



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

“CRISTALIZACIÓN Y DEFINICIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE PET Y ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE SAT, PROTEASAS CON ALTA HOMOLOGÍA INVOLUCRADAS EN LA PATOGENESIS DE DIFERENTES PATOTIPOS DE *ESCHERICHIA COLI*.”

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
JOSÉ DOMINGO MEZA AGUILAR**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. CARLOS ESLAVA CAMPOS
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR
DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA**

**DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOZA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

México, D. F. FEBRERO 2015



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.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	48
3. HIPÓTESIS.....	50
4. OBJETIVO GENERAL.....	50
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	50
6. METODOLOGÍA	
6.1. Material de laboratorio.....	51
6.2. Purificación de proteínas.....	51
6.2.1 Expresión.....	51
6.2.2 Cromatografía.....	52
6.3 Análisis de proteínas.....	53
6.3.1 Electroforesis SDS-PAGE.....	53
6.4 Secuenciación de proteínas.....	53
6.5 Espectrometría de masas (ESI).....	54
6.6 Obtención de anticuerpos policlonales de conejo.....	54
6.7 Western blot.....	54
6.8 Actividad biológica de Sat.....	55
6.8.1 Actividad proteolítica sobre caseína marcada.....	55
6.8.2 Actividad proteolítica de sat sobre proteínas de membranas.....	55
6.8.3 Inducción de la quimiotaxis.....	56
6.9 Análisis estructural de pet y sat.....	58
6.9.1 Dicroísmo circular.....	58
6.9.2 Cristalografía.....	59

6.9.3	Difracción de rayos-x.....	59
6.9.4	Determinación de estructura tridimensional de sat por bioinformática....	60
7.	RESULTADOS.....	61
7.1	Purificación.....	61
7.2	Secuenciación.....	63
7.2.1	Degradación de Edman.....	63
7.2.2	Peso molecular de Sat.....	63
7.3	Actividad proteolítica de Sat sobre la caseína.....	64
7.4	Acción degradante sobre proteínas de membrana de eritrocito.....	65
7.5	Actividad quimioattractante de Sat sobre células monocucleares (mn)....	66
7.6	Análisis estructural de Pet y Sat	68
7.6.1	Estructura secundaria de Sat.....	68
7.7	Cristalización de Sat y Pet.....	70
7.8	Experimentos de difracción.....	72
7.9	Construcción de la estructura tridimensional de Pet.....	74
7.9.1	Estructura del dominio pasajero de Pet.....	76
8.0	Modelo estructural de Sat por bioinformática.....	80
9.	DISCUSIÓN.....	82
10.	CONCLUSIONES.....	99
11.	APÉNDICES	
11.1	Abreviaturas.....	100
11.2	Medios y soluciones.....	101
12.	REFERENCIAS.....	105

Mi historia no es agradable, no es dulce y amorosa como las historias inventadas, tiene un sabor a disparate y confusión a locura y a sueño, como la vida de todos los hombres que ya no quieren seguir engañándose a sí mismos.

Hermann Hesse

A mis padres:

Marina Aguilar Sandoval y José Domingo Meza Bojórquez, con admiración, gratitud y amor.

A mis hermanas:

Erendida y Daneli Meza Aguilar, con cariño y agradecimiento por su ayuda y estímulo a lo largo de mis estudios.

A Romina, Emiliano y Matías

Con sincero agradecimiento al Dr. Carlos A. Eslava Campos, por el apoyo y la dirección de esta tesis.

A mis maestros y a los miembros de mi comité tutorial, Dr. Guillermo Mendoza Hernández y Dr. Roberto Arreguín Espinoza, que con su ejemplo y esfuerzo infundieron en mí el anhelo por superarme.

Gracias totales a Magdalena Uribe Beltrán, Alfredo Torres Larios y Raimund Fromme por su ayuda incondicional.

“Un verdadero amigo, es uno mismo con otra piel”.

Atahualpa Yupanqui

A mis amigos: a todos los que en poco o mucho colaboraron conmigo en la realización de esta tesis.

RESUMEN

Las proteínas autotransportadas juegan un papel de gran importancia para la sobrevivencia de la bacteria, la mayoría han sido ampliamente estudiadas y se sabe que presentan diferentes actividades (citotóxica, enterotóxica y neurotóxica). La liberación de estas proteínas se realiza a través del sistema de secreción tipo V, el cual es un mecanismo utilizado por bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* para transportar proteínas desde el citoplasma hasta el medio extracelular pasando por ambas membranas (citoplásmica y externa) y espacio periplásmico en un solo evento. Dentro de la familia de proteínas autotransportadas se encuentra la subfamilia de proteínas conocidas como SPATEs (Serina proteasas autotransportadas de la familia enterobacteriaceae), las cuales se sintetizan como un polipéptido que posee la información necesaria para ser transportadas desde el citoplasma hasta el medio extracelular pasando por el espacio periplásmico. Las SPATEs están compuestas por tres subdomios; péptido señal, el dominio pasajero que muestra la actividad biológica y el dominio C-terminal que está involucrado en la translocación del dominio pasajero del espacio periplásmico al medio extracelular. La actividad proteolítica de algunos miembros de las SPATEs, se debe a la secuencia consenso GDSGS en donde la primer serina conforma la triada catalítica responsable de la actividad junto con una histidina y un ácido aspártico. La actividad que muestran estas proteínas es muy variada y muestran propiedades enzimáticas, de locomoción de la bacteria, como adhesina, toxina o citotoxina, proteína inmunomoduladora, o como factor que permite la maduración de otras proteínas asociadas con la virulencia. Pet (plasmid encoded-toxin) y Sat (secreted autotransporter toxin), integrantes de las SPATEs presentan el mayor porcentaje de similitud o identidad en su secuencia de aminoácidos, Sat se identificó primero en cepas de *E. coli* uropatógena y posteriormente en cepas de *Shigella spp*, *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enterohemorrágica

(EHEC). Por otra parte, Pet se ha identificado solamente en el grupo de *E. coli* enteroagregativa. Sin embargo, ambas presentan actividades biológicas comunes, entre las que destacan la degradación de las cadenas α y β de la fodrina, proteína que forma parte del citoesqueleto de células como HEp-2. La degradación de la fodrina conduce a la pérdida de las fibras de estrés y liberación del contacto focal, lo que ocasiona el redondeamiento de la célula eucariota (efecto citopático). Por otro lado, por medio de ensayos *in vitro* con cámaras de Ussing, en las que se emplearon preparaciones de intestino de rata, identificando que Pet y Sat también inducen efecto de tipo enterotóxico. La importancia epidemiológica de las SPATEs reside en que entre las bacterias productoras de algunos de los miembros de esta familia destacan *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*, patógenos asociados con enfermedades que representan importantes problemas de salud pública en diferentes partes del mundo. En este trabajo se realizó la caracterización biológica y caracterización estructural parcial de Sat, así mismo se determinó la estructura tridimensional de Pet. Utilizando caseína marcada se demostró que la proteína Sat tiene actividad proteolítica *in vitro* en un amplio rango de pH (2-10), siendo a pH 9 donde Sat muestra su mayor actividad proteolítica. Por otro lado, ensayos *in vitro* utilizando membranas de eritrocito demostraron que posee actividad degradante sobre la espectrina. En este ensayo se identificaron dos fragmentos (120 y 150 kDa), efecto diferente al observado previamente con Pet que produce sólo el fragmento de 120 kDa. Además se analizó el efecto quimioattractante de Sat sobre células mononucleares (MN), el resultado fue muy parecido a lo descrito en Pet utilizando el mismo método. Por dicroísmo circular se determinó la estructura secundaria de Sat, identificando en Sat un alto porcentaje en hojas- β y bajo contenido en hélice- α , se observó además que la estructura secundaria se ve afectada con temperaturas por encima de los 50 °C, con un efecto desnaturalizante irreversible.

Aunque se obtuvieron cristales de Sat bajo la condición de sulfato de magnesio hidratado 0.6 M, sodium-HEPES 0.1 M 2-methyl-2,4 pentanodiol 4 % pH 7.5 a 18 °C, no se logró coleccionar datos por difracción con rayos X, esto debido probablemente a que los cristales obtenidos no presentaron la calidad requerida. Por lo anterior es que se decidió trabajar en la cristalización de Pet que como se ha mencionado presenta alta similitud e identidad con Sat. La estructura tridimensional de Pet sugiere una conformación parecida a la descrita en EspP y HbP, al respecto se identificó la presencia de los dominios; globular (residuos 1-257) y helicoidal- β (residuos 258-963) así como dos sub-dominios (517-578 y 615-648) que sobresalen del dominio helicoidal- β . Las estadísticas de refinamiento de la estructura de Pet sugieren estabilidad en la proteína, a pesar de la parte C-terminal, correspondiente a los aminoácidos 799-963 donde la movilidad dada por el factor-B es más elevada comparada con el resto de la estructura, lo que produjo densidades electrónicas pobres o poco homogéneas, lo que ha hecho imposible asignar posiciones a los átomos en esa región de la parte C-terminal de Pet. Se ha sugerido que el dominio helicoidal- β tiene importancia tanto para el proceso de translocación de algunas SPATEs como para la formación de estructuras como biofilms, autoagregados reportados en Hap de *Haemophilus influenzae* y la producción de estructuras tipo cuerdas “ropes” en EspP. El trabajo desarrollado es de gran impacto para el estudio y conocimiento del grupo de las SPATEs, hasta el momento solo se cuenta con la estructura de 5 dominios pasajeros de estas proteínas incluida la nuestra. La determinación de la estructura tridimensional de Pet por difracción de rayos X permite, sugerir que no obstante Pet pertenece a un mismo grupo de proteínas como lo son las SPATEs con funciones diferentes, se requiere de este tipo de estudios para determinar las diferencias estructurales que las diferencian. Lo anterior permite entender el comportamiento de las bacterias que las producen que se pueden ubicar en diferentes tejidos y ocasionar distintos cuadros clínicos .

ABSTRACT

Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATE) is a family of extracellular proteases produced by *Enterobacteriaceae*. Autotransporters are secreted by the Type V secretion system from Gram-negative bacteria and are very diverse in their function (e.g., adhesin, protease, *etc.*), but with the same export mechanism. They are recognized based on their common organization: they are comprised of 1) an N-terminal, *sec*-dependent, signal-peptide required for targeting to and export through the inner membrane, followed by 2) a “passenger domain,” which is the functional, secreted part of the protein, and ending with 3) a C-terminal β domain or translocator” domain, which folds as a β -barrel in the outer membrane. SPATEs are proteases that contain the conserved serine-protease motif GDSGS where *S* is the catalytic serine at the N-terminus of their passenger domain (between residues 250–270). Sat and Pet share high homology between primary sequences, Pet was the first autotransporter for which an enterotoxic activity was reported in enteroaggregative *E. coli*, and Sat was isolated for the first time from uropathogenic *Escherichia coli* strains. Has been shown that Pet affect HEp-2 and HT29 cells, while Sat shown cytotoxic effects on VERO kidney cells, HK-2 human bladder, and HEp-2 cells. Once in the cytoplasm both toxins cleave the fodrin, which is the cytoskeletal support and then induces cytopathic effects. The aim of this work, was to analyze the biological and biochemical characteristics of Sat protein isolated from an *E. coli* strain isolated in our laboratory. We found that Sat has a wide proteolytic spectrum under different pH conditions (2-10) with the highest activity at pH 9. Also was found unlike Pet that produces only a single 120 KDa fragment, Sat disrupt the fodrin into predominantly two fragments (120 and 150 KDa), suggesting different mechanisms to induce their biological effects. Circular dichroism of Sat protein showed that it is stable up to 50 °C with a secondary structure with high content of β -sheets and low of α -helix. However, during the Sat crystal diffraction experiments

were observed that the quality of them was not good enough to resolve the three dimensional structure, indicating high mobility in one of its domains that disturb well-ordered crystal formation. Considering the above it was decided to work with Pet, like to Sat the Pet crystals were obtained at 18 °C in 0.2 M prolin, 0.1 M HEPES, pH 7.5, 10 % w/v PEG 3350, then were resulted in X-ray diffraction to 2.3 Å and the three dimensional structure could was solved using molecular replacement. At this high resolution the principal structural features of Pet were evident observing a globular subdomain (1-267 aminoacids) and C-terminal or β-stalk subdomain (268-964 aminoacids), with the two subdomains (517-578 and 615-648) that protrude from the β-stalk, but interestingly the subdomain 2 that is present in the structure of other serine protease, the hemoglobin protease (Hbp) was absent. The lack of the assignment conformation at the residues 799-964 located at the C-terminal top imply high mobility in this part of the protein that represents a shared feature among all determined SPATEs structures to date. In addition to its translocation mechanism, the C-terminal or β-stalk apparently plays an important role to build up super structures like biofilms and aggregates involved in antibiotic and immunologic system resistance. This study underscores the importance to continue investigating these proteins and keep working toward the understanding of their function.

1. INTRODUCCIÓN

Proteínas Autotransportadas

Las bacterias patógenas en su evolución natural han tenido que adaptarse, modificando sus mecanismos de sobrevivencia, desarrollando estrategias para diseminarse, multiplicarse y mantenerse dentro del hospedero. Muchos de estos mecanismos están relacionados con diferentes proteínas asociadas con propiedades como adherencia o regulación de la función celular (Bassiniet *et al.* 2000, Fink *et al.* 2003).

Con respecto a las proteínas que son autotransportadas algunas tienen actividad de toxinas (citotoxinas, enterotoxinas, neurotoxinas), dichos compuestos son proteínas que pueden seguir dos caminos; uno de ellos es que queden atrapadas en el espacio periplásmico y liberarse cuando la bacteria muere, y el otro es que sean eliminadas por diferentes mecanismos a través de la membrana externa (Navarro-García *et al.* 1999, Henderson *et al.* 2001).

La liberación de dichas proteínas desde el citoplasma hasta el medio extracelular, se realiza a través de sistemas de secreción (Henderson *et al.* 2001), los cuales han sido reportados y clasificados hasta el momento en los tipos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, respectivamente (Salmond *et al.* 1993; Henderson *et al.* 2000, 2004, Economou *et al.* 2006, Van Ulsen *et al.* 2006, Leo *et al.* 2012). Las diferencias en estos sistemas, se han establecido de acuerdo a la complejidad de la maquinaria que utiliza la bacteria. En bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* (*E. coli*), existen sistemas que transportan proteínas a través de las membranas citoplásmica y externa en un solo evento, o por vías en las que existen intermediarios periplásmicos (Dautin *et al.* 2007b).

SISTEMAS DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS

Sistema de Secreción Tipo I (SSTI)

El SSTI fue inicialmente descrito por Letoffe *et al.* (1994) en bacterias Gram-negativas, este sistema transporta substratos directamente desde el citoplasma hasta el medio extracelular sin la formación de intermediarios periplásmicos. El espectro de substratos que este sistema transporta posee funciones muy diversas y un amplio intervalo de tamaños, como el hemóforo HsaA de 19 KDa y la lipasa LipA de 65 KDa ambas secretadas por *Serratia marcescens*, o la proteína LapA de 900 Kda involucrada en la formación de biofilms de *Pseudomonas fluorescens*. La maquinaria para realizar el transporte en el SSTI, está compuesto por dos proteínas de membrana interna, la proteína de fusión de membrana (MFP) y un sistema de transporte conocido como ABC, así como un componente de membrana externa que cataliza el proceso de secreción. La proteína modelo para ejemplificar este sistema es la hemolisina A (HlyA) de *E. coli* uropatógena, el sistema es de tipo Sec independiente y se ha identificado en *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pasteurella haemolytica* y *Bordetella pertussis* (Binet *et al.* 1997, Henderson *et al.* 2004, Schwarz *et al.* 2012).

Sistema de Secreción Tipo II (SSTII)

Bacterias Gram-negativas usan el sistema de secreción tipo II para liberar proteínas que contribuyen a la enfermedad en humanos, animales y plantas (Sikora *et al.* 2013) El SSTII es importante en especies de bacterias tanto patógenas como no patógenas. Esta vía de secreción fue identificada por primera vez en *Klebsiella oxitoca*, para la secreción de una lipoproteína que hidroliza el almidón (d'Enfert *et al.* 1987). Hasta el momento las especies patógenas en las que se ha reportado la participación del SSTII incluyen a; *Vibrio cholerae*, *E. coli* enterotoxigénica, *Legionella pneumophila*,

Yersinia enterocolitica, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia pseudomallei*, *E. chrysanhemi* y *Xanthomonas campestris*.

El SSTII es SecA dependiente y está dividido en dos eventos; en el primero las proteínas blanco expresan un péptido señal que es reconocido por el sistema Sec, este se compone de la ATPasa SecA, algunas proteínas de membrana interna (SecD, SecE, SecF, SecG y SecY) y una peptidasa señal (SecB). SecA, provee la energía para el transporte a través del translocon y la peptidasa señal (SecB), remueve el péptido señal de la proteína liberándolo dentro del espacio periplásmico. El segundo evento contempla el transporte de la proteína correspondiente a través de la membrana externa, este evento requiere de 12 a 15 proteínas accesorias que en su conjunto se denominan componente secretor (Sandkvist *et al.* 2001a y 2001b). El SSTII contiene además una ATPasa llamada GspE, la cual provee la fuerza mecánica para el proceso de secreción. El SSTII es responsable de la translocación de diversas enzimas hidrolíticas que tienen capacidad para degradar material biológico (Quitina), o potenciar la patogenicidad de los microorganismos como es el caso de *V. cholerae*, este microorganismo para sobrevivir en los diferentes estadios de su ciclo de vida libera por el SSTII una quitinasa, por otro lado con el mismo sistema libera la toxina (Abs) responsable del cólera (Sikora *et al.* 2013).

Sistema de Secreción Tipo III (SSTIII)

El SSTIII también conocido como complejo de aguja ó (“Neddle complex”), es uno de los sistemas de secreción más estudiados, consiste en una estructura basal y una estructura externa tipo aguja (Abbey y Rocha 2012). Fue inicialmente descrito por microscopía electrónica en *Salmonella typhimurium* y ha sido identificado en bacterias patógenas de plantas y mamíferos en los que se incluye *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *E. coli enteropatógena* (EPEC), *E. coli enterohemorrágica* (EHEC),

Citrobacter rodentium, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* y *Chlamydia trachomatis* (Troisfontaines y Cornelius 2005). A través del uso de este sistema la bacteria inyecta proteínas o factores de virulencia directamente en la célula hospedero para iniciar la infección, lo que es esencial para la sobrevivencia y patogénesis de la bacteria. Se ha reportado que el SSTIII consiste en proteínas estructurales y no-estructurales en donde las proteínas estructurales ensamblan o forman el complejo conocido como aguja, este consiste de una estructura basal incrustada en la membrana, una aguja externa que sobresale de la superficie bacteriana, y la estructura de punta que corona la aguja (Egan *et al.* 2014). Para el contacto con la célula hospedero, el translocon se ensambla entre la estructura punta de la aguja y la célula huésped, sirviendo como una entrada para la translocación de proteínas efectoras mediante la creación de un poro en la membrana celular del hospedero. Seguido de la liberación de las proteínas efectoras en el citoplasma del hospedero, se inicia y se mantiene la infección, por manipulación de la maquinaria celular, como: señalización, sistemas de secreción, movimiento del citoesqueleto y respuesta inflamatoria. El SSTIII es independiente del sistema Sec y ha sido considerado como un sistema homólogo al sistema exportador del flagelo en la bacteria. En el caso de *Salmonella* para la construcción de este aparato se requieren entre otras las proteínas estructurales (SipB, SipC, SipD, PrgI, InvG, PrgJ, PrgK, PrgH, SpaP, SpaQ, SpaR, SpaS, InvA y InvC) (Pallen *et al.* 2005).

Las proteínas trasladadas a través del sistema tipo III son también conocidas como efectores tipo III (T3Es). Los T3Es son factores de virulencia que pueden suprimir el sistema inmunológico del hospedero (plantas), pero al mismo tiempo pueden ser reconocidas por el hospedero y desencadenar mecanismos específicos de resistencia. Es poco lo que se conoce en patógenos de plantas y sobre su utilización del SSTIII y los

mecanismos de regulación involucrados, sin embargo, recientes trabajos mencionan algunas proteínas como candidatos para la regulación de este sistema de secreción, tal es el caso de proteínas involucradas en la regulación de secreción/translocación, como las chaperonas tipo III (T3Cs) y el interruptor T3S4 para la especificidad del sustrato (Lohou *et al.* 2013).

Sistema de Secreción Tipo IV (SSTIV)

Este se divide en los tipos de sistemas SSTIVa y SSTIVb, compuestos por 12 y 27 proteínas respectivamente, ambas funcionan colectivamente para translocar proteínas efectoras al citosol de la célula hospedero (Chandran *et al.* 2009, Vogel *et al.* 1998). Este sistema se considera como un sistema especializado para la liberación de DNA o proteínas dentro de la células del hospedero, con los cuales se realiza una variedad de actividades esenciales para la replicación de la bacteria, así como para evitar la respuesta inmune de parte del hospedero (Beare *et al.* 2008). Este sistema multicomponente permite a las proteínas bacterianas pasar a través de ambas membranas y periplasma. Este sistema también ha sido relacionado con el fenómeno de conjugación en bacterias, dando la capacidad de intercambiar proteínas o DNA-proteína y plásmidos entre bacterias de la misma especie o diferentes especies (Hubber *et al.* 2010). El SSTIV ha sido descrito virtualmente en todas las bacterias Gram-positivas, entre los prototipos del sistema está el de transferencia de T-DNA por *Agrobacterium tumefaciens* y el sistema de secreción de la toxina pertusis de *B. pertussis*. Este sistema también ha sido descrito como un mecanismo importante para la sobrevivencia de algunas otras bacterias como *Bartonella spp*, *Brucella spp*, *Rickettsia spp*. (Voth *et al.* 2012).

