpos inmunizando conejos con las clonas A1 (LKGGNHINLPST)

y B18 (HPSTRPPLVGDN). Utilizando los métodos de ELISA y Western-Blot, se evaluó la respuesta de los sueros contra la proteína Sat. Sólo el suero de los conejos inmunizados con la clona B18 mostró reactividad, aunque, comparado con los sueros anti-Sat y anti- AIDLTM (clona B17) la respuesta fue menos intensa. En el ensayo de Western-Blot se observó que reconoció a Sat con un patrón semejante al observado con el anticuerpo anti-AIDLTM, lo que confirma que la secuencia del péptido HPSTRPPLVGDN (clona B-18) presenta un mimótopo de un epítipo de Sat, a pesar de que no se identificó en la secuencia lineal y en la estructura de Sat. Existen diversos trabajos que han obtenido resultados muy parecidos a los observados en nuestro estudio, sin embargo, estos epítopos podrían ser más de tipo conformacional que lineal (Azzazy HME. 2002 y cols. Villa-Mancera A. 2008 y cols).

Con respecto al suero del conejo inmunizado con la clona A1 este no presenta anticuerpos contra Sat lo que indica que el péptido que expresa la clona, no presenta mimótopos de la proteína. La explicación de antigenicidad observada en los ensayos realizados con esta clona, pudiera deberse a una reacción dirigida contra otros componentes que expresa en su superficie el fago M13. Los sueros anti-B17 (anti-AIDLTM) y anti-B18 reconocen a las proteínas Pet, Pic y Sat, así como a fragmentos de menor peso molecular probablemente de degradación de las proteínas. Esta observación es constante e incluso muestra un perfil similar al obtenido con los anticuerpos policlonales de conejos inmunizados con la proteína purificada.

Los resultados obtenidos en este proyecto, son relevantes ya que permitirán continuar realizando estudios en este grupo de proteasas, principalmente aquellos relacionados con la actividad específica de los mimótopos inmunodominantes identificados. Al respecto se plantea el diseño de péptidos sintéticos elaborados con las secuencias obtenidas, para posteriormente inmunizar animales con dichos péptidos con lo que se podrán confirmar nuestras observaciones en relación a su participación como mimótopos y finalmente determinar su función y posible empleo en el desarrollo de reactivos de inmunodiagnóstico en la detección oportuna de Sat en muestras clínicas.

IX. CONCLUSIONES

- Mediante la técnica de Phage Display fue posible identificar epítopes inmunodominantes en la proteína Sat.
- El motivo AIDLTM forma parte de un epítoto inmunodominante de la proteína Sat.
- Los anticuerpos obtenidos contra el mimótopo AIDLTM pueden ser de utilidad para el desarrollo de un método de inmunodiagnóstico oportuno de cepas productoras de la proteína Sat y otras cepas productoras de SPATES, para así dar un tratamiento oportuno a un actual problema de Salud Pública las: infecciones de tracto urinario.

X. ANEXOS

X.1 ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albúmina Sérica Bovina
°C	Grados Centígrados
cm	Centímetros
DO	Densidad Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
g	Gramos
h	Horas
IgG	Inmunoglobulina Tipo G
ITU	Infecciones de Tracto urinario
kDa	Kilo Daltones
Kg	Kilogramos
LB	Medio Luria Bertroni
ECEA	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
M	Molaridad
mA	MiliAmperes
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
µL	Microlitros
N	Normalidad
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
P	Peso
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
Pet	Toxina Codificada en Plásmido
PCR	Reacción de la Polimerasa en Cadena
Sat	Toxina Autotransportada Secretada
SPATES	Serin Proteasas de la Familia <i>Enterobacteriaceae</i>
TA	Temperatura Ambiente
ufp	Unidades Formadoras de Placa
V	Volumen

X.2 MEDIOS Y SOLUCIONES:

MEDIOS DE CULTIVO:

CALDO LURIA CON AMPICILINA

Por litro:

- 10 g de Bacto Triptona
- 5 g de Extracto de levadura
- 5 g de NaCl

Esterilizar en autoclave, mantener a 55°C, adicionar ampicilina (20 mg/L) y mantener a temperatura ambiente.