Sistema de Secreción Tipo V (SSTV) o Sistema Autotransporte de Proteínas

Es de nuestro particular interés abordar de manera más detallada la descripción de este sistema de secreción, debido a que las proteínas que en este trabajo se analizan emplean el SSTV para su transporte desde el citoplasma hasta el medio extracelular.

El SSTV o mecanismo autotransportador (AT) es dependiente del sistema Sec no requiere de ATP o de gradiente de protones para la translocación a través de la membrana externa. El sistema fue inicialmente descrito como mecanismo de liberación de la proteasa IgA de *Neisseria meningitidis* (Mulks M. H. *et al.* 1978). En bacterias patógenas Gram-negativas las proteínas secretadas por el sistema AT, representan una extensa familia con más de 1000 miembros identificados (Kajava and Steven, 2006). Este es uno de los sistemas de secreción de proteínas mejor conocidas, las cuales se caracterizan por ser un sistema simple y que a partir de su descripción, es considerado como un procedimiento ampliamente utilizado para la liberación al medio externo de proteínas de diferentes grupos de bacterias (Henderson *et al.* 2001; Dautin *et al.* 2007). Las proteínas que son secretadas a través de este medio son proteínas de gran tamaño y están compuestas de una secuencia señal (N-terminal), un dominio pasajero que de manera general excede los 100 KDa, y un dominio β o C-terminal (translocador) con un peso aproximado de 30 KDa (Dautin *et al.* 2010).

Un ejemplo al respecto lo constituyen las serina proteasas autotransportadas producidas por integrantes de la familia Enterobacteriaceae conocidas como (SPATEs, por sus siglas en inglés). Estas se describen como una subfamilia de proteínas autotransportadas (AT), que utilizan el SSTV para su transporte desde el citoplasma hasta el medio extracelular (Leo *et al.* 2012). Durante las últimas dos décadas han sido descritas más de

20 proteasas y por la importancia que tienen en la sobrevivencia de las bacterias que las secretan, han sido objeto de numerosos estudios.

El SSTV se ha diversificado aún más por ser lo suficientemente versátil como para participar en la translocación de una gran diversidad de moléculas desde el citoplasma hasta el medio extracelular. Además del SSTVa a través del cual las SPATEs clásicas son autotransportadas, existe el SSTVb que es utilizado por proteínas autotransportadas como hemaglutinina filamentosa ó FHA (por sus siglas en ingles) de *B. pertussis* (Willems *et al.* 1994) y el sistema hemolítico de *Serratia masrcences* (Braun *et al.* 1994). El SSTVc es una variante involucrada en el transporte de proteínas autotransportadas triméricas, que usualmente son adhesinas y carecen de actividad enzimática. El prototipo de las adhesinas autotransportadas triméricas es la adhesina Yersinia A (YadA) de *Y. enterocolitica* (Hoiczuk *et al.* 2000, Leo *et al.* 2010)

Sistema de Secreción Tipo VI (SSTVI)

Este sistema esta frecuentemente relacionado en la interacción de la bacteria con la célula hospedera, de una manera patogénica o simbiótica. Se han descrito dos tipos de proteínas que son secretadas por este sistema, genéricamente llamadas como Hcp y VgrC, aunque no está totalmente claro si estas son proteínas que utilizan este sistema para ser secretadas como proteínas efectoras o son realmente componentes del mismo sistema, al respecto se puede mencionar que el papel y modo preciso de acción de algunos componentes de este sistema permanece desconocido (Mougous *et al.* 2006).

El SSTVI fue identificado por un proceso de selección de pérdida de virulencia hacia la célula del hospedero y por la identificación de proteínas secretadas en el sobrenadante del cultivo (Bingle *et al.* 2008). Este sistema es comparado con el mecanismo de inyección de DNA en bacteriófagos. Hood *et al.* (2010) reportaron que uno de los tres

sistemas de secreción tipo VI que contiene *Pseudomonas aeruginosa* secreta tres toxinas dentro de otras bacterias. Dos de estas toxinas, llamadas Tse1 y Tse3 son inyectadas dentro del citoplasma de bacterias Gram-negativas, degradan el peptidoglicano que forma parte de la pared celular y como resultado la bacteria afectada muere. La función de Tse2 es desconocida pero al parecer al ser inyectada en el citosol de la bacteria, inhibe el crecimiento celular. Cada uno de los genes que codifican las toxinas Tse está organizada en conjunto (tándem) con otro gen que codifica para una proteína de inmunidad específica, cuando estas se expresan protegen a la bacteria de la actividad de la toxina (Russell et al. 2012). Se estima que el sistema de secreción tipo 6 no es únicamente una alternativa que la bacteria utiliza para atacar el hospedero, también funciona para facilitar la convivencia con otras bacterias que viven en el mismo ambiente. Se ha descrito que las bacterias utilizan este sistema de diferentes maneras, por ejemplo *P. aeruginosa* emplea el sistema contra bacterias que muestran comportamiento agresivo. Las bacterias que utilizan este sistema de secreción son diversas y entre estas se incluyen a: *Burkholderia mallei*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *E. coli enteroagregativa*, *Francisella tularensis*, *P. aeruginosa*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Rhizobium leguminosarum*, *S. entérica* y *V. cholerae* (Filloux et al. 2008, 2013).

Sistema de Secreción Tipo VII (SSTVII)

El SSTVII fue inicialmente descrito en *Mycobacterium tuberculosis*, ya que esta bacteria posee una envoltura celular inusual por lo que necesita un sistema de secreción especializado. El SSTVII también es conocido como ESX y ha sido identificado tanto en el género *Mycobacterium* como en otros géneros de bacterias que presentan envolturas celulares similares (Fenton et al. 1996, Finlay et al. 1997). Este sistema es responsable de la secreción de múltiples proteínas caracterizadas por la falta de péptido

señal clásico (Addahall *et al.* 2007). Dentro del genoma de *Mycobacterium* se han descrito por lo menos cinco loci parálogos conocidos como ESX-1 a ESX-5 (Gey *et al.* 2001, Tekaia *et al.* 1999). El arquetipo de este sistema ESX-1 es responsable de la secreción de las proteínas, ESAT-6, CFP-10 (Daleke *et al.* 2012).

La cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* (bacilo calmette-Guérin) que se utiliza como vacuna para prevenir la tuberculosis, ha sido modificada genéticamente eliminando nueve genes del locus ESX-1 (Wards *et al.* 2000). Aunque se sabe poco de los componentes de este sistema de secreción, hasta el momento se han descrito y caracterizado dos proteínas de bajo peso molecular que llevan a cabo parte del proceso de secreción (Abdallah *et al.* 2007). Gran parte de la caracterización se ha realizado en *Staphylococcus aureus* donde también juega un papel determinante en procesos de virulencia (Anderson *et al.* 2013).

Sistema de Secreción Tipo VIII (SSTVIII)

El SSTVIII también conocido como sistema de precipitación-nucleación extracelular o ENP por sus siglas en inglés, es el responsable de la producción de curli, que son fibras adhesivas en la superficie de la membrana externa de algunas especies de bacterias patógenas. En *E. coli* se conocen dos componentes de este sistema, CsgA y CsgB y la lipoproteína de membrana externa CsgG que cruza la membrana interna con el sistema Sec. Aunque el conocimiento de este sistema de secreción es limitado, datos experimentales indican que CsgG se requiere para la secreción de CsgA y CsgB a través de la membrana externa. Se han propuesto dos modelos para el funcionamiento de SSTVIII, uno apoya la idea de que CsgG actúa como chaperona estabilizando los dos componentes restantes, mientras que el otro modelo plantea la formación de un canal en la membrana externa con CsgG, a través del cual CsgA y CsgB son secretados al medio extracelular (Evans *et al.* 2013).

Las SPATEs son proteínas sintetizadas como un polipéptido (figura 1), que contiene parte de la información requerida para su exportación y secreción desde el citoplasma hasta el medio extracelular pasando por el espacio periplásmico empleando el SSTV (Henderson *et al.* 1998).

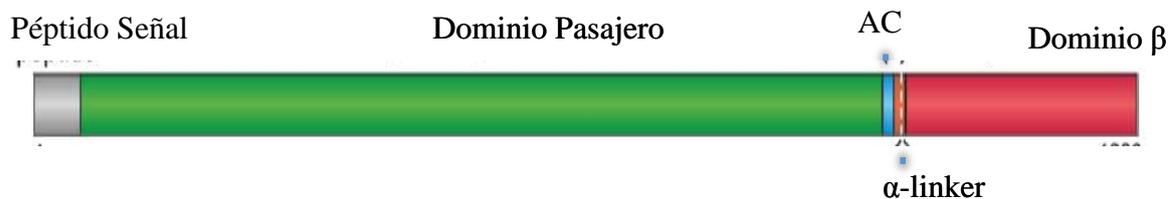


Figura 1. Representación esquemática de una proteína autotransportada. El AT está compuesto por un péptido señal, el dominio pasajero, un dominio autochaperon (AC), el integrador- α (linker- α) y el dominio β . (Weiss *et al.* 2013).

Péptido Señal. Esta región representa la parte amino terminal de las SPATEs (también conocida como secuencia señal o secuencia líder), compuesta por los siguientes dominios (i) n-dominio, compuesto por aminoácidos con carga positiva, (ii) h-dominio o región hidrofóbica y (iii) c-dominio que es un péptido de reconocimiento también llamado péptido señal y que además es importante para la translocación de la proteína al espacio periplásmico (Fekkes y Driessen, 1999; Desvaux *et al.* 2006).

Para analizar el papel que desempeña la secuencia señal en la biogénesis de las SPATEs, se utilizó como modelo a EspP (Extracelular serine protease plasmid-encoded), serina proteasa secretada por *E. coli* enterohemorrágica 0157:H7 (Szabady *et al.* 2005). Para esto, se construyeron mutantes en los tres dominios del péptido y se analizó su participación en el transporte de la proteína a través de las membranas interna y externa de la bacteria. Los resultados mostraron que mientras el n-dominio no es importante para que la proteína se transporte al espacio periplásmico, el c-dominio es requerido para el reconocimiento de la proteína. Al realizar modificaciones en el péptido señal de EspP, se observó que se induce el plegamiento de la proteína en la región periplásmica lo que impide el transporte del dominio pasajero, lo anterior

confirma la importancia del péptido señal no sólo como un blanco de reconocimiento así como también se identifica como parte importante de la vía de transporte del dominio pasajero, ya que evita su plegamiento en el periplasma (Szabady *et al.* 2006; Desvaux *et al.* 2007).

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

Debido a su importancia, muchos estudios se han enfocado hacia el análisis de la estructura del translocador, la cual presenta más del 60 % de los aminoácidos conservados dentro de las SPATEs. Yen *et al.* (2008) plantean la hipótesis de que estos residuos conservados tienen un papel importante en la estabilidad del β -barril, principalmente, a través de interacciones de residuos alifáticos o que estos residuos participan en la secreción del dominio pasajero. La estructura del translocador de EspP (Barnard *et al.* 2007), muestra 12 hebras β , con 174 aminoácidos conservados, de los cuales 84 son polares y 90 no polares. Por otro lado, estudios bioquímicos de los translocadores de las serina proteasas Tsh y EspP, indican que existen como una unidad monomérica (Kostakioti y Stathopoulos 2006; Skillman *et al.* 2005).

Kostakioti y Stathopoulos (2006), identificaron la secuencia conservada EVNNLNKRMGDLRD, ubicada entre la región carboxi-terminal del dominio pasajero

y la región amino-terminal del translocador. Este motivo es el más grande y el más conservado dentro de estos polipéptidos; mutaciones en ciertos residuos de este motivo revelaron la importancia que tiene en la secreción del dominio pasajero, aunque no en el anclaje del translocador. El nombre autotransportador para este sistema de secreción ha sido puesto en entre dicho, ya que estudios recientes muestran que realmente es un sistema que requiere de proteínas accesorias además de la información y la estructura que poseen las proteínas que son secretadas a través de este sistema. Leva y Bernstein (2009), reportaron la interacción del translocador de EspP con el complejo Bam (también conocido como complejo YaeT u Omp85), compuesto por una proteína hetero-oligomérica de membrana externa (BamA) y algunas lipoproteínas (BamB-E), complejo que cataliza el ensamble de proteínas de membrana externa de la bacteria. Además, describen que la parte amino terminal de EspP interacciona con las chaperonas SurA y Skp componentes del espacio periplásmico.

Resultados similares fueron reportados por Ruiz-Pérez *et al.* (2009), estos autores identificaron una interacción proteína-proteína con las chaperonas SurA y DegP, tanto para la unidad de translocación, como para el dominio pasajero. Estos resultados sugieren que las SPATEs requieren de moléculas accesorias.

Dominio Pasajero. Este dominio corresponde a moléculas efectoras extracelulares de la proteína autotransportada, la secuencia de aminoácidos así como su función pueden variar dependiendo de la proteasa. Entre la actividades identificadas en el dominio pasajero se han descrito: (i) capacidad enzimática, (ii) locomoción de la bacteria mediante la actina, (iii) adhesina, (iv) toxina, (v) proteína inmunomoduladora, (vi) o como factor que permite la maduración de otras proteínas de virulencia (Desvaux *et al.* 2004b).

La región globular de la estructura terciaria del dominio pasajero de las SPATEs tiene similitud con la tripsina, lo que originó que estas proteasas se incluyeran dentro de la familia de IgA proteasa. En esta se encuentran enzimas como la IgA1 proteasa de *N. gonorrhoeae*, Hap de *H. influenzae* integrantes del clan quimiotripsina (<http://merops.sanger.ac.uk>), ampliamente distribuidas en eucariontes, procariontes, arqueas y virus. Las quimiotripsinas participan en procesos fisiológicos como la respuesta inmune, homeostasis, digestión, transducción de señales, y reproducción (Hedstron *et al.* 2002).

Clasificación de las SPATEs

Los miembros integrantes de la familia, se han clasificado en dos clases principalmente por la identidad en la secuencia de aminoácidos del dominio pasajero y por las funciones biológicas que se han determinado para cada proteasa (Tabla 1). Dutta *et al.* (2002) y Yen *et al.* (2008), propusieron que Pet (plasmid encoded-toxin), EspC (EPEC-secreted protein C), SigA (Enterotoxina inmunogénica de *Shigella flexneri*), Sat (secreted autotransporter toxin) y EspP (extracelular serine protease plasmid-encoded) proteasas con actividad citotóxica, deben formar parte de las SPATEs de clase I, y Pic (protein involved in colonization), SepA (*Shigella* extracelular protein), Tsh (temperature-sensitive hemagglutinin), EaaA/EaaC (SPATEs de profago P-EibA *E. coli* ED1a), BoA, Vat (toxina vacuolizante), EpeA (proteasa del grupo STEC codificada en isla de patogenicidad), EspI (proteasa del grupo STEC codificada en plásmido), EatA (proteína autotransportada de *E. coli* enterotoxigenica) y Aida que no muestran propiedades tóxicas en el grupo de clase II.

Tabla 1. Serinas Proteasas Autotransportadas de la Familia Enterobacteriaceae.

SPATE	BACTERIA	ENFERMEDAD	FUNCION	REFERENCIA
CLASE I				
Pet	EAEC	Diarrea	Enterotoxina, Citotoxina	Eslava, 1998; Villaseca 2000, Navarro-García 2004
EspC	EPEC	Diarrea	Enterotoxina	Mellies 2001
SigA	<i>Shigella flexneri</i>	Shigellosis	Citotoxina	Henderson 2004
Sat	EAEC, UPEC	Diarrea, infecciones vía urinarias	Citotoxina vacualizante	Guyer 2000
EspP	EHEC	Diarrea con sangre Colitis hemorrágica	Citotoxina	Brunder 1997
Vat	APEC, UPEC	Colibacilosis, septicemia	Citotoxina vacuolizante	Parham 2005
CLASE II				
Pic	EAEC, UPEC, <i>Shigella flexneri</i>	Diarrea, infecciones de vías urinarias	Hemaglutinina, degrada complemento y muco, se uno al grupo Hem	Henderson 1999, Parham 2004
SepA	<i>Shigella flexneri</i>	Shigellosis	Inflamación intestinal	Benjelloun-Touimi 1995, proveance 1994
Tsh-APEC	APEC	Colibacilosis, septicemia	Hemaglutinina, adhesina para CR, Hb y MEC	Kostakioti 2004
Tsh-UPEC	UPEC	Infecciones de vías utinarias	Desconocido	Parham 2005
Hbp	<i>E. coli</i> extraintestinal	Infecciones de heridas y septicemia	Proteína secuestradora del grupo Hem	Otto 1998
EaaA/EaaC	<i>E. coli</i>	Desconocido	Desconocido	Sandt 2000
BoA	<i>Salmonella bongori</i>	Diarrea	Desconocido	NCBI AAW66606
EpeA	EHEC	diarrea con sangre y colitis hemorrágica	Desconocido	Leyton 2003
EspI	STEC	Diarrea y falla renal	Desconocido	Schimidt 2001
Eata	EPEC	Diarrea	Efecto Citopatico sobre células intestinales	Patel 2004
Aida	EPEC	Diarrea	Desconocido	NCBI ZP 00714135

SPATEs Clase I

Sat se identificó originalmente en la cepa de *E. coli* uropatógena (UPEC) CFT073 aislada de un paciente con pielonefritis aguda. El peso molecular que se calculó originalmente fue de 107 KDa (Mobley *et al.* 2000), sin embargo, en el presente estudio se determinó por espectrometría de masas que su peso molecular corresponde a 104.8 KDa. Es una proteasa con actividad citopática sobre células VERO, HK-2 y HEp-2 y en las líneas primarias de riñón CRL-1573 y CRL-1749 de vejiga (Guyer *et al.* 2000).

Similar a lo descrito en otras SPATEs, se ha comprobado que el efecto citopático a diferentes líneas celulares inducido por Sat, se relaciona con Ser²⁵⁶ la serina del sitio activo (Maroncle *et al.* 2006). Los ensayos *in vitro* con diferentes líneas de células, mostraron que Sat además induce efecto vacuolizante que se ha relacionado con el daño celular. Guyer *et al.* 2002 utilizó el modelo animal de ratones inoculados con la cepa UPEC productora de Sat y observó que la bacteria no sólo colonizaba la vejiga, riñón y el tracto urinario del animal, también mostró la formación de vacuolas en las células del tubo proximal, lo que confirmaba las observaciones *in vitro* con células en cultivo. Sat es una proteasa que además se ha identificado en cepas de *Shigella spp*, EPEC, EAEC y EHEC (Guyer *et al.* 2002; Niyogi *et al.* 2004; Hernández-Chiñas *et al.* 2008; Boisen *et al.* 2009).

Pet se identificó en una cepa de EAEC responsable de un brote de diarrea en un hospital pediátrico de la ciudad de México. Eslava *et al.* (1998), identificaron que la bacteria secretaba una proteína de alto peso molecular (≈100 KDa), que era reconocida por el suero de los niños infectados. Los genes que codifican para Pet se localizan en un plásmido de alto peso molecular (pAgg), relacionado con la virulencia de este grupo de bacterias (Nataro *et al.* 2005).

El análisis histológico de la necropsia del intestino del niño infectado con la cepa EAEC productora de Pet, mostró la presencia de daño semejante a enterocolitis con infiltrado inflamatorio de linfocitos y células plasmáticas y necrosis del epitelio glandular. En un estudio de modelo de asas ligadas de rata se desafiaron dos grupos de animales, un grupo se inoculó con la bacteria completa (EAEC productora de Pet) y otro grupo fue desafiado con fracciones purificadas de la toxina. El estudio histológico de ambas muestras de intestino, mostró la presencia de reacción inflamatoria intensa con hemorragia, necrosis y ulceración del epitelio (Eslava *et al.* 1993). En el grupo

desafiado con la toxina, además se observó un incremento en la liberación de moco, exfoliación de células y la presencia de ranuras entre las criptas (Eslava *et al.* 1993; Navarro-García *et al.* 1998; Sainz *et al.* 2002).

Ensayos *in vitro* realizados en cámaras de Ussing y empleando preparaciones de intestino de rata, se identificó que Pet también induce efecto de tipo enterotóxico (Navarro-García *et al.* 1998). Estos datos sugieren que los cambios electrofisiológicos del tejido, en estos se observó la presencia de un incremento de la corriente de corto circuito y decremento de la corriente eléctrica, efecto que indica alteración de la permeabilidad de la mucosa. Al analizar por microscopía de luz preparaciones utilizadas en este último ensayo, se observaron alteraciones del tejido similares a las descritas en los ensayos de asa ligada de rata (Navarro- García *et al.* 1999).

Al evaluar la actividad de Pet sobre células HEp-2 y HT29 en cultivo, se observó alteración de la morfología de las células con desprendimiento de la monocapa (efecto citopático), efectos que fueron dosis y tiempo dependientes (Navarro-García *et al.* 1998; Villaseca *et al.* 2000). Estas observaciones sugerían actividad de la toxina sobre citoesqueleto de las células ya que había pérdida de las fibras de estrés y liberación del contacto focal, lo que ocasionaba el redondeamiento de la célula (Navarro-García *et al.* 1999).

Así mismo, se demostró que el daño que sufre el citoesqueleto de la célula, se debe a un efecto de degradación sobre las cadenas α y β de la fodrina (o su homólogo espectrina), ocasionado por Pet (Villaseca *et al.* 2000). La ruptura de la fodrina se presenta entre los aminoácidos M¹¹⁹⁸ y V¹¹⁹⁹ en una hélice- α y dentro del dominio de unión a calmodulina (Canizales-Román y Navarro-García, 2003). Las diferentes propiedades identificadas en Pet están relacionadas con el motivo de Serin Proteasa de la toxina, ya que dichos

efectos fueron inhibidos al utilizar un inhibidor de proteasas PMSF (Fluoruro de fenilmetanosulfonilo), así como al observar los efectos utilizando la clona mutada en el motivo de serina (Pet S260I).

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

EspP fue descrita por Brunder *et al.* (1997), es una proteína extracelular de 104 KDa, secretada por una cepa de EHEC 0157:H7. Djafari *et al.* (1997), describieron la serina proteasa PssA (Protease secreted by STEC), secretada por una *E. coli* productora de toxina tipo shiga (STEC) del serotipo 026:NM (No Móvil), aunque ambas proteínas son idénticas y codificadas en un plásmido de virulencia de la bacteria, tienen diferentes actividades biológicas. EspP degrada la pepsina A y el factor V de coagulación (Brunder *et al.* 1997), mientras PssA tiene actividad de proteasa sobre la caseína y es citotóxica para células Vero (Djafari *et al.* 1997).

EspC se reportó que la cepa E2348/69 de *Escherichia coli* enteropatógena clásica (EPEC), secretaba una proteasa de alto peso molecular (de 110 KDa) con diferentes funciones. Es una proteína altamente inmunogénica y se han identificado anticuerpos tanto en el suero de voluntarios retados con EPEC (Jarvis *et al.* 1995), como en nuestras de leche materna (Stein *et al.* 1996, Manjarrez-Hernández *et al.* 2000).

Durante el estudio de EspC identificaron que comparte algunas de las propiedades descritas para Pet, tal es el caso del efecto de enterotoxina y la capacidad para degradar espectrina o fodrina (Navarro-García *et al.* 2004). También observaron que al igual que Pic de EAEC (Hernández-Chiñas *et al.* 2002) y Hbp de *E. coli* extraintestinal, EspC rompe la hemoglobina (Drago-Serrano *et al.* 2006).

SigA Proteasa de aproximadamente 103 KDa que es secretada por *S. flexneri*. El gen que la codifica (*SigA*) se localiza en la isla de patogenicidad *she*, por análisis funcional de la proteína se estableció que tiene capacidad para degradar caseína (Al-Hasani *et al.* 2000). SigA presenta alta identidad con Pet y al igual que esta proteasa induce efecto citopático en células HEP-2 y degrada la cadena alfa de la fodrina, esta última observación ha sugerido que la proteasa contribuye al daño celular observado durante la infección por *Shigella*. Por otro lado, los ensayos en el modelo de asa ligada en conejo, mostraron que SigA tiene actividad de enterotoxina, esta última propiedad así como la de citotoxina se han relacionado con la capacidad de degradación de la fodrina inducida por la proteasa (Al-Hasani *et al.* 2009).

SPATEs Clase II

Tsh fue uno de los primeros miembros de SPATEs descritos (Provence *et al.* 1994), con un peso aproximado de 104 KDa es secretada por cepas APEC. Inicialmente se consideró como hemaglutinina, sin embargo, se ha sugerido que degrada la

hemoglobina con lo que se libera el grupo Hemo (Stathopoulos *et al.* 1999), lo anterior se determinó al analizar la secuencia de aminoácidos en el dominio pasajero y observar que Tsh tiene una identidad de 99.9 % con Hbp (Hemoglobine protease), SPATE esta última secretada por una cepa de *E. coli* extraintestinal de origen humano (Otto *et al.* 1998). Además, tiene homología con la IgA proteasa de *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae*, pero a diferencia de estas dos proteasas Tsh no tiene la capacidad para degradar inmoglobulinas (Provence *et al.* 1994). El dominio pasajero de Tsh presenta una serina activa en la posición 259 de su secuencia, mutaciones en este aminoácido no inhiben la actividad hemaglutinante o la secreción extracelular de Tsh (Stathopoulos *et al.* 1999). Aunque el gen *tsh* ha sido identificado en cepas de UPEC, se desconoce si participa como factor de virulencia en las infecciones de vías urinarias asociadas a la infección por esta bacteria (Parham *et al.* 2005).

SepA es una proteína de 110 KDa que se identificó en *S. flexneri*. Su actividad se estableció al utilizar cepas mutantes de *sepA* en las que se observó que las bacterias perdían la capacidad para degradar la mucosa e inducir un proceso inflamatorio (Benjelloun-touimi *et al.* 1995; 1998).

Vat se identificó en el sobrenadante del cultivo de la cepa APEC (Ec222), e induce la formación de vacuolas en células (Perreira y Gyles 2003), efecto similar al descrito en Sat (Guyer *et al.* 2000) y VacA proteína autotransportada de *Helicobacter pylori* (Salvadori *et al.* 2001). Parham *et al.* (2005), realizaron un estudio buscando SPATEs en cepas de *E. coli* extraintestinal, los resultados mostraron una alta prevalencia de Vat en cepas UPEC.

EaaA y EaaC se identificaron en la cepa ECOR-9 *E. coli* aislada de un niño sano. Los genes de estas proteasas se encuentran relacionados con proteínas de superficie de la

bacteria cuya función es la unión de inmunoglobulina (IgG). Aunque, la función de EaaA y EaaC no ha sido confirmada experimentalmente, por el hecho de presentar alta identidad (99.4 %) con proteínas que unen IgG, se ha propuesto que pudieran participar en la degradación de la unión de las inmunoglobulinas a la bacteria (Sandt *et al.* 2000).

EspI y EpeA son proteínas secretadas por cepas del grupo STEC. El gen *espi* se encuentra en una isla de patogenicidad y el gen *epea* en el plásmido de la bacteria. EspI es capaz de degradar pepsina y apolipoproteína I y EpeA, al igual que Pic es capaz de degradar mucina, gelatina y pepsina. Además se identificó que inducen efecto citopático en células HEp-2 en cultivo (Leyton *et al.* 2003).

EatA se identificó en algunas cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), más tarde se mostró por ensayos *in vitro* que esta enzima tiene capacidad para degradar la pepsina y oligopéptidos conjugados con p-nitronilido, sustratos identificados para catepsina G; propiedades parecidas a las descritas para SepA, lo anterior sugiere la participación de EatA en la patógenesis de las cepas ETEC (Patel *et al.* 2004).

Pic El gen *pic* se encuentra en el cromosoma de cepas de EAEC, UPEC y *S. flexneri* (Gutiérrez-Jiménez *et al.* 2008). Originalmente se identificó en el locus cromosomal *pic/set* en *S. flexneri* 2A, dentro de la isla de patogenicidad *she* (Al-Hasani *et al.* 2001). En este locus se encuentran los genes que codifican para Pic, y una proteína homóloga llamada PicU, identificada en la cepa UPEC CFT073 (Henderson *et al.* 1999; Parham *et al.* 2004). Pic no posee propiedades enterotóxicas o citotóxicas, sin embargo, tiene la capacidad para degradar proteínas del complemento y mucina (Henderson *et al.* 1999; Dutta *et al.* 2002). La actividad como mucinasa descrita en Pic es dosis dependiente y su actividad reside en la secuencia GDSGSG característica en las proteínas de la familia SPATES y en este caso a su afinidad por la unión a monosacáridos que constituyen la

mucina (Gutiérrez-Jiménez *et al.* 2008). En un análisis sobre la identidad de Pic y otras SPATEs, se identificó una relación con Tsh y con Hbp (70 %). Se han hecho estudios para evaluar si Pic presentaba actividad de degradación de hemoglobina y los resultados obtenidos han mostrado que Pic al igual que Hbp y Tsh, tiene tanto la capacidad para romper el grupo hem, como la capacidad para unirse al hierro (Hernández-Chiñas *et al.* 2002). La actividad mucinolítica y de captación de hierro de Pic, sugiere una estrategia efectiva de la bacteria para la penetración de la capa de moco intestinal y/o la obtención de fuente de carbono, además de hierro para su actividad metabólica. Además se ha descrito PicU, como una proteína homóloga de Pic y ensayos *in vitro* han mostrado una actividad mucinolítica en la glándula submaxilar de bovino (Parham *et al.* 2004).

Modelo de Secreción de las SPATEs

Las proteínas son sintetizadas en el citoplasma, de donde son enviadas al espacio periplásmico atravesando la membrana interna con el uso del sistema de translocación SecYEG (Leyton *et al.* 2012). El péptido señal de algunas proteínas autotransportadas, interactúa con la integrasa YidC durante la translocación a través de la membrana interna, la cual retarda la liberación de estas proteínas hacia el periplasma, sin embargo una vez en dicho espacio estas proteínas requieren protegerse de otras proteasas existentes en este espacio y así mantener un estado óptimo para su translocación. Como ya se hizo referencia, en la biogénesis de las proteínas autotransportadas participan las chaperonas SurA, DegP y FkpA que uniéndose al dominio pasajero y al dominio β previenen la agregación y el plegamiento prematuro de la proteasa, mientras que la serina endoproteasa periplásmica DegP se une sólo al dominio pasajero (Knowles *et al.* 2009). Adicionalmente DegP puede actuar como un mecanismo de control de calidad

para remover complejos de agregados y/o proteínas mal plegadas, en cualquier momento durante su tránsito por el espacio periplásmico. Sin embargo, los autotransportadores unidos a chaperonas son dirigidos hacia el complejo de ensamblaje barril- β ó BAM, donde el oligómero BamA puede unir al barril naciente, plegarlos completamente y finalmente insertarlos dentro de la membrana externa (Rossiter *et al.* 2011). La translocación del dominio pasajero puede desencadenarse sobre la disociación del oligómero BamA y es sostenida hasta que el N-terminal extremo del dominio pasajero atraviesa el poro (Leyton *et al.* 2012). Después de la inserción del barril- β dentro de la membrana externa, el dominio pasajero es translocado hacia el exterior de la célula y plegado en su característica estructura hélice- β (figura 2).

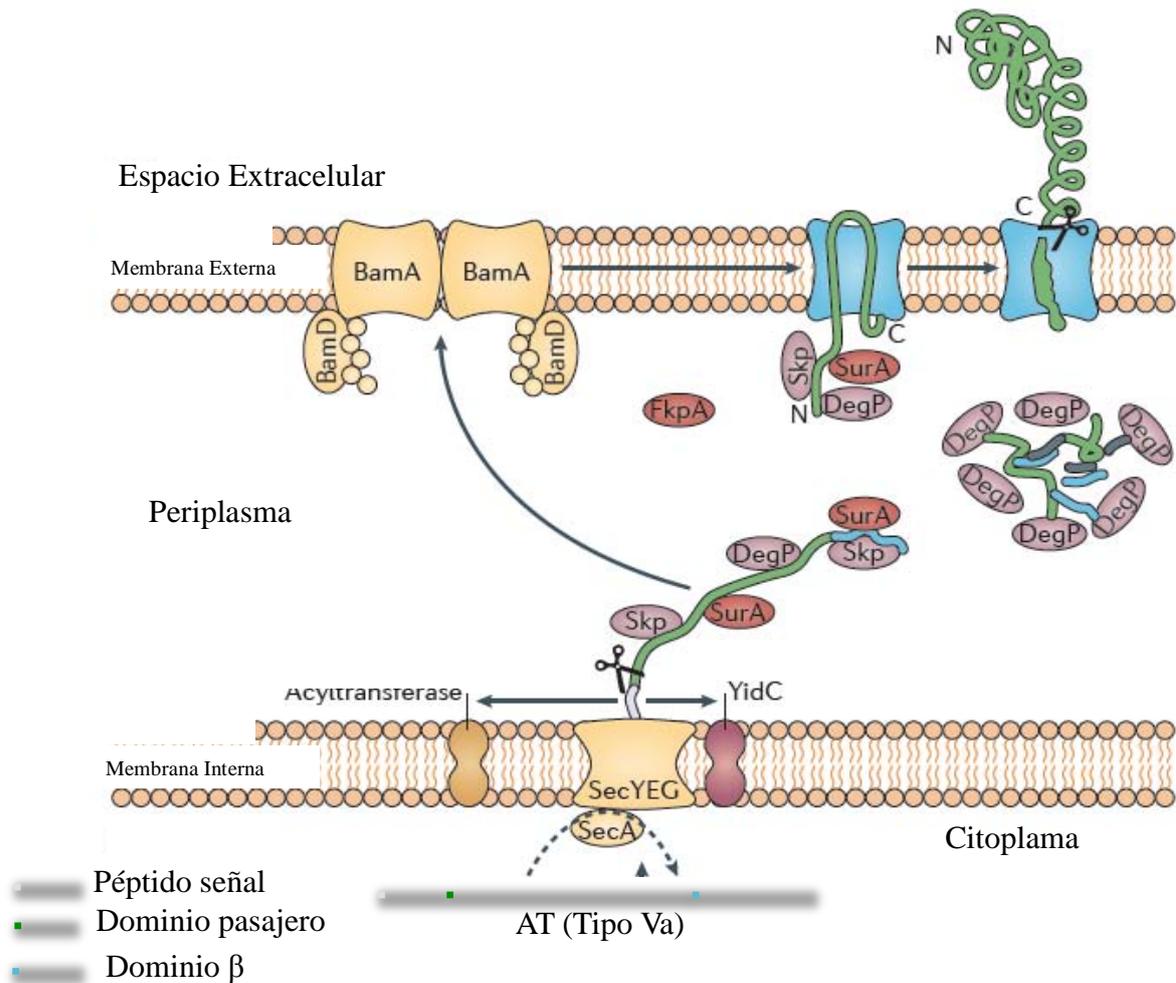


Figura 2. Biogénesis de proteínas autotransportadas. Las proteínas son sintetizadas en el citoplasma, de donde son enviadas al espacio periplásmico por el sistema de traslocación SecYEG. El péptido señal interactúa con YidC durante la translocación a través de la membrana interna, en donde las chaperonas Skp y SurA se unen al dominio pasajero y al dominio β del autotransportador, mientras que DegP se une sólo al dominio pasajero. Además DegP actúa como un mecanismo de control de calidad para remover complejos de agregados y/o proteínas mal plegadas, durante su tránsito por el espacio periplásmico. Los AT unidos a chaperonas son dirigidos hacia el complejo de ensamblaje β -barril ó BAM, donde el oligomero BamA puede unir al barril naciente, plegarlos completamente y finalmente insertarlos dentro de la membrana externa. (Leyton *et al.* 2012).

Algunas SPATE's son disociadas del translocon, el corte del dominio pasajero de la unidad de translocon puede ocurrir sobre la superficie de la bacteria ya sea en la región de unión al translocador o dentro de la región hélice- α (Oliver *et al.* 2003). Existe controversia con respecto al evento cuando el dominio pasajero se libera, ya que se desconoce si el corte es resultado de la actividad de proteasas unidas a membrana o un evento autoproteolítico. En algunos casos como el de App y EspP de *Neisseria meningitidis* y *EHEC*, respectivamente; se ha mostrado que es un evento

autoproteolítico (Serruto *et al.* 2003, Leva y Bernstein, 2009). Sin embargo, lo anterior no es constante en todos los casos, ya que en ocasiones las SPATEs se siguen liberando al espacio extracelular a pesar de haber mutado el sitio activo de la enzima (Eslava *et al.* 1998).

Importancia epidemiológica de las SPATEs

Dentro de las bacterias que han sido mencionadas como productoras de algunos de los miembros de la familia SPATEs destacan *E. coli* y *S. flexneri*, éstos microorganismos son responsables de causar enfermedades que representan serios problemas de salud pública en diferentes partes del mundo, pero principalmente en países en desarrollo (Henderson *et al.* 2001).

Se han realizado análisis filogenéticos de *E. coli* por diferentes procedimientos (Herzer *et al.* 1990; Clermont *et al.* 2000; Escobar-Páramo *et al.* 2004), que han permitido definir cuatro grupos clonales de la bacteria designados como A, B1, B2 y D. En los grupos A y B1 están las cepas comensales y algunas relacionadas con la patogénesis de la diarrea, mientras en los grupos B2 y D se encuentran las cepas que causan infecciones extraintestinales, aunque, se ha observado que en el segundo grupo las cepas contienen menos genes asociados a virulencia. Reitieri *et al.* (2007) utilizando una colección de cepas de *E. coli* de los grupos asociados con la etiología de la diarrea (ECOR), analizaron la presencia por PCR de los genes *tsh*, *vat*, *sat*, *espP*, *sigA*, *espC*, *eatA*, *pet*, *eaaA/eaaC*, *pic*, y *aida-I*, que codifican para las SPATEs respectivamente. En dicho estudio los resultados sugieren una relación entre la presencia de algunos de los genes para las SPATEs y el grupo filogenético y/o patotipo. Así, *vat*, *sat* y *pic* se identificaron en el grupo B2 y D que integran a cepas relacionadas con infecciones extraintestinales, lo cual resulta interesante ya que las tres SPATEs se han identificado principalmente en cepas de UPEC. Los genes *eaaA/eaaC* se identificaron en el grupo

filogenético A, en este se incluyen tanto cepas comensales de la biota natural como algunas causantes de diarrea. Estos resultados sugieren una distribución filogenética específica de ciertas SPATEs, además, concuerdan con los datos reportados por Parham *et al.* (2005), quienes identificaron varias SPATEs utilizando iniciadores degenerados de una región conservada del translocon o dominio β de las proteasas.

ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

Dicroísmo circular

La espectroscopía de Dicroísmo Circular se emplea para el análisis de la estructura secundaria de proteínas en solución (Kelly *et al.* 2000). El dicroísmo circular se presenta cuando cromóforos en un ambiente asimétrico interactúan con luz polarizada. En las proteínas los grupos con mayor actividad óptica son, los enlaces peptídicos (absorben debajo de 240 nm), las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos (absorben entre 260-330 nm) y los enlaces di-sulfuro (absorben a 260 nm). Proteínas y polipéptidos poseen regiones con motivos altamente ordenados, como consecuencia se pueden determinar las hojas β , hélices- α y giros- β (Figura 3), cada uno de estos motivos presenta espectros de dicroísmo circular característicos (Norman J. Greenfield *et al.* 1996).

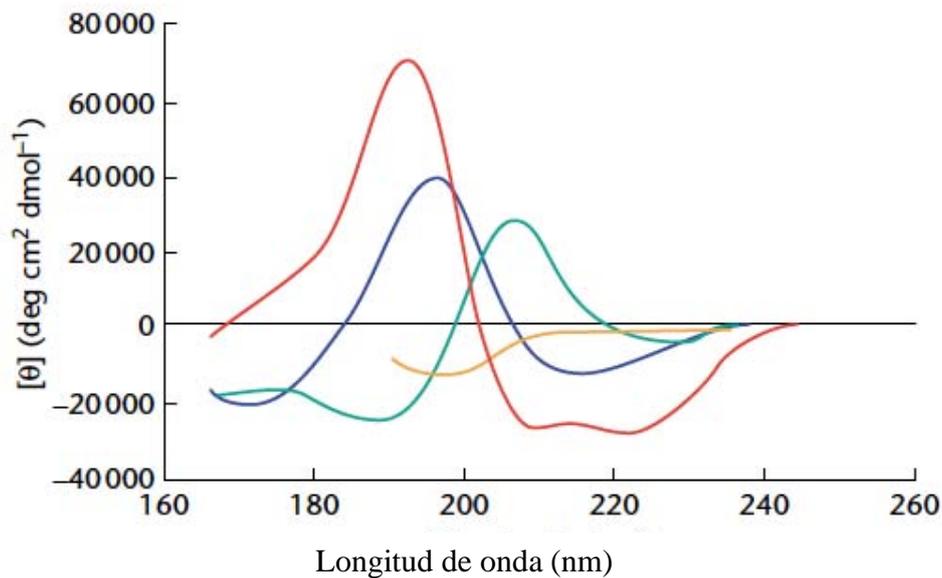


Figura 3. El espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano es asociado con los tipos de estructura secundaria que presentan las proteínas; hélices- α (rojo) hojas- β antiparalela (azul), giro β tipo 1 (verde) y estructura irregular (Naranja) (Nicolas C. Price *et al.* 2001).

La composición de estructura secundaria se estima por debajo de 240 nm (espectro de UV-lejano). Con base en su estructura secundaria las proteínas han sido divididas dentro

de 5 grupos: Proteínas α (principalmente hélices- α), proteínas β (Principalmente hojas- β), proteínas $\alpha + \beta$ (regiones separadas de hélices- α y hojas- β), proteínas α / β (hélices- α intercaladas con hojas- β). Así mismo esta técnica también es utilizada para estudiar modificaciones de estructura terciaria de proteínas bajo diferentes condiciones utilizando el espectro de UV-cercano (250-320 nm) (Kelly M. *et al.* 2005).

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica, que permite el análisis de plegamiento y desplegamiento de las proteínas en función de condiciones como: temperatura, concentración de proteína y pH (Norman J. Greenfield *et al.* 2006). Scaglione *et al.* (2008) mostraron que Pet mantiene la mayor parte de su estructura secundaria y terciaria a 37 °C, con una significativa pérdida de la misma después de los 50 °C, por otro lado, Renn *et al.* (2008), señalan que Pet al igual que pertactina de *B. pertussis*, exhiben un desplegamiento estructural en 2 etapas cuando son tratadas con diferentes concentraciones de clorhidrato de guanidina, así como también refieren la estructura de un núcleo estable en la parte C-terminal de ambas proteínas.