MEDIO LURIA CON AMPICILINA

Por litro:

- 10 g de Bacto Triptona
- 5 g de extracto de levadura
- 5 g de NaCl
- 15 g de Agar Bacteriológico

Esterilizar en autoclave, mantener a 55°C, adicionar ampicilina (20 mg/L) y mantener a temperatura ambiente.

SOLUCIONES**AZUL DE COOMASSIE 0.2%**

- Azul de Coomassie 2g
- Metanol 500 mL
- Ácido Acético Glacial 100 mL
- Agua Destilada 40 mL

Disolver el colorante en el metanol, adicionar el ácido acético y el agua, mezclar por 30 min y filtrar con Papel Whatman No. 1.

ALBÚMINA SÉRICA BOVINA 0.1%

- Albúmina Sérica Bovina

Disolver 100 mg en 100 mL de PBS.

ALBÚMINA SÉRICA BOVINA 1%

- Albúmina Sérica Bovina

Disolver 1000 mg en 100 mL de PBS.

LECHE DESCREMADA 5%

- Leche descremada sin grasa

Disolver 5 g en 100 mL de PBS.

PBS (Phosphate Buffered Saline) 10X

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 14.4 g de Na₂HPO₄
- 2.4 g KH₂PO₄

Disolver y ajustar el pH a 7.4

PBS-TWEEN 0.1% (v/v)

- Tween 20

Adicionar 100 µl a 100 mL de PBS.

PBS-TWEEN 0.5% (v/v)

- Tween 20

Adicionar 500 µl a 100 mL de PBS.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE CARBONATOS

- NaCO₃ 0.2 M

Disolver en agua y ajustar el pH a 9.5.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CORRIDA

- Glicina 0.192 M
- Trisma-base 0.025 M
- Dodecil sulfato de sodio 0.1%

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ELUCIÓN

- Glicina 0.1 M

Disolver en agua y ajustar el pH a 2.2 con HCl 1M.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATO DE SODIO

- Na_2HPO_4 0.0669 M
- NaH_2PO_4 0.0030 M

Disolver las sales y ajustar el pH a 8.2.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE LAEMMLI (2X)

- Agua Destilada 4.0 mL
- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 1.0 mL
- Glicerol 0.8 mL
- SDS 10% 1.6 mL
- B-mercaptoetanol 0.4 mL
- 0.1% Azul de Bromofenol 0.2 mL

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE TRANSFERENCIA (1X)

- Trisma base 4.8 g
- Glicina 23 g
- Metanol 320 mL
- Agua destilada 1.6 L

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE UNIÓN

- Glicina 0.1M

Disolver y ajustar el pH a 9.0.

SOLUCIÓN DE DESTEÑIDO

- Metanol 30%
- Ácido Acético Glacial 10%

SOLUCIÓN TRISMA BASE

- Trisma-base 2M

Disolver en agua y ajustar el pH a 9.1.

SULFATO DE AMONIO

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% Saturación (361 g de sal/L)

X. 2 MEDIOS Y SOLUCIONES EMPLEADOS PARA LA METODOLOGÍA PHAGE DISPLAY

MEDIO LURIA

Por litro:

- 10 g de Bacto Triptona
- 5 g de Extracto de levadura
- 5 g de NaCl

Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente

PLACAS LB/IPTG/Xgal

- Medio LB
- 15 g/L agar

Esterilizar en autoclave, enfriar a <70°C, adicionar 1 mL IPTG/Xgal y mantener las placas a 4°C en la oscuridad.

Para el IPTG/Xgal: Mezclar 1.25g IPTG (isopropyl β -D-tiogalactosidasa) y 1g Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) en 25 mL de dimetilformamida. La solución se debe mantener a -20°C en oscuridad.

AGAROSA TOP

Por litro:

- 10 g Bacto-triptona
- 5g de Extracto de levadura
- 5g NaCl
- 1g MgCl₂•6H₂O
- 7 g agarosa

Esterilizar en autoclave, distribuir en alícuotas de 50 mL, mantener sólido a temperatura ambiente, fundir en microondas lo necesario.

STOCK DE TETRACICLINA

- 20 mg/mL en etanol

Mantener a -20°C en la oscuridad. Mezclar antes de usar.

PLACAS DE LB-TETRACICLINA

- Medio LB
- 15g/L agar

Esterilizar en autoclave, enfriar a <70°C, adicionar 1 mL del Stock de tetraciclina y llenar las placas. Mantener a 4°C en oscuridad. No usar las placas si son cafés o negras.