Cristalización y difracción de rayos X

En biología estructural la técnica de mayor para el diseño de fármacos es la cristalografía con rayos X, la cual es una herramienta muy útil para obtener información estructural de proteínas a nivel atómico. Los pasos fundamentales empleados para definir una estructura proteica son los siguientes: a) purificación y cristalización de la proteína; b) difracción, colección y procesamiento de datos; c) determinación de fases; d) construcción y refinamiento de la estructura (Figura 4). Por otro lado la obtención de los datos de difracción se ha mejorado gracias al desarrollo de nuevos detectores como los de placas de imagen de fósforo y los dispositivos de carga acoplada o detectores CCD por sus siglas en inglés (Bernhard Rupp and Katherine A. Kantardjieff. 2nd Edition, chapter 47).

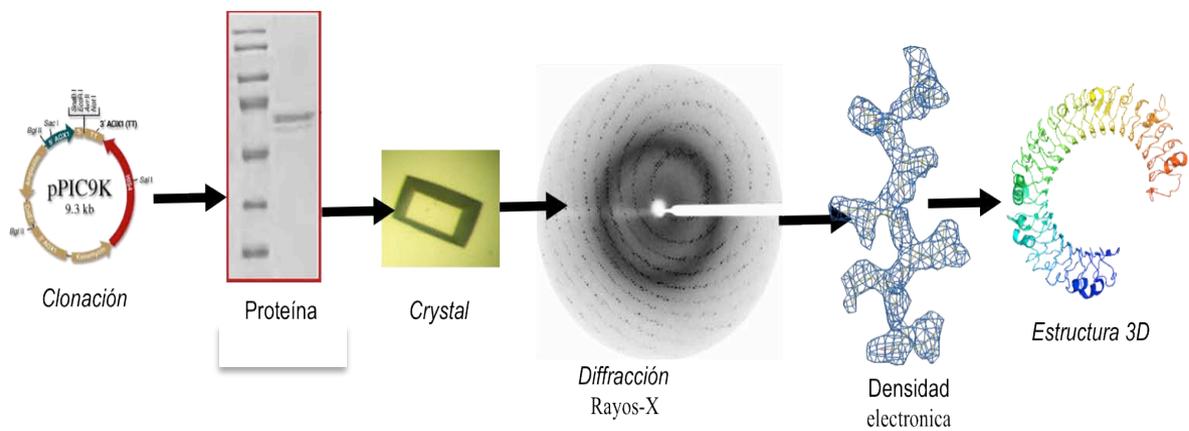


Figura 4. Pasos para la obtención de una estructura tridimensional. Clonación del gene específico, producción y purificación de la proteína, obtención los cristales y difracción por rayos X. La información mostrada en esta imagen fue tomada de la presentación de una clase del Dr. Enrique Rudiño del Instituto de Biotecnología, UNAM).

Así mismo una mayor disponibilidad para el uso de sincrotrones y nuevas técnicas de crioprotección de los cristales, ha hecho posible la obtención de datos en cristales de proteínas de tamaños desde unas pocas μm de tamaño. En el proceso de cristalización de proteína se debe persuadir a las moléculas de proteína para que pasen del estado líquido a un estado cristalino. Esto se logra mediante la reducción de la solubilidad de la molécula mediante la eliminación de agua de manera paulatina por difusión de vapor (Figura 5).

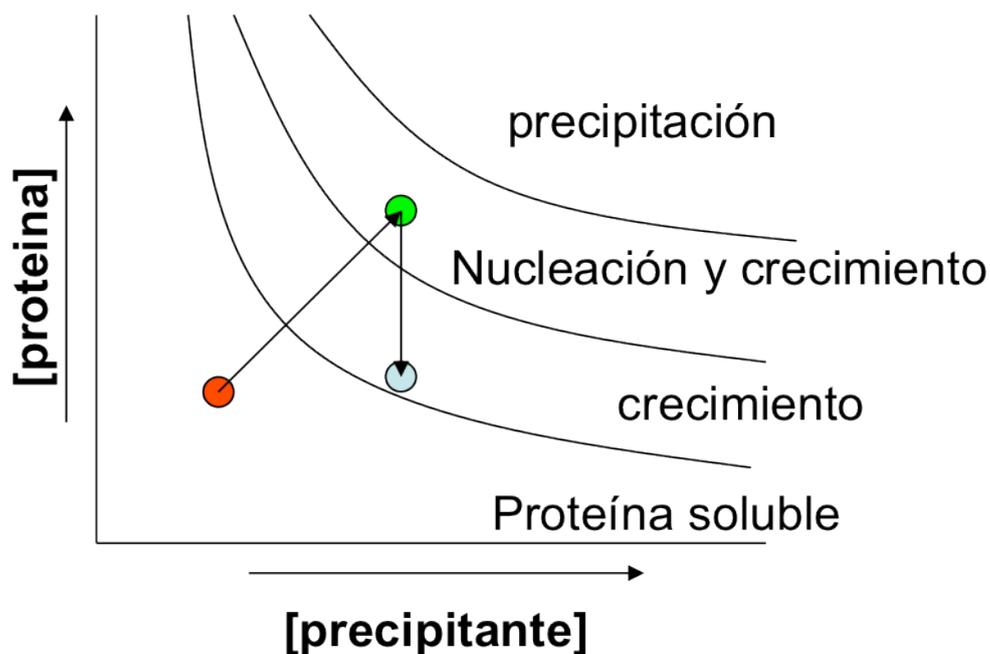


Figura 5. Cinética de formación de cristales por difusión de vapor. El proceso de cristalización de proteínas se lleva a cabo por separación de fases, en donde se reduce la solubilidad utilizando una solución supersaturada, desde donde se inicia la nucleación y los cristales pueden crecer mientras el sistema retorna a su equilibrio termodinámico (La figura fue tomada de la presentación de una clase de cristalografía impartida por el Dr. Enrique Rudiño del Instituto de Biotecnología, UNAM).

Los expertos en cristalografía utilizan diferentes métodos para lograr la sobresaturación de proteínas en solución, a partir de la cual se obtendrán cristales singulares y de calidad perfecta para los experimentos de difracción de rayos X. Entre estos métodos se incluyen la difusión del vapor (hanging, sitting y sandwich drop variations), micro lotes, microdiálisis y difusión libre de la interfaz. En la difusión del vapor, el equilibrio se establece entre una pequeña gota con volumen desde 100 nl hasta pocos μ l, que contiene aproximadamente cantidades iguales de la solución de proteína purificada y de un coctel precipitante, y finalmente un depósito más grande (100-1000 μ l) del mismo coctel (Figura 6).

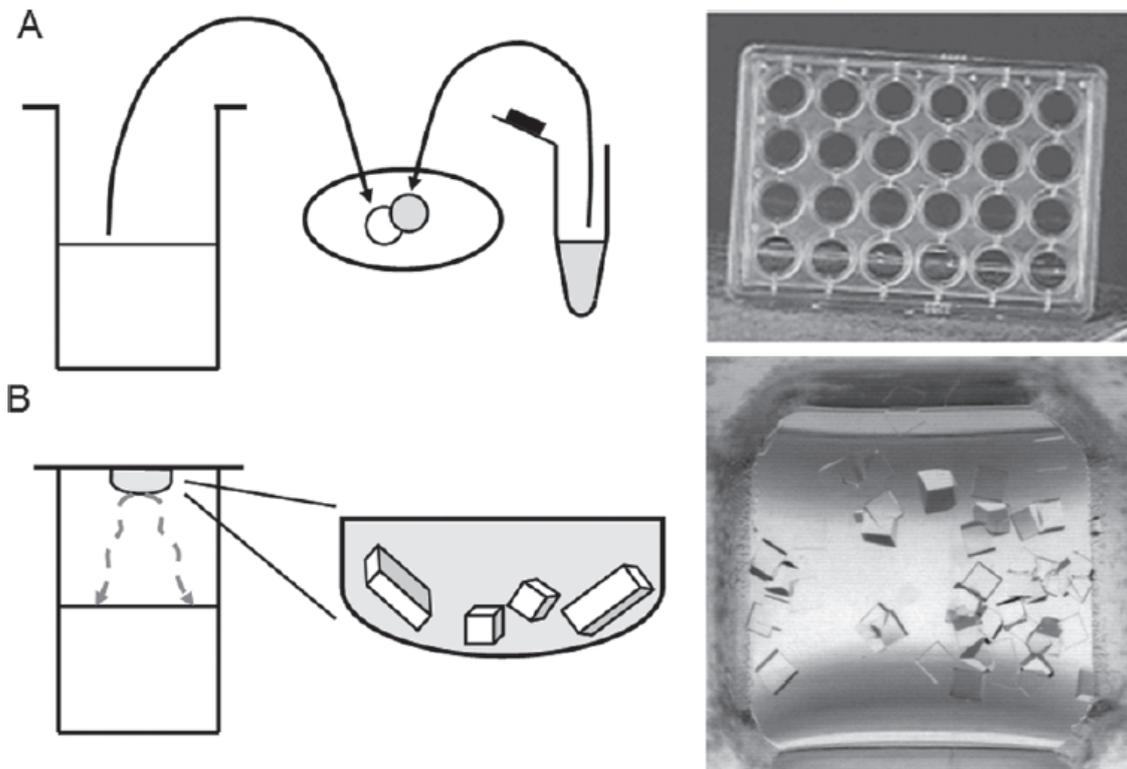


Figura 6. Principio de cristalización de proteína por difusión de vapor. Procedimientos para las técnicas de gota sedente (parte superior izquierda) y gota colgante (Parte inferior izquierda). A) gotas (μl) de la solución precipitante y la proteína se mezclan en un portaobjetos de vidrio con silicón, el cual es volteado para sellar el reservorio. De esta manera los cristales crecen en un lapso de unos pocos días a semanas mientras las soluciones se equilibran por difusión de vapor. B) Una placa de 24 pozos para la técnica de gota colgante (parte superior derecha), y cristales (Parte inferior derecha) en pozo utilizando la técnica de gota sedente (Bernhard Rupp and Katherine A. Kantardjieff, *Molecular Biomethods Handbook*, 2nd Edition, chapter 47).

El coctel precipitante usualmente contiene amortiguador orgánico débil, con precipitantes como sal, polietilenglicol (PEG), aditivos y en algunos casos detergentes, todo esto para mejorar el proceso de cristalización. Como componentes volátiles se utiliza generalmente agua, la cual es evaporada y reabsorbida en el reservorio, así, la concentración de la proteína y el precipitante aumentan. Una vez que el sistema alcanza el estado supersaturado es posible que la fase de solución pase a fase cristalina y si la cinética es favorable los cristales pueden formarse y crecer (Bernhard Rupp and Katherine A. Kantardjieff, *Molecular Biomethods Handbook*, 2nd Edition, chapter 47).

Análisis Estructural de las SPATEs

A pesar de la amplia diversidad en cuanto a longitud, secuencia y función, la mayoría de los dominios pasajeros de las proteasas autotransportadas se pliegan dentro de la característica estructura helicoidal- β tipo tallo “ β -stalk”, interconectados por asas de variadas distancias (Yen *et al.* 2010). La Pertactina fue el primer dominio pasajero de proteínas autotransportadas de la cual fue resuelta su estructura (Emsley *et al.* 1996). Pertactina está conformada por una estructura uniforme de hélice- β compuesta por 16 vueltas, cada una de las cuales a su vez está integrada por tres hojas- β paralelas conectadas por diversas asas (loops) con secuencias específicas que facilitan la función de la proteína. Subsecuentemente, las estructuras de los dominios pasajeros de Hbp (Otto *et al.* 2005), IgAP (Jhonson *et al.* 2009), EspP (Khan *et al.* 2011), VacA (Gangwer *et al.* 2007) y Hap (Meng *et al.* 2011), fueron resueltas revelando hélices- β plegadas. En el caso de Hbp e IgAP, en estas se incluye un dominio globular largo (dominio1), que posee un plegamiento semejante al de tripsina (trypsine-like) que se fija rígidamente a la parte amino terminal de la estructura de hélice- β , así mismo poseen un dominio más flexible (dominio 2) que se pliega independientemente de la parte hélice- β con movimiento independiente y asas adicionales (dominios 3 y 4) que son insertados entre las hebras- β y hélice- β que se extienden lejos de la estructura helicoidal- β principal. Aunque el plegamiento general del dominio pasajero de EspP es muy similar al plegamiento del dominio pasajero de Hbp e IgAP, diferencias estructurales incluyen la ausencia del dominio 2, y un dominio 3 mucho más voluminoso que comprende un asa desordenada, el cual contiene dos residuos de cisteína (Khan *et al.* 2011). Trabajos recientes han demostrado que el corte del dominio pasajero en Hap, es estructuralmente similar a los de Hbp e IgAP, con dominios 1-4 sobresalientes, y retornando a la estructura helicoidal- β en las mismas posiciones (Otto *et al.* 2005 y Jhonson *et al.* 2009). Además, dentro de las diferencias estructurales se incluye un dominio 2 más

pequeño en el dominio pasajero de Hap en la parte C-terminal de la estructura, ambos potencian una oligomerización intermolecular, la cual resulta en interacciones célula-célula. Este mecanismo de oligomerización intercelular puede mediar agregación bacteriana y la formación de biopelículas (Gawarzewski *et al.* 2013) y Ag43 (Heras *et al.* 2014). De manera notable, se encuentran diferencias estructurales sutiles en el dominio 1 de Hbp, IgAP, EspP y Hap, al parecer estas diferencias juegan un papel importante en la especificidad de sustratos. Después de la secreción, la toxina VacA de 88 KDa es procesada de manera natural en fragmentos de 33 y 55 KDa (designados como p33 y p55, respectivamente), los cuales permanecen asociados después de la ruptura y adoptan una estructura muy particular conocida como “star-shaped single-layered”, las cuales contienen seis o siete plegamientos simétricos que se adecuan para la promoción en la formación de canales en membranas biológicas (Czajkowsky *et al.* 2006). Existen notables excepciones en cuanto a la característica estructura hélice-β: Algunos ATs con dominio pasajero que comprende un plegamiento globular rico en hélices-α y asas pero que no posee hélice-β ni dominio AC (Leyton *et al.* 2012) (Figura 7).

Yen *et al.* (2008), después de realizar un análisis bioinformático del dominio pasajero de diferentes SPATEs, observaron que de un total de ~1200 residuos, 173 eran conservados y sugieren que estos contribuyen a la estabilidad estructural y la capacidad funcional de las proteasas. La mayor parte de los aminoácidos conservados (122 de los 173 aminoácidos), se encuentran en la hélice-β, siendo estos principalmente de tipo hidrofóbico, lo que indica que interacciones no polares participan en la estabilidad estructural de la hélice-β. En el dominio globular, se encuentran motivos como el de serina proteasa G²⁵⁷DSGS (Fink *et al.* 2001), y otros reportados por Yen *et al.* (2008) DFS y DxLHKxGxGxL, LKxGxGxVxL y RlxKxVxE que por su cercanía

(~11 Å) al sitio catalítico, se han relacionado con su posible participación en la actividad catalítica de las SPATEs (Yen *et al.* 2008).

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

Dutta *et al.* (2003) identificaron dominios funcionales relacionados con la estructura del dominio pasajero de Pet, utilizando mutagénesis por transposones (scanning linker mutagénesis). Después de realizar 92 mutaciones distribuidas en el dominio pasajero observaron la presencia de tres dominios principales, el primero es el dominio catalítico localizado en la región N-terminal, el segundo se identificó en la parte central y participa en la unión e internalización a células epiteliales, el último se encontró en la región C-terminal y está relacionado con la secreción de la proteasa.

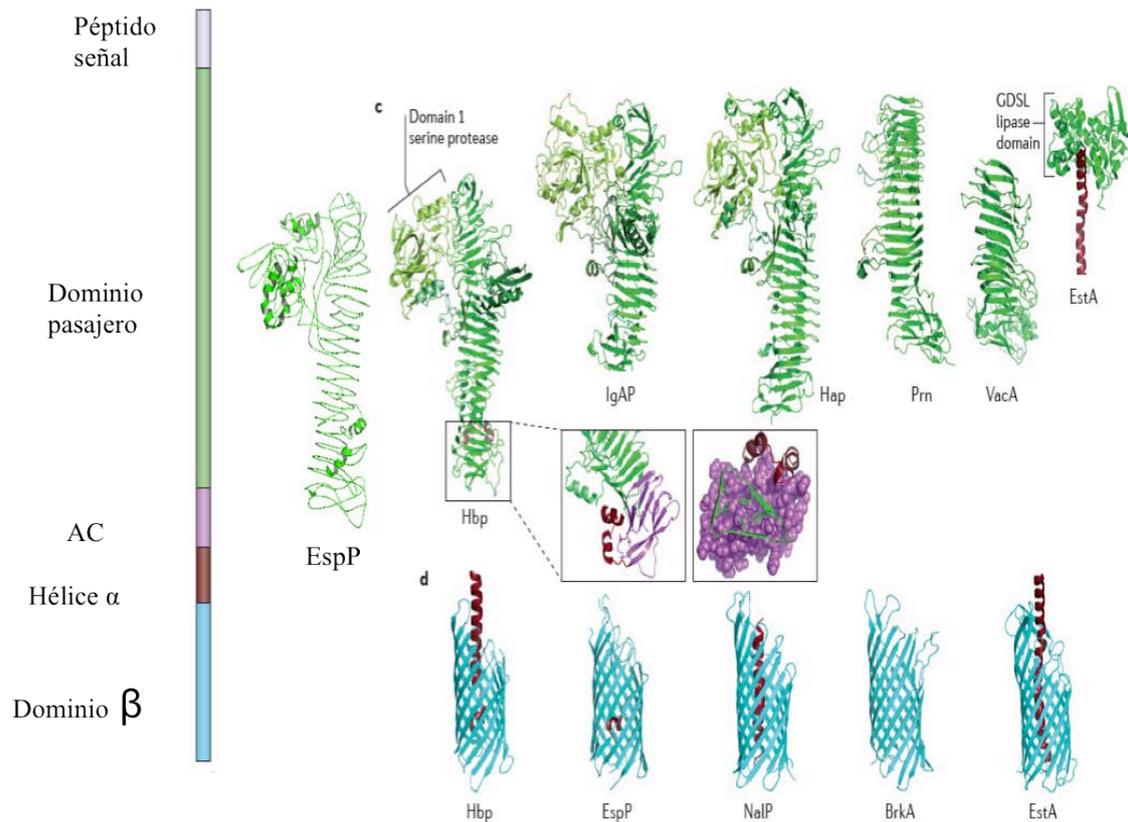


Figura 7. Estructura de autotransportadoras clásicas. Las secuencias señal para la mayoría de las proteínas autotransportadas adoptan una organización tripartita clásica, con un dominio cargado (N), otro hidrofóbico (H), el sitio de reconocimiento para la peptidasa señal y el dominio 1 de serina proteasa (C). Dominios pasajeros de autotransportadas que han sido resueltos por cristalografía de rayos X; Hemoglobina binding protease (Hbp) de *Escherichia coli* (PDB ID 1WXR), Inmunoglobulina A1 proteasa (EgAP) de *Haemophilus influenzae* (PDB ID 3HO9), de adhesión (Hap), también de *H. Influenzae* (PDB ID 3SYJ), pertactin (Prn) de *Bordatella pertussis* (PDB ID 1DAB) y la citotoxina vacuolizante autotransportada (VacA), el fragmento p55 de *Helicobacter pylori* (PDB ID 2QV3) (Leyton *et al.*2012).

Actividad Proteolítica de las SPATEs

La mayoría de las SPATEs descritas previamente, han sido identificadas en bacterias patógenas principalmente para humanos. Las funciones asignadas para estas proteínas son variadas, lo cual se debe principalmente al motivo de serina proteasa GDSGS, donde la primera serina es el residuo catalítico. Dutta *et al.* (2002), realizaron un análisis comparativo en relación a las funciones biológicas descritas para las SPATEs. Cada proteína se incubó con sus sustratos biológicos en donde se destaca de manera importante una actividad compartida entre Sat y Pet, SPATEs que confieren propiedades citotóxicas y citopáticas al grupo de EAEC. Ambas proteasas rompen las cadenas α y β de la espectrina eritroide o de la fodrina de células nucleadas (Villaseca *et al.* 2000), lo anterior en gran medida podría explicar el efecto de ambas proteasas sobre los enterocitos y sus efectos sobre tejido de rata en estudios electrofisiológicos

(Navarro-García *et al.* 1999). Por otro se ha propuesto que Pet y Sat poseen afinidad sobre péptidos de características hidrofóbicas, así mismo, se ha sugerido que Sat posee actividad sobre péptidos de carácter positivo, efecto que no se observa en Pet (Dutta *et al.* 2002). Lo anterior confirma que no obstante la alta similitud que muestran Sat y Pet, existen diferencias entre sus actividades biológicas (Guignot *et al.* 2006, Navarro-García F. *et al.* 2007^a, 2007^b, Betancourt-Sanchez M *et al.* 2009). Tal situación es un elemento de peso para realizar estudios que permita conocer las características estructurales con los que se contará con más elementos para entender su funcionalidad y de manera alterna proponer estrategias para interferir con su actividad así como para el desarrollo de sistemas para su detección.

2. Planteamiento del Problema

Son pocos los trabajos que han abordado la caracterización bioquímica de las SPATEs, por otro lado, el análisis de las estructuras tridimensionales de este grupo de proteasas ha permitido entender mejor la relación que guarda la estructura con respecto a su actividad. La cristalografía y la difracción de rayos X, son procedimientos que permiten realizar estudios estructurales de las proteínas, con respecto a las SPATEs este procedimiento de caracterización ha permitido identificar dominios pasajeros, así como la porción C-terminal. Es a través de este conocimiento que se ha podido proponer el mecanismo de ensamblaje y secreción de las mismas, para finalmente analizar los sitios activos de las proteasas, así como la identificación de sus sitios blanco en las células. Un hecho relevante entre Sat y Pet es la alta identidad que presentan en su secuencia de aminoácidos, sin embargo, aunque comparten ciertas actividades biológicas, entre Sat y Pet también existen diferencias importantes que sólo podrían ser entendidas al conocer sus características estructurales.

Justificación

Es bien conocida la importancia clínica y epidemiológica de *E. coli*, una de las bacterias productoras de Sat y Pet. Esta bacteria está involucrada tanto en la patogénesis de cuadros de diarrea como en infecciones de vías urinarias, ambos padecimientos causan graves daños a la economía de los países e importantes daños en la población afectada. Por lo que entender plenamente los factores involucrados en su patogénesis, permitiría implementar estrategias para su tratamiento o inactivación. El conocimiento de las diferencias estructurales de Sat y Pet permitiría entender y determinar que no obstante su alta identidad presentan diferencias en sus funciones biológicas. Por tal motivo en el presente trabajo nos proponemos implementar procedimientos para la obtención y purificación de Sat y Pet. Con respecto a la estructura secundaria de estas proteínas únicamente ha sido reportada para Pet y no para Sat. Por lo tanto consideramos conveniente identificar la estructura secundaria de Sat para evidenciar las diferencias o similitudes de ambas proteínas. Posteriormente, se definirá si es posible la estructura tridimensional de ambas proteasas por cristalografía y difracción de rayos X.

3.Hipótesis

La estructura tridimensional de Pet presenta diferencias con respecto a la de Sat obtenida por modelaje, lo que permite entender las diferencias en su actividad biológica.

4. Objetivo General

Conocer la estructura tridimensional por difracción de rayos X de Pet, la evaluación de estructura secundaria y la actividad biológica de Sat.

5. Objetivos Particulares

1. Purificar Sat y Pet
2. Evaluar las propiedades biológicas de Sat
3. Analizar la estructura secundaria de Sat
4. Realizar la cristalización de Sat y Pet
5. Conocer la estructura tridimensional de Sat y Pet
6. Analizar la estructura tridimensional de Sat y Pet

6. MÉTODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron las clonas de *E. coli* HB101(pCEF2) productora de Pet, portadora del gen *pet* clonado al plásmido pSPORTI entre los sitios de restricción *mluI* y *kpnI*, con una mutación en el sitio catalítico (S260I) y resistencia a ampicilina (Eslava *et al.* 1998) y *E. coli* HB101 (pDG7) portadora del gen de *sat* clonado de la cepa UPEC CFT073 y localizado entre los sitios de restricción Kpn 1/Sac 1 del plásmido pBLUESCRITP SK (-) con resistencia a ampicilina (Guyer *et al.* 2000). Previo a la obtención de las proteasas (Pet y Sat) se corroboró la pureza e identidad de las cepas, para esto se cultivaron en gelosa sangre y agar Mac Conkey. Las cepas caracterizadas se mantuvieron en medio con glicerol a -80°C y en tubos de gelosa especial hasta su empleo.

6.2 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PET Y SAT

6.2.1 Expresión. Las condiciones de cultivo e inducción de la expresión de la proteína y su purificación fueron desarrolladas de acuerdo al procedimiento descrito por Villaseca *et al.* (2000) con algunas modificaciones. De acuerdo a este procedimiento tubos con 5 ml de LB (Luria Bertain), se inocularon de manera independiente con 5 colonias de cada cepa previamente crecidas en medio LB agar (37°C/18hrs), los tubos se incubaron durante 5 horas a 37 °C con agitación continua (250 rpm). De este cultivo se tomó 1 ml para inocular 1 litro (en un matraz de 2 litros) de medio de autoinducción sin lactosa (Studier *et al.* 2005) adicionado con ampicilina (100 µg/ml) e incubado a 37 °C durante 18 horas con agitación continua (250 rpm.).

El cultivo se centrifugó a 12,000 g (Sorvall RC5) durante 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante del cultivo se precipitó con sulfato de amonio a una saturación de 40 % (220 g/L), se dejó en reposo por 4 horas a 4 °C y para recuperar las proteínas

precipitadas se realizó centrifugación a 12,000 g (Sorvall RC5) durante 30 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se homogenizó con agua desionizada fría estéril con una concentración final de 5 mM de inhibidor PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride). Para eliminar el sulfato de amonio la suspensión se dializó primero contra agua desionizada durante un día y otro día más con buffer Tris-HCL 0.05 M y EDTA 0.005 M pH 8.0 (Buffer A) a 4 °C utilizando una membrana con corte de 12-14 kDa (Spectrum labs. CA, USA). La muestra dializada se colocó en tubos falcón de 50 ml y se centrifugó a 1,865 g (Sorvall RC5) por 10 minutos a 4 °C para recuperar las proteínas precipitadas ó para eliminar las proteínas insolubles.

6.2.2 Cromatografía. El precipitado proteico obtenido se purificó por procedimientos de cromatografía, para esto una columna de 1.5 cm de diámetro por 57 cm de largo se empacó con la resina de intercambio aniónico Q-sepharose (Pharmacia, USA) equilibrada con 3 volúmenes de amortiguador A, posteriormente la muestra se cargó utilizando 3 volúmenes de amortiguador A con un flujo de 1 ml/min obteniendo fracciones de 5 ml. La elución se realizó con 2 volúmenes de amortiguador B al 25 % (amortiguador A más NaCL 0.075 M pH 8.0) y 2 volúmenes de amortiguador C (amortiguador A más NaCL 0.3 M pH 8.0).

La fracción obtenida se procesó por cromatografía de intercambio catiónico empleando FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) en columna Mono S HR 5/5 (Pharmacia, USA). La columna se equilibró con amortiguador D (0.05 M Tris-HCL en 0.01 M de EDTA pH 6.8) seguido de un gradiente salino utilizando amortiguador E (amortiguador D más NaCL 0.3 M pH 6.8) y un flujo de 0.5 ml/min colectando fracciones de 1 ml. El perfil de elución se analizó empleando una longitud de onda de 280 nm.

En cada paso del proceso de purificación, la cantidad de proteína se evaluó midiendo la concentración de la misma por el micro ensayo en placa del método de Bradford (Bradford *et al.* 1976) con lectura a 595 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro (Dynatech MR 580), como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (BSA).

6.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). La pureza de las proteasas en estudio (Pet y Sat), se analizó por SDS-PAGE al 8 % bajo condiciones desnaturalizantes, con 0.1 % (w/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS) en presencia de β -mercaptoetanol (Laemli *et al.* 1979). Las dimensiones del gel fueron de 7 cm x 8 cm con un espesor de 1.0 mm. Las proteínas se separaron aplicando un voltaje constante de 70 V para el gel concentrador y 100 V para el separador. El corrimiento de las proteínas se visualizó tiñendo los geles con azul de Coomassie R (Sigma-aldrich, USA). Para identificar el desplazamiento de las proteínas y considerar el peso molecular aproximado, se utilizaron proteínas preteñidas de pesos moleculares conocidos (Marcador, Bio-Rad, USA).

6.4 SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas separadas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de polyvinyldene fluoride (PVDF) (Bio-Rad, USA) de acuerdo al procedimiento descrito por Edman P. (1950) y Towbin *et al.*(1979). La transferencia se realizó utilizando amortiguador Tris (0.25 % w/v), glicina (1.2 % w/v) y metanol (16.6 % v/v) a 200 mA constante por 90 minutos. Las bandas correspondientes a los pesos moleculares de Sat y Pet se cortaron de la membrana y se sometieron al análisis de secuencia con un secuenciador Porton Beckman 2090-E gas-phase protein sequencer (Dr. Guillermo Mendoza Hernández, Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, UNAM).

6.5 PESO MOLECULAR POR IONIZACIÓN ELECTROSPRAY (ESI)

El peso molecular de la proteína Sat purificada se definió primeramente por separación en una columna de fase reversa C8 (Poroshell 2.1 x 150 mm) y posteriormente por análisis de la muestra en un espectrómetro ultra masa LTQ-FT (Thermo) utilizando un gradiente de acetonitrilo (ACN) 10 %-60% con ácido fórmico 0.1 % en un período de tiempo de 15 minutos (Aguirre *et al.* 2011).

6.6 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN CONEJO

La fracción de proteínas obtenida por SDS-PAGE con peso de aproximadamente 105 kDa, se cortó y se mezcló con adyuvante incompleto de Freund hasta obtener una suspensión homogénea (Villaseca *et al.* 2000). Se inoculó 1 ml de esta suspensión por vía intradérmica a conejos Nueva Zelanda administrando una dosis cada 15 días. En total se aplicaron 5 dosis, antes de la primera y última inmunización se tomaron muestras de sangre (10 ml) para tener un suero preinmune y evaluar la respuesta de los sueros contra Sat respectivamente. En caso de presentar títulos altos de anticuerpos, previa anestesia los conejos se sangraron a blanco. La sangre obtenida se dejó coagular por 1 hora a 37⁰C, el suero se separó por centrifugación a 2,000 g (Sorvall RT 6000D) por 15 minutos a 4⁰C y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -20 ⁰C hasta su uso.

6.7 WESTERN BLOT

Las proteínas separadas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, USA) de acuerdo al procedimiento descrito por Towbin *et al.* (1979). La transferencia se realizó utilizando amortiguador Tris (0.25 % w/v), glicina (1.2 % w/v) y metanol (16.6 % v/v) a 200 mA constante por 90 minutos. La eficiencia de la transferencia se analizó con una tinción reversible, utilizando rojo de Ponceau (0.01 %). Una vez corroborada la presencia de proteínas, la membrana se destiñó con PBS. Los espacios libres se bloquearon con leche descremada al 5 % en PBS (PBS-L),

por 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Para evaluar la respuesta de los anticuerpos previamente obtenidos, la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween 5 % (5 min c/u), posteriormente las membranas se incubaron con el suero diluido 1:300 en PBS-L por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. La respuesta se visualizó al incubar la membrana con anti-IgG de conejo obtenida en cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed, USA) a una dilución de 1:3500 en PBS-L. La reacción se hizo evidente agregando BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, USA) y se detuvo con agua corriente.

6.8 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE SAT

6.8.1 Actividad proteolítica sobre caseína marcada

El perfil de actividad proteolítica de Sat se analizó utilizando como sustrato Caseína marcada (Sigma Aldrich), alícuotas de Sat purificada fueron equilibradas por diálisis toda la noche en buffer universal (Perrin D. 1974), en un intervalo de pH 3-10 a 4⁰C, se mezclaron 3 µg de Sat con 20 µl de caseína marcada en un volumen de reacción de 50 µl a 37⁰C. La actividad fue medida en un fluorometro Ollis (On line Instrument system, Inc) después de 24 horas de incubación (Cleeman and Karuso 2008).

7.2 Actividad Proteolítica de Sat Sobre Proteínas de Membranas

La degradación de espectrina se realizó utilizando el procedimiento descrito previamente por Villaseca *et al.* (2000). Brevemente, 25 ml de sangre de carnero fueron lavados 3 veces con PBS, los eritrocitos se resuspendieron en solución isotónica de amortiguador de fosfatos de sodio (310 mosM) y se lavaron tres veces con el mismo amortiguador. El paquete celular se obtuvo por centrifugación a 1,000 g por 10 minutos (Sorvall RT 6000D). Finalmente los eritrocitos obtenidos de la última centrifugación se incubaron en solución hipotónica de fosfatos de sodio (20 mosM) por 10 min, a 4⁰C.

Las células tratadas con la solución de fosfatos de sodio referida previamente, se centrifugaron a 20,000 g por 40 min a 4 °C (Sorvall RC 5B plus), las membranas celulares que se depositaron en el fondo del tubo se resuspendieron y lavaron tres veces con el mismo amortiguador. Finalmente se recuperaron por centrifugación (20 min) en las mismas condiciones (20,000 g 4°C). Las membranas obtenidas en esta última centrifugación se resuspendieron en el mínimo volumen posible en solución hipotónica. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford *et al.* (1976) de acuerdo a lo previamente mencionado y se congelaron a -70°C hasta su uso.

Para evaluar la actividad de Sat sobre las proteínas de membranas celulares de los eritrocitos de carnero, se preparó una mezcla con 5 µg de Sat purificada y 10 µg de las proteínas de membranas de eritrocitos. El ensayo se realizó a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas) incubando la mezcla a 37°C, como control negativo se utilizaron 10 µg de proteínas de membranas de eritrocitos en un volumen final de 100 µl, incubadas a 37°C durante 24 horas sin agitación. Como control positivo se utilizaron proteínas de membranas de eritrocitos (10 µg) que se incubaron con 5 µg de la proteína Pet, como en los casos anteriores la mezcla se incubó sin agitación a 37°C durante 12 horas. En el ensayo se incluyó una muestra que contenía 5 µg de Sat, 10 µg de membranas de eritrocitos y PMSF en concentración final de 5 mM, la preparación se incubó de acuerdo a lo previamente descrito y la reacción se detuvo adicionando 1 µl amortiguador Leamli (5X). Las muestras se conservaron a 4 °C hasta su análisis por SDS-PAGE, el volumen final en todas las reacciones fue de 100 µl en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) estéril, a 37°C sin agitación.

6.8.3 Inducción de la Quimiotaxis

A partir de 10 ml de sangre periférica obtenida de donadores sanos y diluidos en dos volúmenes de PBS, se obtuvieron las células mononucleares (MN). La muestra de

sangre diluida, se le agregaron 4 ml de un gradiente de Ficoll ($\rho=1.077$ Sigma-Aldrich USA). Las muestras se centrifugaron (500 g, 30 min, 18⁰C) y las células que se localizaban en la interfaz del gradiente (MN) se colectaron y lavaron tres veces con solución Gey's (NaCL, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, KCL, NaHCO₃, MgSO₄, 7H₂O, MgCL₂, 6 zH₂O, CaCL₂, Glucosa, Albúmina, pH 7.0). Las células obtenidas se diluyeron en 2 ml de la misma solución Gey's, la cuantificación de las células se realizó en una cámara de Neubauer colocando 100 μ l de las células diluidas 1:1000 en solución Gey's teñidas con azul de tripano.

Para el ensayo de quimiotaxis se utilizaron cámaras de Boyden de doble filtro (Neuro-Probe Inc, Gaithersburg MD, USA), para la porción superior de la cámara se utilizó un filtro de policarbonato con poro de 5 μ m (Neuro-Probe Inc, Gaithersburg MD, USA). En la parte inferior que funciona como receptora de las células migratorias, se utilizó una membrana de nitrato de celulosa con poro de 8 μ m (Sartorius Stedim biotech. Aubagne Cedex, France). Se preparó una suspensión de 5×10^6 MN en solución Gey's-Albúmina (500 μ l), dicha suspensión se depositó en la parte superior de la cámara y en la parte inferior de la misma se inocularon 2.5 μ g de Sat purificada.

Como control positivo se utilizó suero activado con zimosan (SAZ) y como control negativo la solución Gey's. Las cámaras se incubaron 90 min a 37⁰C en una atmósfera de CO₂ (5 %), después de este tiempo se desmontaron y los filtros fueron removidos. Las células que se unieron al filtro de la cámara baja se fijaron con etanol al 80 % (v/v), se tiñeron con hematoxicilina-eosina y se fijaron a un porta objeto con resina sintética 60 % diluida en xilol (v/v).

La migración de células MN se evaluó por inspección visual utilizando microscopio de luz a 400X. Se contaron diez campos por filtro y la movilidad se calculó por el número

de células que migraron a la cámara baja. Las lecturas se hicieron por 3 observadores y el ensayo se realizó por duplicado, en experimentos por separado (Morales *et al.* 2006).

6.9 ANALISIS ESTRUCTURAL DE SAT Y PET

6.9.1 Dicroísmo circular

Se realizó el análisis del comportamiento de la estructura secundaria de la proteína Sat a diferentes temperaturas. La determinación de la estructura secundaria de Sat se realizó utilizando proteína purificada a una concentración de 0.253 mg/ml en amortiguador glicina 20 mM, NaF 0.075 mM pH 9.0 en el intervalo espectrofotométrico del UV lejano (190-250 nm), realizando 10 análisis a una velocidad de 50 nm/min a 4°C. El segundo análisis se realizó con una muestra de proteína Sat a una concentración de 2.6 mg/ml equilibrada por diálisis en buffer de Glicina-NaF 10 mM pH 9.0 Se analizó la pérdida de conformación estructural incrementando gradualmente la temperatura desde 10°C hasta 100°C, tomando 2 minutos para equilibrar entre cada temperatura antes de la medición y un promedio de 3 barridos a 218 nm, de igual manera la misma muestra fue enfriada de 100°C hasta 10°C para evaluar el fenómeno de renaturalización de Sat.

El análisis se desarrolló utilizando una cubeta rectangular de cuarzo de 0.1 cm. en un espectropolarímetro J-710 (Jasco Coop.). Los resultados en grados de elipticidad fueron convertidos a elipticidad molar, usando la fórmula $(\theta) = \theta_{\text{abs}} / c n_{\text{res}} l$, donde θ_{abs} es la medición de elipticidad en miligrados, c es la concentración molar de la proteína, n_{res} es el número de residuos en la proteína y l la longitud de la cuvette en milímetros. Los datos obtenidos en ambos experimentos se analizaron utilizando los programas CONTILL y CDSSTR en CDPRO software (Provencher & Glockner 1981; Jhonson *W. et al.* 1999).

6.9.2 Cristalografía

Las pruebas de cristalización se realizaron utilizando proteína con un nivel de pureza mayor al 95 %. En el caso de Sat los ensayos de cristalización se desarrollaron utilizando el método de difusión de vapor por gota colgante a temperaturas de 4⁰C y 18⁰C, y gota sedente a 18⁰C empleando los Kit de cristalización comerciales (Crystal screen I, crystal screen II, crystal screen cryo y PEG/Ion Screen.) de la marca Hampton Research. El volumen de la gota fue de 2 µl, 1 µl de la solución de proteína y 1 µl de la solución empleada para la cristalización, 900 µl de reservorio fueron empleados.

La cristalización de Pet se llevó a cabo por el método de gota sedente a 18⁰C utilizando los Kit de cristalización comerciales (Index screen y PEG/Ion screen I y II) (Hampton Research). El volumen de la gota fue de 2 µl, 1 µl de la solución de proteína y 1 µl de la solución empleada para la cristalización, 100 µl de reservorio fueron empleados. Las placas de cristalización fueron observadas periódicamente.

6.9.3 Difracción de rayos X

Los ensayos de difracción con cristales de Sat se realizaron con un difractómetro de rayos X (Rigaku Microfocus Rotating Anode, X Ray generator MicroMax 007HF) (Instituto de química, UNAM), así como en el National Synchrotron Light Source (NSLS) del laboratorio nacional Brookhaven (Long island, USA) en la estación X6A.

En el caso de los cristales de Pet, fueron sometidos a experimentos de difracción en el advanced photon source (APS), Argonne (Chicago USA), en la estación 21-ID-F. Para la colección de datos se utilizó un detector CCD Mar 225, con un segundo de exposición y un grado de oscilación por imagen, la longitud de onda utilizada para la difracción fue de 0.9787 Å. Los datos fueron integrados en el programa XDS (Kabsch W. *et al.* 2010) y escalados por Scala de la plataforma ccp4i (Winn M. *et al.* 2011). La unidad celular fue asignada con el grupo espacial ortorrómbico P2₁2₁2₁ por el programa

pointless (Langer G. *et al.* 2008). La solución para el reemplazo molecular inicial fue realizado por el programa de reconstrucción ARP/wARP (Adams P. *et al.* 2010) y phenix (Schroder *et al.* 2010). Finalmente el refinamiento estructural se realizó con el programa DEN (Brunger A. *et al.* 1998) con la versión de phenix y CNS 1.3 (Brunger A. *et al.* 2012).

6.9.4 Determinación de estructura tridimensional de Sat por bioinformática

La estructura tridimensional de Pet (PDB No. 4OM9) fue utilizada como templatado para obtener un modelo de la estructura de Sat usando el servidor predictor de estructuras EsysPred3D (Lambert *et al.* 2002) que se encuentra en la página de internet ExPASy. El dominio pasajero de Sat y el dominio pasajero de Pet comparten un 71% de identidad y un 76 % de similitud. Imágenes del modelo estructural fueron generadas con el uso de MacPymol.

7 RESULTADOS

7.1 Purificación. El procedimiento de purificación de las proteínas (Pet y Sat) utilizando la columna de Q-sepharosa, dio buenos resultados ya que permitió recuperar ambas proteínas. Estas eluyeron en la segunda fracción (Figura 8A), aunque, con algunas proteínas de bajo peso molecular como contaminantes. La purificación definitiva se obtuvo después de aplicar la cromatografía en columna Mono S HR 5/5 en un sistema FPLC. En esta las proteínas se retuvieron en la matriz de la columna y fueron liberadas aumentando la fuerza iónica (Figura 8B).