BUFFER DE BLOQUEO

- M NaHCO₃ (pH 8.6)
- 5mg/mL BSA
- 0,02% NaN₃

Esterilizar con filtro, mantener a 4°C

TBS

- 50 mM Tris HCl (pH) 7.5)
- 150 mM NaCl

Esterilizar en autoclave, mantener a temperatura ambiente

PEG/NaCl

- 20% (P/V) polietilenglicol-8000
- 2.5 NaCl

Esterilizar en autoclave, mantener a temperatura ambiente.

BUFFER IODADO

- 10mM TrisHCl (pH 8.0)
- 1mM EDTA
- 4M NaI

Mantener a temperatura ambiente en la oscuridad.

SOLUCIÓN STOCK DE STREPTAVIDINA

- Disolver 1.5 mg de streptavidina liofilizada en 1 mL de 10mM de Fosfato de sodio (pH7.2)
- 100 mM NaCl
- 0.02% NaN₃

Mantener a 4°C o -20°C

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Allsop PL, Totsika M, Tree JJ, Ulett G, Mabbett, AN, Wells TJ, Kobe B, Beatson SA, Schembri MA. **UpaH Is a New Identified Autotransporter Protein That Contributes to Biofilm Formation and Bladder Colonization by Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073.** Infect. Immun. 2010; 78(4): 1659-1669.
2. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. **Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections.** Science. 2003; 301:105-107.
3. Azzazy HM, Highsmith WE Jr. **Phage display technology: clinical applications and recent innovations.** Clin Biochem. 2002; 35(6):425-445.
4. Boisen N, Ruiz PF, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. **High Prevalence of serin protease Autotransporter Cytotoxins among Strains of *Enteroaggregative Escherichia coli*.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 2009; 80(2): 294-301.
5. Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. **Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract.** Traffic. 2005; 6(1):18-31.
6. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanism of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature. 2010; 8:26-36.
7. Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR. **The autotransporter secretion system.** Res Microbiol. 2004; 155(2):53-60.
8. Dutta PR, Cappello R, Navarro-García F, Nataro JP. **Functional comparison of serine protease Autotransporters of Enterobacteriaceae.** Infect. Immun. 2002; 70(12):7105-7113.
9. Eslava C, Navarro-García F, Czczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. **Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infect. Immun. 1998; 66(7):3155-3163.
10. Foxman B, Brown P. **Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs.** Infect. Dis. Clin. North. Am. 2003; 17(2):227-241.

11. Gazarian KG, Gazarian TG, Solís CF, Hernández R, Shoemaker CB, Lactette JP. **Epitope mapping on N-terminal region of taenia solium paramyosin.** Immunol. Lett. 2000; 72(3):191-195.
12. Gazarian T, Selisko B, Hérion P, Gazarian K. **Isolation and Structure-functional Characterization of Phage Display Library-derived Mimotopes of Noxiustoxin of the *Scorpion centruroides* Noxius Hoffmann.** Mol. Immunol. 2000b; 37(12-13):755-66.
13. Gevorkian G, Segura E, Acero G, Palma JP, Espitia C, Manouchtarian K, López Marin LM. **Peptide Mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* Carbohydrate Immunodeterminants.** Bioch. J. 2005; 387 (Pt2): 411-17.
14. Guignot J, Chaplais C, Coconnier-Polter MH, Servin AL. **The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells.** Cell Microbiol. 2007; 9(1):204-221.
15. Guyer DM, Kao JS, Mobley HL. **Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and Catheter-associated bacteriuria and from fecal samples.** Infect Immun. 1998; 66(9):4411-4417.
16. Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HL. **Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by Uropathogenic *Escherichia coli*.** Mol. Microbiol. 2000; 38:53-66.
17. Guyer DM, Radulovic S, Jones FE, Mobley HL. **Sat the secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli*, Is a Vacuolating Cytotoxin for Bladder and Kidney Epithelial Cells.** Infect. Immun. 2002; 70:4539-4546.
18. Henderson IR, Nataro JP. **Virulence functions of autotransporter proteins.** Infect Immun. 2001; 69(3):1231-1243.
19. Hernández Chiñas U, Gazarian T, Gazarian K, Mendoza HG, Xicohtencatl CJ, Eslava C. **Peptide Sequences Identified by Phage Display are Immunodominant Functional Motifs of Pet and Pic Serine Proteases Secreted by *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*.** Peptides 2009; 30:2127-2135.