Después de realizar SDS-PAGE, se observó la presencia de una fracción única que de acuerdo al marcador estandar se podía considerar que se trataba de las proteínas Sat (Figura 9A) y Pet (Figura 10A/B) de aproximadamente 105 y 104 KDa respectivamente. Para confirmar la identidad de ambas proteínas, se realizó un ensayo de Western blot utilizando anticuerpos policlonales de conejo específicos (anti-Sat y anti-Pet). En dicho ensayo se identificó respuesta específica con cada uno de los anticuerpos, con las fracciones de 105 y 104 KDa correspondientes a Sat y Pet respectivamente (Figs. 9B y 10C).

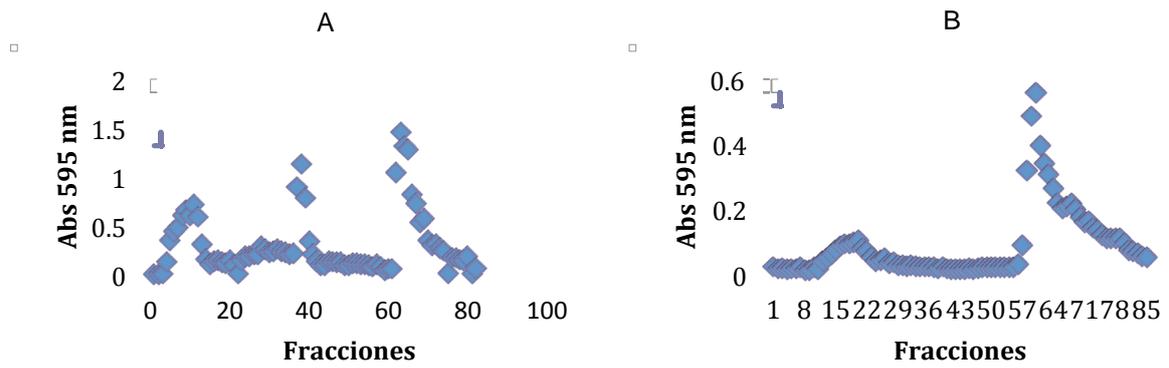


Figura 8. A) Cromatografía de intercambio aniónico. Empleando Q-sepharosa las proteínas Sat y Pet mostraron un mismo perfil de elución, logrando recuperar ambas proteínas en el segundo pico de elución. B) Cromatografía de intercambio catiónico. Para este paso de purificación se utilizó resina Mono S, a pH 6.5, las proteínas se liberaron en el segundo pico de la gráfica.

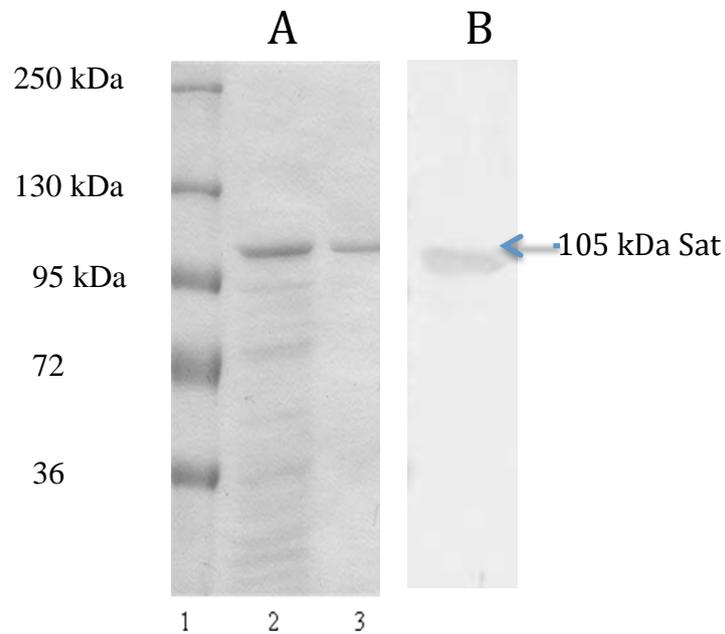


Figura 9. Análisis de las fracciones de Sat obtenidas por cromatografía. A) SDS-PAGE 8 %. Carril 1, Marcador de peso molecular con proteínas estándar, carril 2, muestra del extracto crudo de Sat obtenido después de la precipitación con sulfato de amonio, carril 3, Sat después de la cromatografía de intercambio catiónico (Mono S). B) Western-blot, la proteína se desafió contra anticuerpos anti-Sat de conejo, se observa reacción contra la banda de 104 KDa correspondiente a Sat.

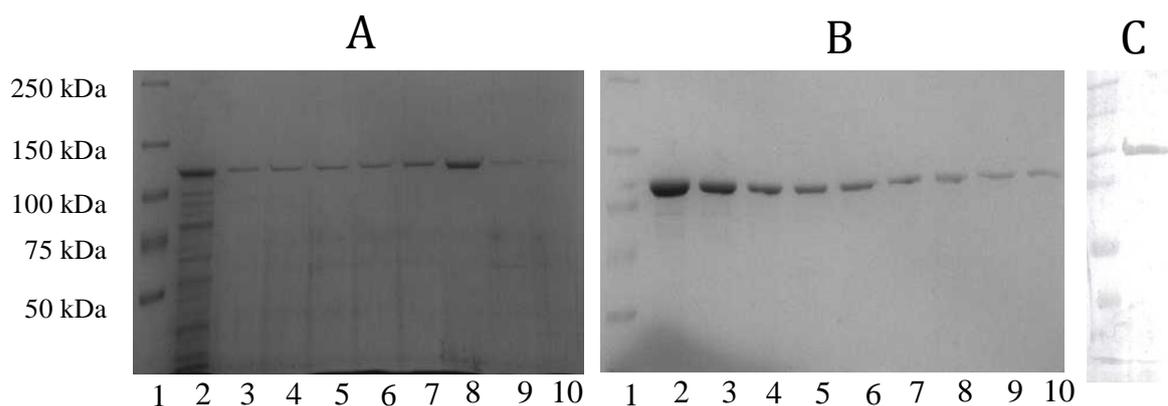


Figura 10. Análisis por SDS-PAGE (8%) de las fracciones de Pet obtenidas por Cromatografía. A) Cromatografía con Q-sepharose; Carriles: 1) Masas moleculares de proteínas estándar en KDa; 2) Extracto crudo de Pet obtenido después del proceso de precipitación con sulfato de amonio; 3-10) Fracciones obtenidas en el segundo pico de la cromatografía. (B) Cromatografía en Mono S; Carriles: 1) Masas moleculares de proteínas estándar en KDa; 2-10) Fracciones obtenidas en el segundo pico de la cromatografía. (C) Western-blot utilizando anticuerpos de conejo anti-Pet; Reacción contra la fracción de 108 KDa.

7.2 SECUENCIACIÓN

7.2.1 Degradación de Edman. La identidad de ambas proteínas se confirmó al obtener la secuencia de aminoácidos de la parte N-terminal por el método de degradación de edman. Los resultados mostraron las secuencias **ANNIDISNVxA** y **ANIMDISKAWARDYLDLAQN** con una identidad del 100 % respecto a las secuencias reportadas previamente (Eslava *et al.* 1998; Guyer *et al.* 2000).

7.2.2 Peso Molecular de Sat.

Con el procedimiento de análisis de las masas se definió el peso molecular real de Sat, para esto cada uno de los picos que se obtuvieron en el ensayo se analizaron utilizando el software XtractAll (Thermo) por deconvolución de los picos (Figura 11). Al respecto se encontró que Sat tiene un Peso molecular de 104.7 kDa, el cual está muy cercano al de Pet que es de 104.2 kDa (Eslava *et al.* 1998).

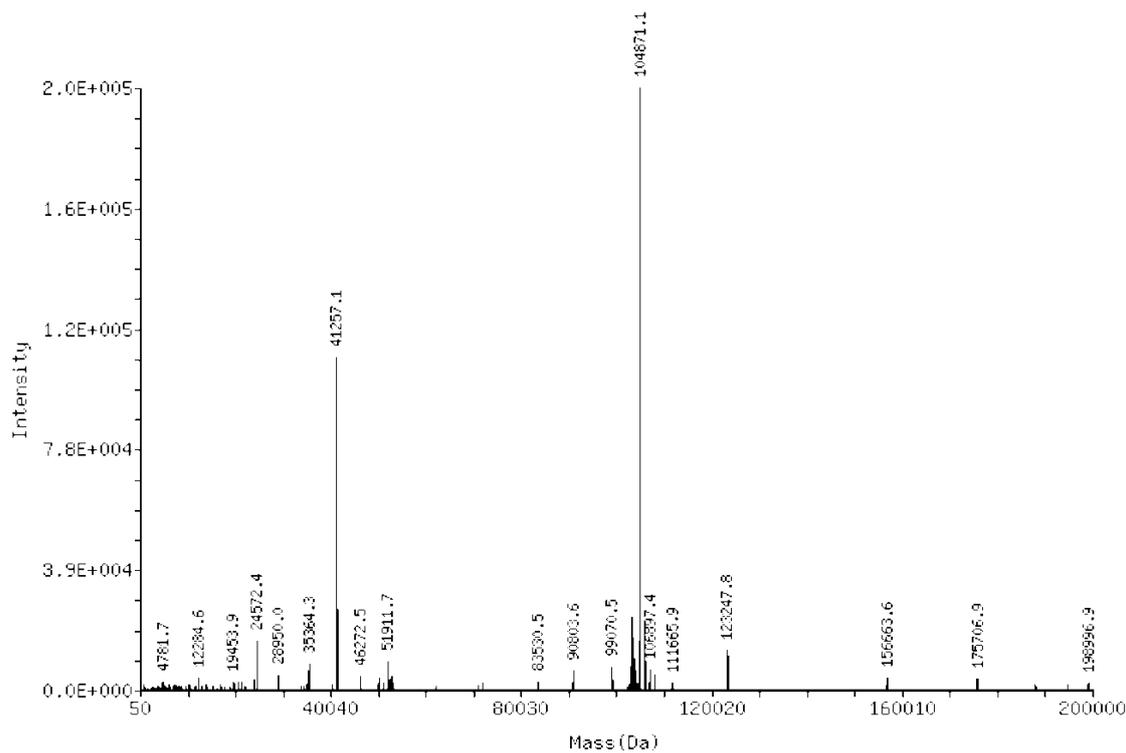


Figura. 11. Peso molecular de Sat definido por ionización en electrospray. Se analizaron diferentes muestras de Sat purificada y liofilizada, el pico de 104871.1 Da corresponde a la masa de la proteína.

7.3 Actividad proteolítica de Sat sobre la caseína

Se analizó la actividad proteolítica de Sat sobre la caseína bajo diferentes valores de pH, aunque, se observó actividad degradante en todos los pH utilizados, sin embargo, la mayor actividad se identificó bajo condiciones básicas (Fig. 12).

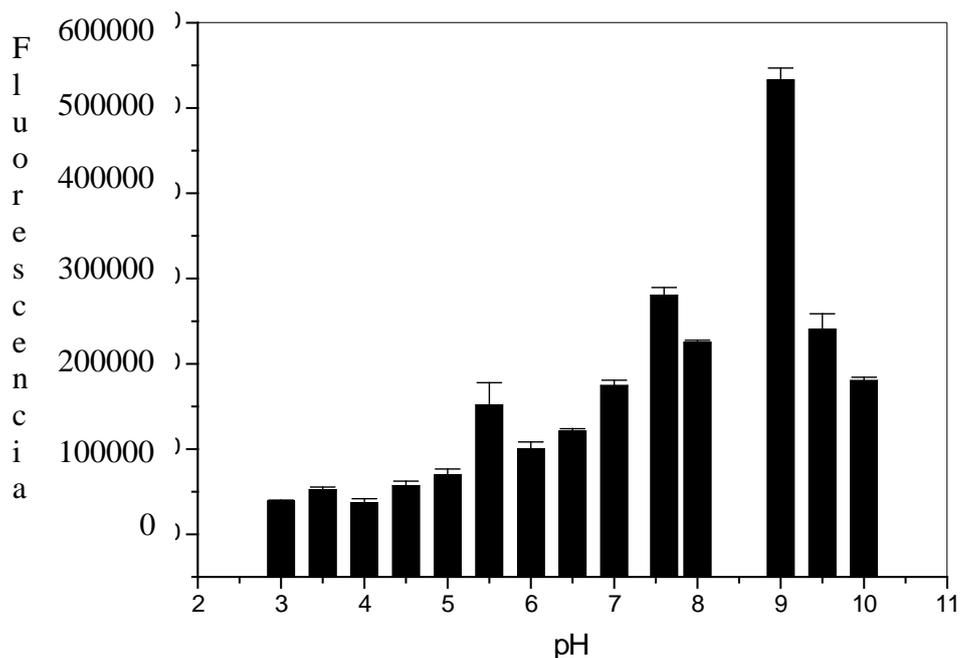


Figura 12. Efecto proteolítico de Sat sobre la caseína marcada. La actividad proteolítica de Sat se presenta en los diferentes pH utilizados en el ensayo a temperatura ambiente, sin embargo, la mayor actividad se identifica a pH 9, lo cual sugiere que la proteína posee las características necesarias para poder llevar a cabo su actividad proteolítica en los distintos nichos que ha sido descrita como un factor de virulencia importante para las bacterias que la secretan.

7.4 Acción proteolítica de Sat sobre proteínas de membrana del eritrocito

El análisis de la actividad de Sat sobre proteínas de membranas de eritrocitos de carnero mostró degradación sobre las de proteínas con pesos de 240 y 220 kDa, correspondiente a las cadenas α y β de la espectrina. En el ensayo se identifica que se forman dos subproductos de la degradación, esto se pudo constatar al analizar los productos de las reacciones en SDS-PAGE al 6 % (Fig. 13A). Al realizar una cinética de degradación de la fodrina por Western-blot se observó que la actividad proteolítica inicia después de las 3 horas de incubación, durante este periodo aparece un subproducto de 150 KDa y a las 6 horas se identifica uno más de 120 KDa. La identidad de ambos subproductos se confirmó utilizando anticuerpos anti espectrina, en este ensayo se identificó que la reacción de los anticuerpos fue más intensa con el subproducto de 150 KDa (Fig. 13B).

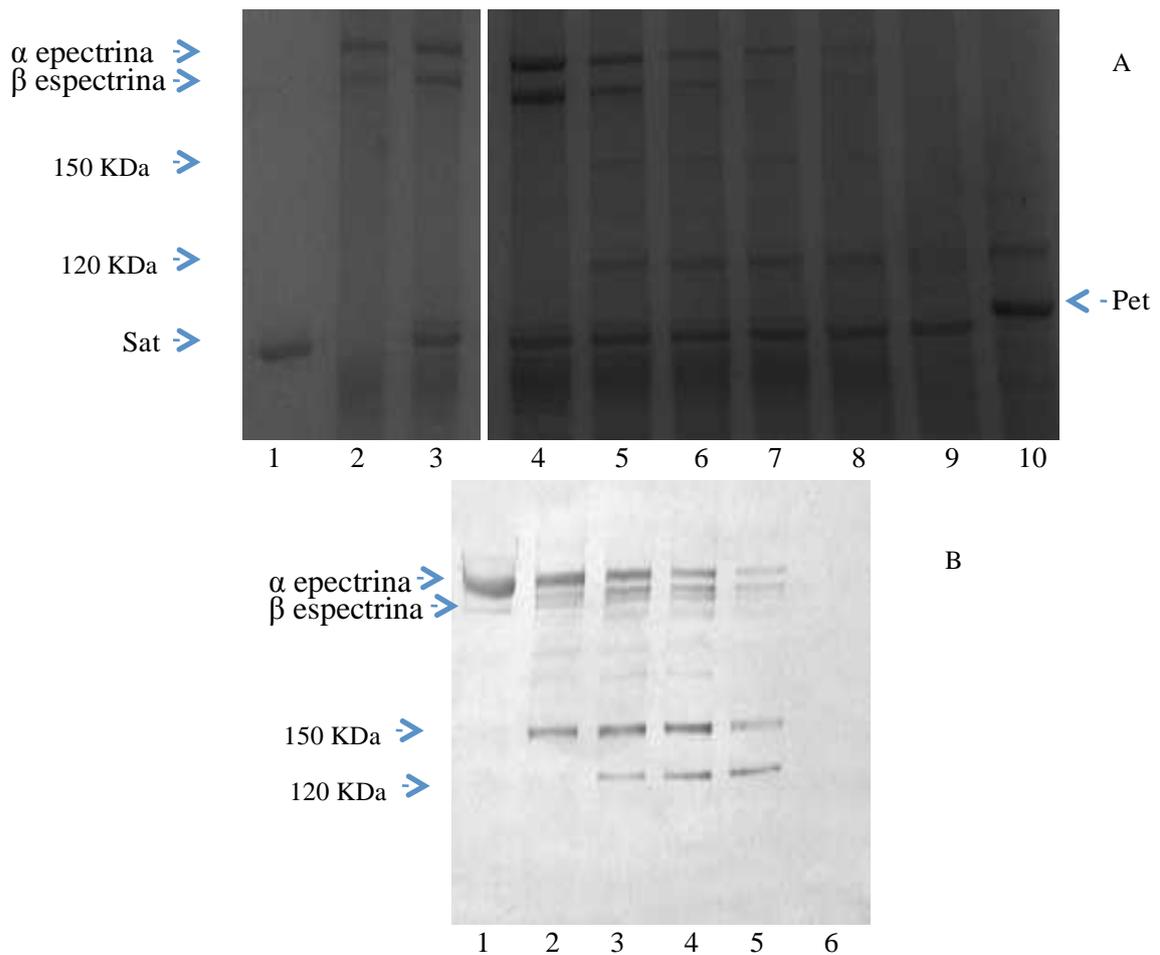


Figura 13. A) SDS-PAGE 6 %, Análisis de la actividad proteolítica *in vitro* de Sat. Se evaluó la actividad de Sat sobre membranas de eritrocitos de carnero; 1) Sat, 2) Fodrina, 3) membrana celular más de Sat a las 12 horas de incubación con inhibidor de proteasas PMSF, 4) membranas celulares más Sat a 0 horas de incubación, 5-9 membranas celulares mas Sat a 3, 6, 9, 12 y 24 horas de incubación, 10) membrana celular más pet a 12 horas de incubación. se observa la aparición de dos bandas (120 y 150 KDa) correspondientes a la degradación de las cadenas α y β de espectrina (220 y 240 KDa). B) Western blot, Lo anterior se corroboró por inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos para las cadenas α y β de la espectrina, donde se puede observar el reconocimiento de las dos bandas de 120 y 150 KDa desde las 3 horas de reacción. Cada una de las bandas de la figura 13 B corresponden a; 1-6 membrana celular más Sat a 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas de incubación respectivamente. En todas las reacciones se utilizó 10 μ g de membrana celular de eritrocito de carnero y 5 μ g de Proteasa, en el caso del inhibidor se empleo a una concentración final de 5 mM, el volumen de reacción se llevo a 10 μ l utilizando medio RMSD esteril, la incubación se realizó a 37 °C.

7.5 Actividad quimioattractante de Sat sobre células monocucleares (MN).

En estudios recientes se mostró que algunas SPATEs poseen propiedades para estimular células relacionadas en la respuesta inflamatoria (Eslava *et al*, 1993, 2003; Sainz *et al*, 2000), y que dicho efecto no está relacionado con el motivo de serina proteasa

(GDSGSG). Aquí analizamos la capacidad de Sat para estimular la migración de células mononucleares (MN) en cámaras Boyden de doble filtro. Tomando como referencia el efecto observado por Zymosan (control positivo), usando Sat a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ se encontró que estimula a las células mononucleares inclusive induciendo un efecto mayor al mostrado por el control positivo (Fig. 14).

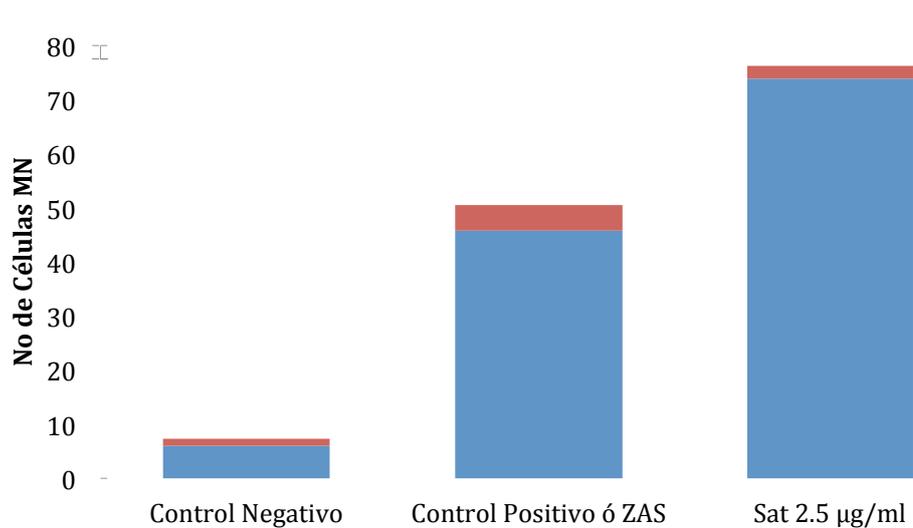


Figura 14. Ensayo de actividad quimioatractante de Sat sobre células mononucleares (MN). El movimiento de células mononucleares (MN) inducido por Sat (quimiotaxis) se analizó en un ensayo de cámara de Boyden. Se utilizaron suero activado con zimosan (ZAS) y solución Gey's como controles positivo y negativo respectivamente. La actividad quimioatractante se determinó por la cuenta de células mononucleares en 10 campos con la ayuda de un microscopio óptico (100X) y se promediaron las cuentas de 3 observadores distintos. Sat a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ mostró tener mayor capacidad de activar la migración de MN comparado con la actividad que mostró ZAS. La parte superior de las barras (rojo) representa la desviación estándar.

El análisis de las imágenes de los controles negativo y positivo muestran como en el control negativo (solución Gey's) las células MN no migraron (Fig. 15A). Sin embargo, cuando se evaluó el efecto sobre la migración de MN utilizando zimosan (Fig. 15B) y Sat (Fig. 15C), se aprecia un gran número de células. Este ensayo sugiere que Sat activa moléculas relacionadas con la inflamación durante la infección de la bacteria en el hospedero.

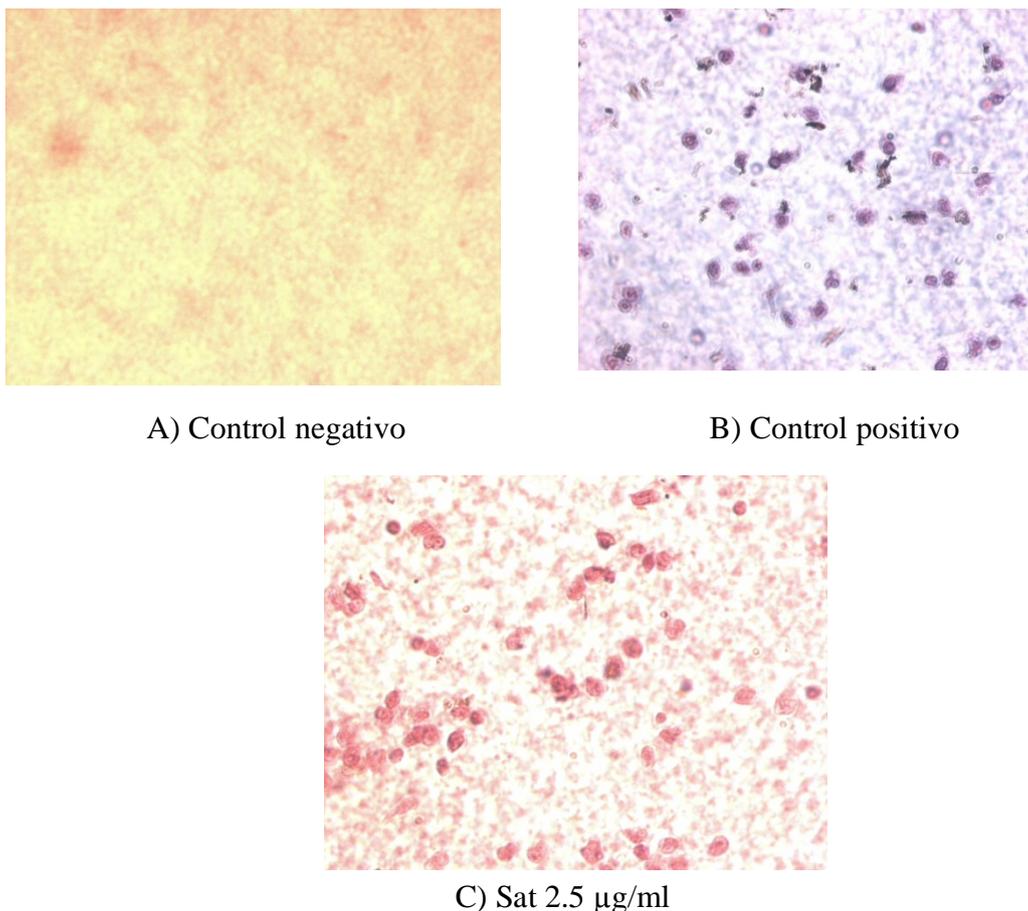


Figura 15. Membrana de nitrato de celulosa con poro de 8 µm, teñidas con hematoxilina-eosina y observadas a 400X con un microscopio óptico. Se observa que Sat activa la migración de MN en proporción mayor a la que induce el Zimosan.

7.6 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE PET Y SAT

7.6.1 Estructura secundaria de Sat. El ensayo de dicroísmo circular utilizando UV-lejano (190-250 nm) mostró que Sat posee una estructura secundaria que corresponde a una proteína globular α/β con alta composición en hojas β , con un registro mínimo a 218 nm y un máximo 195 nm (Fig 16). En el procedimiento además, se identificó que Sat posee 7.32 % de hélices α , 37.02 % en hojas β , 21.4 % de giros y 33.66 % de conformación aleatoria o secuencia sin estructura secundaria.

Al realizar el análisis de fusión de la proteína con temperaturas de 10 a 100 °C, se observó en el espectro obtenido que Sat retiene algo de elipticidad negativa a 218 nm y

pérdida de la conformación de manera significativa después de 60 °C. Por otro lado al realizar el enfriamiento gradual de la proteína (100 °C a 10 °C), se hizo evidente que el proceso de desnaturalización de la proteína es irreversible ya que no registró alguna señal que sugiera su re- naturalización (Fig. 17).

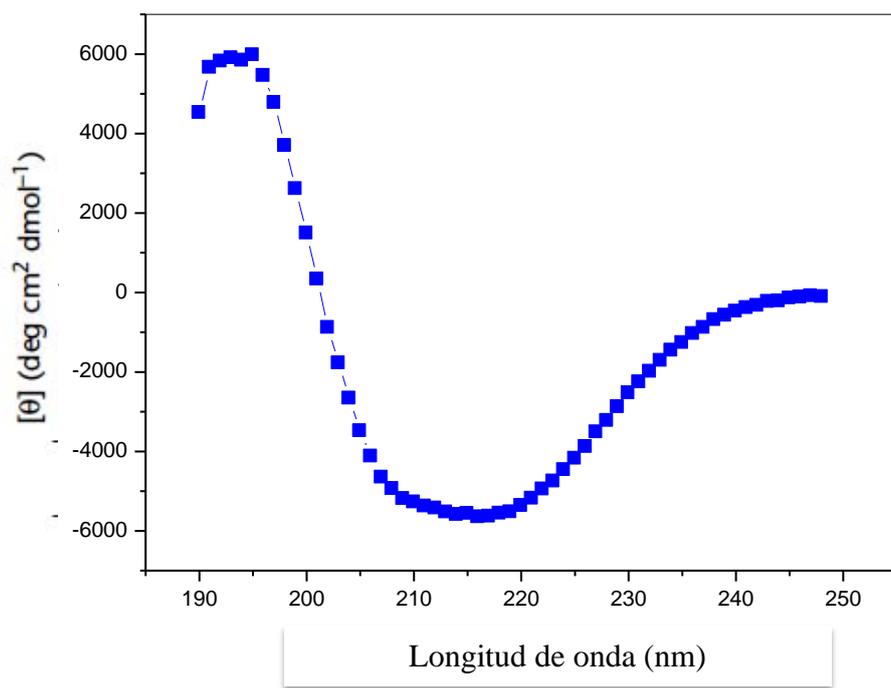


Figura 16. Espectro de Dicroísmo Circular. Análisis de la estructura secundaria de Sat a 25 °C y pH 9.0 en el espectro de 190-250 nm. De acuerdo a la gráfica el máximo es de aproximadamente 195 nm y el mínimo de 218 nm, lo cual sugiere que Sat es una proteína con alto porcentaje en hojas β.

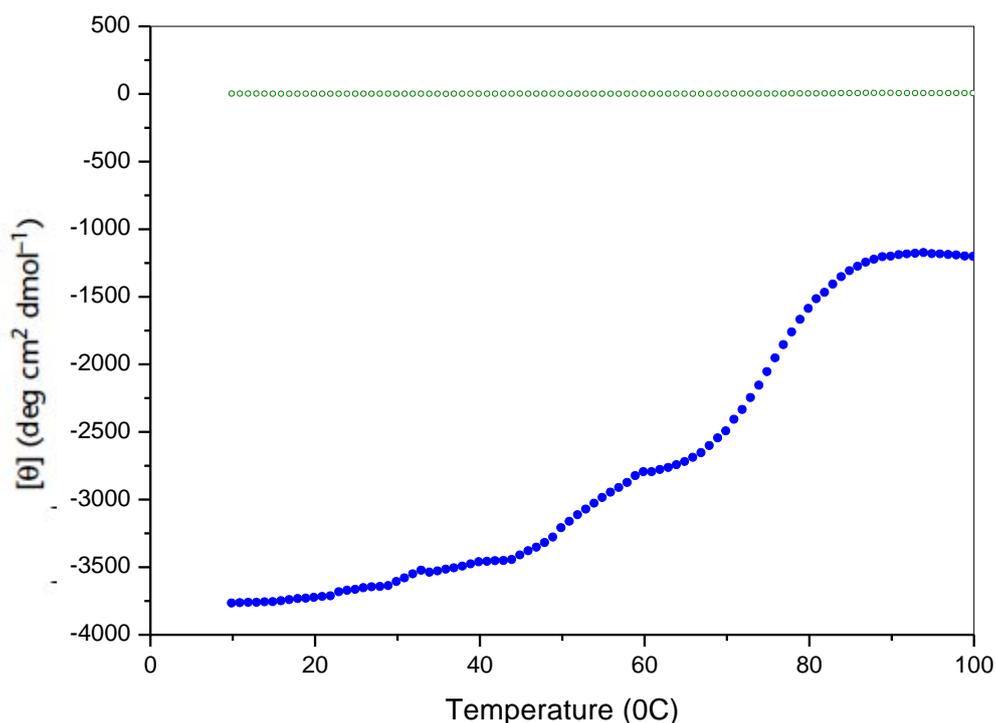


Figura 17. Análisis de la estabilidad térmica de la proteína. Sat se sometió al efecto de las temperaturas en un rango de 0-100 °C (azul) a 218 nm, el resultado mostró la pérdida gradual de la conformación de acuerdo a los cambios en la señal obtenida a medida que se incrementaba la temperatura con pérdida de la conformación significativa después de los 60 °C. Este análisis sugiere que el cambio conformacional es irreversible ya que al enfriar de 100-0 °C (verde) no se registraron señales que sugieran la re-naturalización de la proteína.

7.7 Cristalización de Sat y Pet

La cristalización de Sat se realizó por la técnica de gota sedente en placas de 96 pozos utilizando 7mg/ml de proteína, durante 3 semanas de incubación a 18 °C, utilizando como solución de cristalización sulfato de magnesio hidratado 0.6 M, sodium-HEPES 0.1 M 2-methyl-2,4 pentanodiol 4 % pH 7.5 (Fig. 18). Para el análisis de difracción los cristales se crioprotegieron con la solución madre en donde cristalizaron, aumentando el porcentaje de 2-methyl-2,4-pentanodiol al 25 %. Por otro lado la cristalización de Pet se obtuvo utilizando una concentración de 13 mg/ml en la condición de prolina 0.2 M, HEPES 0.1 M (pH 7.5), 10 % w/v PEG 3350 en un tiempo de incubación de 3 semanas a 18

$^{\circ}\text{C}$ (Fig. 19). Para los ensayos de difracción los cristales se crio-protegieron utilizando la solución donde cristalizaron, adicionada con glicerol al 25 %.



Figura 18. Cristales de Sat obtenidos en la condición sulfato de magnesio hidratado 0.6 M, sodium-HEPES 0.1 M pH 7.5, 2-methyl-2,4 pentanodiol 4 %. Para los experimentos de difracción los cristales se crioprotgieron en nitrógeno líquido utilizando la misma solución de cristalización adicionada con 25 % de glycerol. Los cristales fueron observados periódicamente con la ayuda de un microscopio Zeiss (10X).

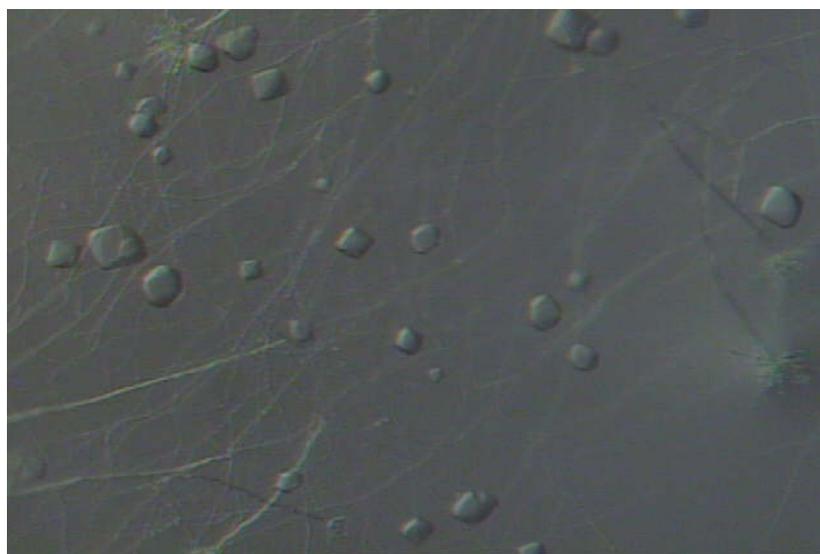


Figura 19. Cristales de Pet obtenidos en la condición prolina 0.2 M, HEPES 0.1 M (pH 7.5), 10 % w/v PEG 3350. Para los experimentos de difracción los cristales se crioprotgieron en nitrógeno líquido utilizando la misma solución de cristalización adicionada con 25 % de glicerol. Los cristales fueron observados periódicamente con la ayuda de un microscopio Zeiss (10X).

7.8 Experimentos de difracción

Los patrones de difracción obtenidos sugieren que la naturaleza de los cristales de Sat obtenidos bajo las condiciones ya descritas es anómala y que su geometría interna no es la adecuada (Fig. 20). Por tal motivo se realizaron nuevos ensayos para mejorar la calidad de los cristales, modificando condiciones previas de cristalización como temperatura y concentración de proteína. Los cristales obtenidos bajo las nuevas condiciones, se sometieron a ensayos de difracción en los sincrotrones Brookhaven National laboratory (Long Island, USA) y advanced photon source (APS), Argonne (Chicago USA). Los resultados al respecto no fueron satisfactorios ya que la calidad de difracción de los cristales de Sat no mejoró.

Con relación a la difracción obtenida de los cristales obtenidos de la proteína Pet esta fue satisfactoria (fig. 21), se obtuvieron en total 250 imágenes (frames), las que se utilizaron para el análisis informático que finalmente permitió la obtención de la densidad electrónica de la proteína y proceder a la construcción del modelo tridimensional de Pet y su refinamiento final.

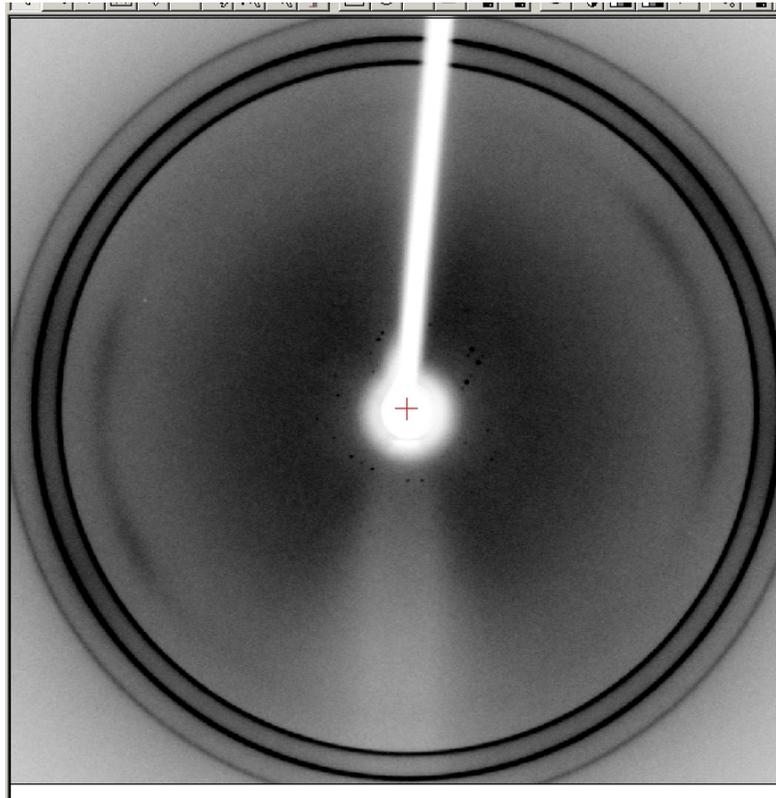


Figura 20. Patrón de difracción utilizando los cristales obtenidos en la condición sulfato de magnesio hidratado 0.6 M, sodium-HEPES 0.1 M pH 7.5, 2-methyl-2,4 pentanodiol 4 %, se puede observar la mala capacidad de difracción de los cristales analizados, indicando principalmente que la geometría de los cristales no es la adecuada para aspirar a obtener información que ayude a determinar su estructura.

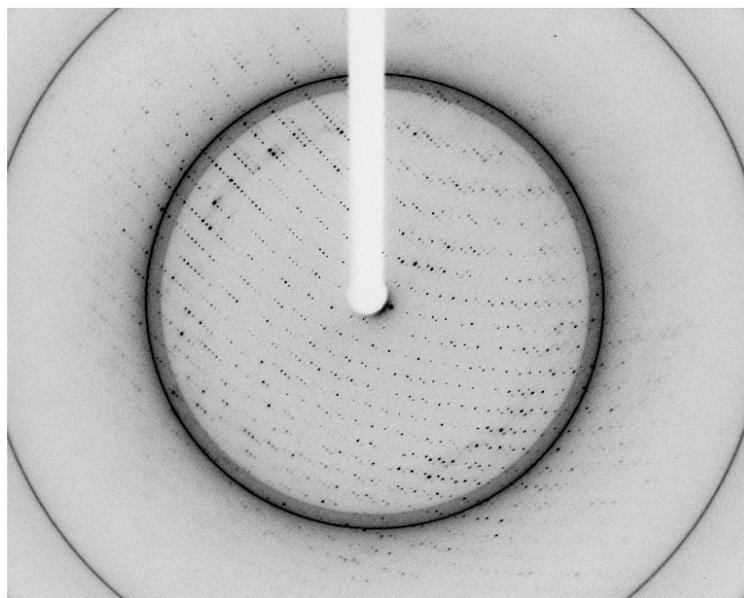


Figura 21. Patrón de difracción con los cristales de Pet obtenidos en la condición; prolina 0.2 M, HEPES 0.1 M (pH 7.5), 10 % w/v PEG 3350. Los cristales como se puede observar ofrecieron una buena capacidad de difracción en las condiciones mencionadas, se obtuvieron 250 frames que se utilizaron para la determinación de la densidad electrónica y resolver la primera estructura tridimensional de Pet por cristalografía.

7.9 Construcción de la estructura tridimensional de Pet

El dominio pasajero de Pet se extiende desde el residuo 1 de la parte amino terminal hasta el residuo 963 (con un total de 931 residuos asignados) en la parte C-terminal (Fig. 22). Se encontró sólo una molécula del dominio pasajero de Pet dentro de la unidad asimétrica, las longitudes de la unidad celular fueron determinadas como; $\alpha=77.76\text{\AA}$ $\beta = 95.93 \text{\AA}$ y $\gamma=164.87 \text{\AA}$ en el grupo espacial ortorrómbico $P2_12_12_1$. El contenido de solvente se calculó en un 58.4 % correspondiente a un coeficiente de Matthews de 2.96 (Matthews B.*et al.* 1968). El gráfico de ramachandran muestra que un 87 % de los residuos caen en regiones favorables, así mismo no muestra residuos en regiones no permitidas. El modelo estructural fue refinado hasta alcanzar un $R/R_{free}=0.22/0.263$ con un máximo de resolución de 2.3 \AA . En la tabla 2 se muestra un resumen con las características de la colección de datos y refinamiento. El modelo final y los factores estructurales han sido depositados en el sitio Protein Data Bank con el código 40M9.

Tabla 2. Estadísticas de la colección de datos obtenidos en APS. línea 21-ID-F. Los números en parentésis refieren los valores de mayor resolución.

	Pet protein from <i>E.coli</i>
Wavelength (Å)	0.9787
Resolution range (Å)	41.46-2.3
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit Cell length (Å)	77.76 95.93 164.87
Total Reflections	1,330,454(166,646)
Unique Reflections	55340(5472)
Multiplicity	25.0(22.0)
Completeness (%)	99.6(99.96)
Mean I/σ(I)	69.28(4.52)
CC_{1/2}[*]	0.901(0.83)
R-work	0.22(0.287)
R-free	0.263(0.325)
Number of atoms	7591
Water molecules	543
Protein Residues	931
RMS[*] (bonds) Å	0.008
RMS[*] (angles) deg	1.14
Ramachandran* favored (%)	87
Ramachandran* Outliers (%)	2.7
Clashscore (MolProbity)	13.1
Average B-factor[#] Å²	59

* CC_{1/2} es el coeficiente pearson calculado según lo descrito por Karplus & Diederichs (2012).