20. Inatsuka CS, Xu Q, Vujkovic-Cvijin I, Wong S, Stibitz S, Miller JF, Cotter PA. **Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance.** *Infect. Immun.* 2010; 78(7):2901-2909.
21. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. **Pathogenic *Escherichia coli*.** *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(2):123-140.
22. Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* 1970; 227(5259):680-685.
23. Liévin-Le Moal V, Comenge Y, Ruby V, Amsellem R, Nicolas V, Servin AL. **Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment.** *Cell Microbiol.* 2011; 13(7):992-1013.
24. Manges AR, Johnson JR, Foxman B, O'Bryan TT, Fullerton KE, Riley LW. **Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group.** *N. Engl. J. Med.* 2001; 345(14):1007-1013.
25. Mumey BM, Bailey BW, Kirkpatrick B, Jesaitis AJ, Angel T, Dratz EA. **A new method for mapping discontinuous antibody epitopes to reveal structural features of proteins.** *J. Comput. Biol.* 2003; 10(3-4):555-567.
26. Maroncle NM, Sivick KE, Brady R, Stokes FE, Mobley HL. **Protease Activity, Secretion, Cell Entry, Cytotoxicity, and Cellular Targets of Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli*.** *Infect. Immun.* 2006; 74: 6124-6134.
27. Marrs CF, Zhang L, Foxman B. ***Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?** *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 252(2):183-190.
28. Novotny P, Chubb AP, Cownley K, Charles IG. **Biologic and protective properties of the 69-kDa outer membrane protein of *Bordetella pertussis*: a novel formulation for an acellular pertussis vaccine.** *J. Infect. Dis.* 1991; 164(1):114-122.
29. Otto BR, Sijbrandi R, Luirink J, Oudega B, Heddle JG, Mizutani K, Park SY, Tame JR. **Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*.** *J Biol Chem.* 2005 Apr; 280(17):17339-17345.
30. Padlan EA. **X-ray crystallography of antibodies.** *Adv. Protein. Chem.* 1996; 49:57-133.

31. Palacios-Rodríguez Y, Gazarian T, Rowley M, Majluf-Cruz A, Gazarian K. **Collection of phage-peptide probes for HIV-1 immunodominant loop-epitope.** J Microbiol Methods. 2007; 68(2):225-235.
32. Petrenko VA, Vodyanoy VJ. **Phage Display for Detection of Biological Threat Agents.** Rev J Microb. Methods 2003; 53:253-262.
33. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, Small-scale preparation of single-stranded bacteriophage M13 DNA. In Sambrook J. Fritsch EF, Maniatis T. editors. Molecular cloning: a laboratory manual. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. P. 4.29-30.
34. Santamaría H. **Phage Display y su Aplicación en el Diagnóstico Clínico.** Revista Investig Clinica 2003; 55:711-718.
35. Sivick KE, Mobley HL. **Waging War against Uropathogenic *Escherichia coli*: Winning Back the Urinary Tract.** Rev. Infect. Inmun. 2010; 78: 568-585.
36. Smith GP, Scott JK. **Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage.** Methods Enzymol. 1993; 217:228-257.
37. Tabibian JH, Gorbein J, Heidari A, Dien SL, Lau VH, Chahal P, Churchill BM, Haake DA. **Uropathogens and Host Characteristics.** J Clin Microbiol. 2008; 46:3980-3986.
38. Taddei CR, Moreno AR, Fernandes AF, Montemor LP, Martinez. **Prevalence of Secreted Autotransporter Toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children.** FEMS Microb. Let. 2003; 227: 249-253.
39. Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, Ibarra F, Reyes-Pérez M, Reyes-Vivas H, López-Velázquez G, Gazarian K, Gazarian T, Alonso RA. **Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library.** Parasitology. 2008; 135(12):1437-1445.
40. Villaseca JM, Hernández U, Sainz-Espuñes TR, Rosario C, Eslava C. **Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties.** Rev. Lat. Microb. 2005; 47(3-4):140-159.
41. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. **Origins and Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*.** Exp. Mol. Path. 2008; 85:11-19.

42. Yen YT, Kostakioti M, Henderson IR, Stathopoulos C. **Common themes and variations in serine protease autotransporters.** Trends Microbiol. 2008; 16:370-379.