7.9.1 Estructura del dominio pasajero de Pet

La estructura completa del dominio pasajero de Pet es mostrado en la figura 22A. La característica más sobresaliente es la estructura helicoidal- β de giro derecho (verde). La estructura muestra tres dominios largos y dos subdominios, interrumpiendo el dominio C-terminal de la estructura helicoidal- β . Los tres dominios largos consisten en; el dominio serina proteasa ubicado en la parte N-terminal (Azul), un conector hélice- α (Amarillo) y el dominio característico hélice- β el cual consiste en un arreglo helicoidal por segmentos alternados de hojas β -loops-hojas β (verde). En dos puntos la hélice- β se interrumpe, primero por un motivo helicoidal- α (rojo) y una hoja- β (rosa) (Fig. 22B). La mayoría de las partes que comprenden el dominio pasajero de Pet se encuentran en plegamiento estructural ordenado, lo anterior indica que la proteína está en una conformación estable. El relativamente alto valor del factor-B de 59 es debido a la flexibilidad de la parte C-terminal del dominio pasajero de Pet, esto se ilustra de manera puntual en la representación en “B-Putty” (Figura 22C), observaciones similares han sido reportadas para la proteína EspP (Pdb 3SZE) (Khan S. *et al.* 2011).

La calidad de la estructura puede ser apreciada desde la representación del conector hélice- α entre el subdominio serina protease y el tallo helicoidal- β (Fig. 23A superior izquierda). Una superposición de la estructura conocida de EspP (3SZE) con la nueva estructura del dominio pasajero de Pet resulta en un RMSD de 1.31 Å. Mientras que el plegamiento de ambas proteínas es similar, la superposición (Figura 23B superior derecha) revela un acercamiento (Figura 24) e identifica importantes diferencias en dos regiones del dominio serine proteasa entre los dominios pasajeros de EspP y Pet. Mientras Pet contiene hojas- β plegadas en la secuencia que corresponde a los residuos 181-190, el correspondiente dominio estructural en EspP consiste en un bucle en espiral (Figura 24 A). Por otro lado, el dominio pasajero de Pet muestra hojas- β más pronunciadas entre los residuos 135-143 comparado con la estructura de EspP (Figura 24 B).

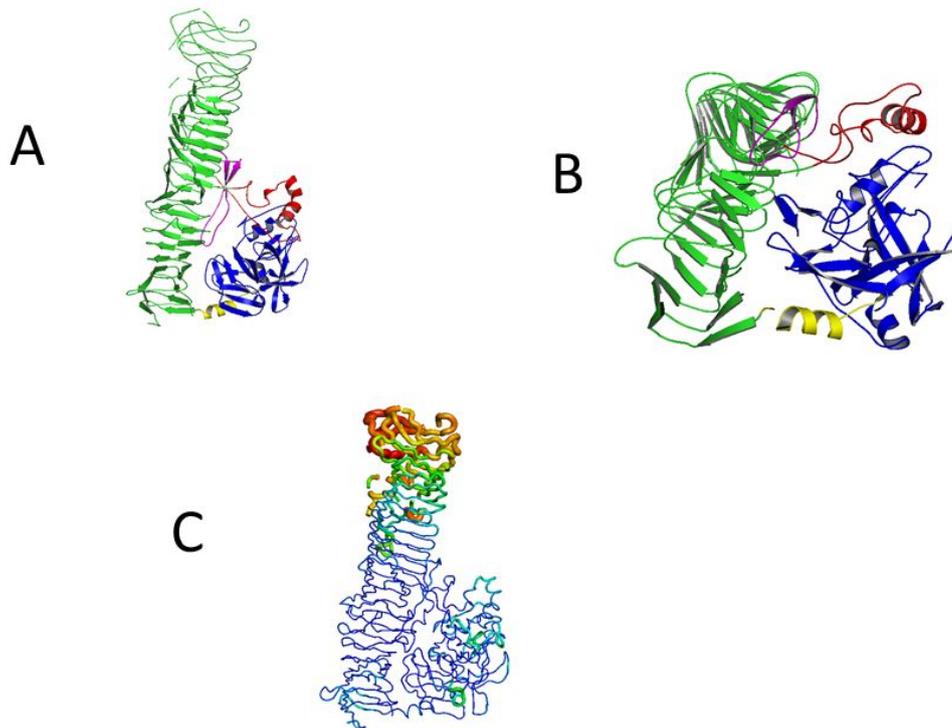


Figura 22. A y B) modelo del dominio pasajero de Pet (PDB 40M9) con los 5 subdominios, el dominio serina protease (azul), conector hélice- α (Amarillo), dominio hélice- β (verde), estos subdominios están interrumpidos por un estabilizador Hélice- α (rojo) y un espaciador de hoja- β plegado (púrpura). En A el subdominio en verde se muestra en su máxima longitud. Por otro lado en B se muestra con un giro hacia atrás de 90° donde se presentan los subdominios más pequeños.

C) representación B-putty de la estructura para ilustrar la distribución relativa del factor-B en el dominio pasajero de Pet. Factor-B bajos (azul) y factor-B alto (rojo) son representados en diferentes modalidades de la cadena C-alfa.

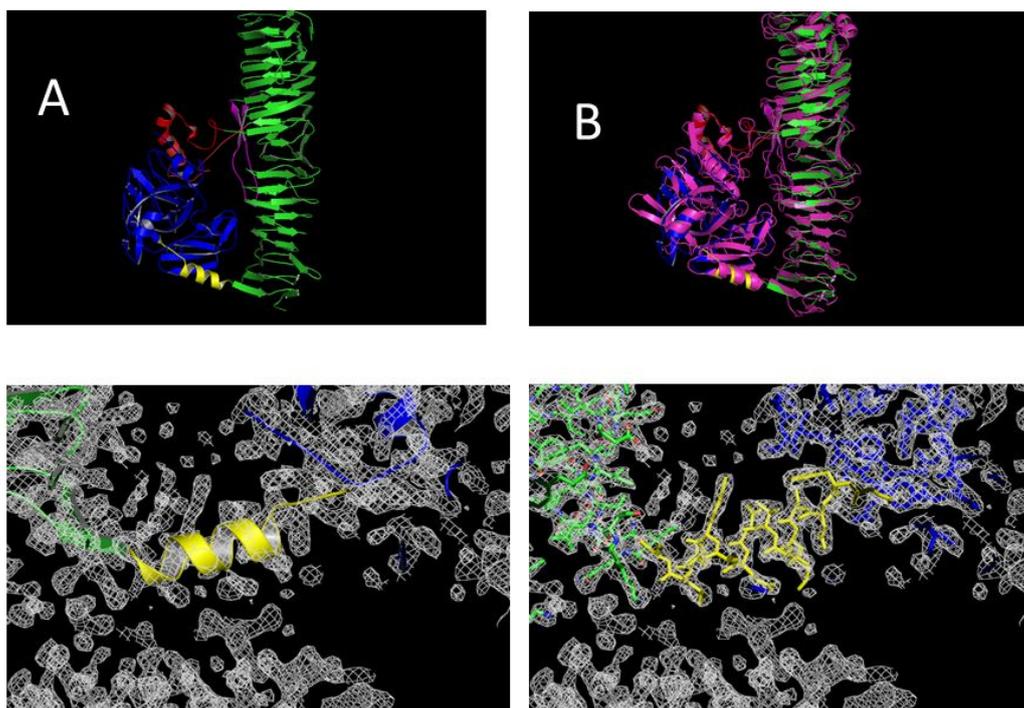


Figura 23. Comparación entre la estructura de Pet, determinada en este trabajo (A superior izquierda) y la estructura resuelta más cercana (PDB 3SZE) de la proteína EspP en púrpura (A superior derecha). El mapa de densidad electrónica mostrada en la parte inferior señala el conector hélice- α (amarillo) entre el subdominio de serina proteasa (azul) y el subdominio helicoidal β (verde). El modelo es representado en estilo “cartoon”. En la parte inferior derecha el mismo mapa de densidad electrónica se muestra con la proteína como “stick model”. El nivel de contorno es a 1.5σ para los mapas de densidad electrónica $2F_o - F_c$.

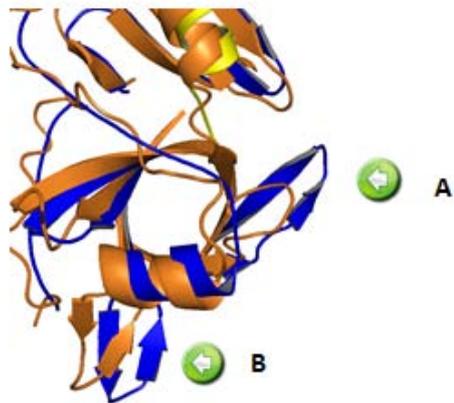


Figura 24. Diferencias entre el dominio pasajero de Pet y la región proteolítica de EspP. Un bucle en espiral en EspP (A) y más hojas- β pronunciadas entre los residuos 135-143 (B). La estructura de Pet es representada en azul (subdominio serina proteasa) y amarillo (hélice) comparado con su homólogo más cercano EspP (PDB 3SZE) mostrado en naranja.

8. Modelo estructural de Sat por computadora

La alternativa de obtener modelos estructurales por computadora ha sido utilizada en trabajos anteriores (Scaglione *et al.* 2008), en este trabajo se utilizó la estructura de Pet para obtener información estructural de Sat a partir de su secuencia. Se encontró que ambas proteínas adoptan una estructura muy similar, con plegamientos en sus dominios muy conservados (Fig. 25A), además la superposición de ambas proteínas nos revela como pudieran estar arreglados en el espacio tridimensional correspondientes a los últimos residuos (795-963) los cuales no pudieron ser asignados en el caso de la estructura de Pet por falta de densidad electrónica (Fig. 25B). De igual manera se puede observar que subdominios que sobresalen del dominio C-terminal o translocador, como los que se muestran en la figura 25C (residuos 517-577) en ambas proteínas, adoptan estructuras secundarias muy parecidas. Así mismo, esta similitud se puede observar en la parte N-terminal o dominio globular (Fig. 25D), en donde los residuos que componen el sitio catalítico de ambas proteínas adoptan un espacio y una orientación muy similar (Fig. 25E).

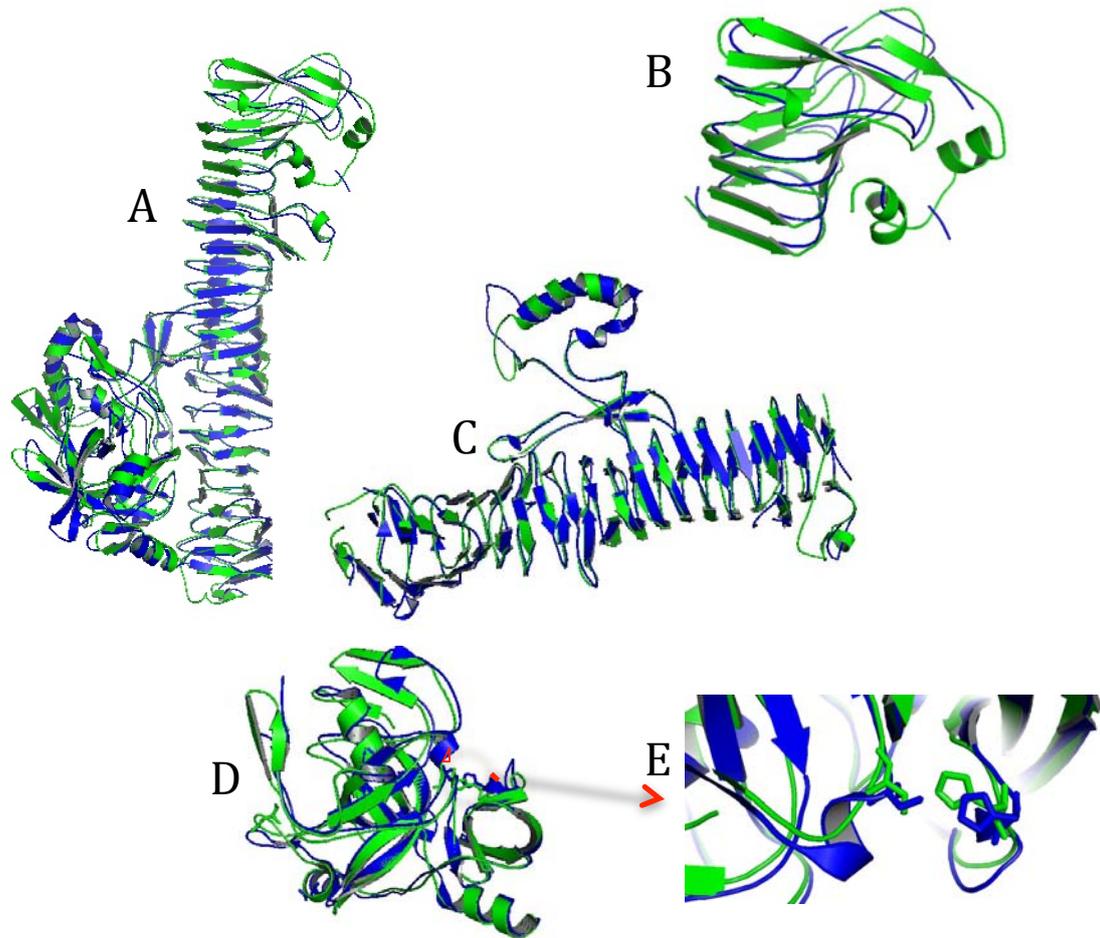


Figura 25. Diferencias entre el modelo de Pet (Azul) obtenido por cristalografía y el modelo por computadora obtenido de Sat (verde). A) Superposición de la estructura de Pet por cristalografía y el modelo de Sat por computadora. B) la parte C-terminal de pet se observa sin estructura secundaria debido a que no fue posible determinar la densidad electrónica a partir de los datos de difracción, indicando que es una región en constante movimiento, al respecto el modelo de Sat nos sugiere como pudiera ser la conformación estructural de esta porción en ambas proteínas, pues como se puede observar siguen el mismo patrón de empaquetamiento. C), el subdominio helicoidal- β o translocador del dominio pasajero de ambas proteínas adopta una estructura muy similar, de acuerdo a lo descrito en otros trabajos. D) El subdominio globular es donde se encuentra el sitio catalítico de la proteína, al respecto podemos observar al igual que el resto de la proteína que adoptan el mismo plegamiento, así mismo se puede observar en la figura E), una posición y orientación muy similar en los residuos que componen el sitio catalítico de ambas proteínas.

9. DISCUSIÓN

Las SPATE's son proteínas elaboradas por diferentes integrantes de la familia enterobacteriaceae entre las que se incluyen *Shigella* y los diferentes patotipos de *E. coli* (Ruy-Pérez y Nataro 2013). Se han definido como factores de virulencia de estas bacterias y participan de manera importante en la patogénesis de las diferentes alteraciones que ocasionan durante la infección (Henderson y Nataro 2001). Pet, es una proteína de alto peso molecular (104 kD) obtenida a partir del sobrenadante del cultivo de la cepa EAEC O42, aislada de un niño con diarrea de Perú y se le han atribuido efectos como citotóxico y citopático sobre células en cultivo (Eslava *et al.* 1998).

Sat otra proteasa integrante de las SPATEs, aunque, inicialmente descrita en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas por Mobley *et al.* (2000); posteriormente fue propuesta como factor de virulencia para otros grupos de bacterias como *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) así como también en *Shigella flexneri* (Nataro *et al.* 2011). Se ha probado que Sat exhibe actividad citopática sobre células HEp- 2 y células Vero cultivadas, así mismo se ha observado que Sat desencadena de manera importante vacuolización en el citoplasma de líneas celulares de vejiga y riñón de humano, así como daño glomerular observado en infecciones experimentales utilizando ratones CBA con infecciones del tracto urinario (Mobley *et al.* 2002).

La caracterización de proteínas requiere de un sistema eficiente para su producción, para lo cual se necesita desarrollar procedimientos que permitan la obtención de los productos en estudio, con un alto grado pureza (>95 %) en el menor tiempo posible. En el trabajo se utilizaron las clonas *E. coli* HB101 (pSPORT1) hiperproductora de Pet con una mutación (S260I) en su sitio catalítico (Eslava *et al.* 1998) y *E. coli* HB101 (pDG7) productora de Sat (Guyer *et al.* 2000). La obtención y purificación de ambas proteínas se realizó utilizando el procedimiento descrito por Villaseca *et al.* (2000), con algunas modificaciones que permitieron reducir en un 50 % el tiempo de purificación de los productos, con lo cual se logró aumentar la calidad de las mismas. La identidad de ambas proteínas se realizó por el procedimiento de degradación de Edman, con este se obtuvieron las secuencias que fueron analizadas en el gene Bank lo que permitió continuar con la siguiente fases del estudio.

El mecanismo específico por el cual las SPATEs son reguladas ha sido poco estudiado (Dautin *et al.* 2010), sin embargo, al parecer estímulos ambientales como temperatura, pH, y oxígeno, participan en regular su actividad. Tal hecho se puede considerar ya que proteínas como Sat son elaboradas por diversos grupos de bacterias, por lo que deberán mantener sus propiedades biológicas bajo diferentes ambientes (Mobley *et al.* 2000, Guignot *et al.* 2007). Para mostrar la capacidad proteolítica de algunas SPATEs Dutta *et al.* (2002) y Mobley *et al.* (2000), analizaron entre otras la actividad proteolítica para degradar la caseína *in vitro*. En nuestro trabajo se identificó que Sat mantiene la capacidad para romper caseína marcada con fluorescein isothiocyanate (FITC) en intervalos de pH 2 hasta pH 10 a 37 °C, con mayor actividad en condiciones básicas siendo óptima a pH 9.0. Estos resultados muestran que la actividad proteolítica de Sat no es pH dependiente, y que su actividad debe ser regulada por otros factores como

temperatura, osmolaridad como fue descrito para Pet y EspP (Eslava *et al.* 1998, Stein *et al.* 1996).

Sat al igual que Pet pertenecen a la clase I dentro de la familia SPATEs, comparten 53 % de identidad y 69 % de similitud en su secuencia primaria de aminoácidos, una de las más altas homologías entre toda la familia SPATEs. Ambas muestran actividades biológicas muy parecidas, relacionadas con la contracción del citoesqueleto y la pérdida de las fibras de estrés. Por otro lado se ha demostrado que en modelos celulares Sat promueve efectos citopáticos y en modelos animales produce lesiones histológicas en riñón (Guyer *et al.* 2002) y en asa ligada en rata desencadena la acumulación de fluidos y necrosis (Taddei *et al.* 2005). Así mismo, se ha reportado que Sat posee efectos degradantes sobre el factor de coagulación V (Dutta *et al.* 2002) y al igual que Pet sobre espectrina y fodrina (Moroncle *et al.* 2006). Al realizar el análisis del efecto de Sat sobre membranas celulares de eritrocitos de carnero, se identificó la formación de dos subproductos de degradación de (150 kDa y 120 kDa), sobre las cadenas α y β de la espectrina. Villaseca *et al.* (2000) observaron que Pet bajo las mismas condiciones, solo produce un subproducto de degradación de 120 kDa, así mismo, Moroncle *et al.* 2006 desafiaron a Sat contra proteínas de membrana de tejido de riñón y vejiga encontrando solo el subproducto de 120 KDa. La diferencia en el efecto observado, sugiere que no obstante que Pet y Sat comparten algunas características y propiedades, su comportamiento no es el mismo, hecho que probablemente determina su expresión predominante en cepas que afectan órganos y tejidos específicos (Moroncle *et al.* 2006). Además, los efectos que ambas proteínas producen está condicionado a su internalización a la célula del hospedero, dicho evento lo lleva a cabo a través de endocitosis mediada por clatrina (Navarro-García *et al.* 2007).

La formación de dos fragmentos (150 kDa y 120 kDa) en la degradación de la

espectrina es un evento similar al detectado durante el fenómeno de apoptosis en líneas celulares de murino y de manera muy particular en cultivos celulares que han experimentado extensivos procesos de apoptosis. En dichas observaciones se encontró que la fodrina es digerida hasta un solo fragmento detectable de 120 kDa, sin embargo, al analizar cultivos celulares con un menor número de células apoptóticas, se identifica solo un fragmento de 150 kDa (Martin *et al.* 1995), lo que sugiere que el fragmento de 120 kDa es un producto de degradación adicional del fragmento de 150 kDa, como se observa en el análisis desarrollado en este trabajo. El efecto degradante de Sat es dependiente de tiempo, los subproductos que aparecen a 3 y 6 horas de incubación aumentan su concentración conforme al tiempo, también se pudo observar en el ensayo de western-blot con anticuerpos anti α y β espectrina el subproducto de degradación que principalmente se incrementa es el de 150 kDa. Nath *et al.* (1996), encontraron que en necrosis celular con células SD-SY5Y de neuroblastoma, la fodrina es digerida y un producto de 150 kDa es producido por acción de calpains celulares, mientras que en células neuronales experimentando apoptosis muestran un producto de degradación de 120 kDa. Otros autores proponen que las calpains rompen la fodrina en el sitio VY†GMMP para generar un fragmento de 150 kDa localizado dentro de la secuencia justo en la parte N-terminal en el dominio de unión a la calmodulina, mientras que el inhibidor convertidor de la enzima 1- β interleucina (ICE), rompe la fodrina en la parte C-terminal en la secuencia PEST para generar un fragmento de 120 kDa (Chow *et al.* 1996). El conjunto de observaciones sugiere que Pet y Sat pudieran activar eventos de apoptosis, sin embargo, es necesario realizar estudios específicos para confirmar esta hipótesis.

Una observación al respecto es el hecho de que se ha descrito que en algunos casos la

apoptosis se desarrolla en conjunto con actividad de autofagia (Kroemer y Levine 2008), con respecto a Sat se ha reportado que induce autofagia en líneas celulares (Levin-Le *et al.* 2011). Sin embargo, los mismos autores refieren que en el caso de Sat, el daño inducido en líneas celulares y la autofagia no están relacionados con apoptosis o necrosis, además de que no se detecta la activación de caspasas las cuales están relacionadas con muerte celular (Fink *et al.* 2008).

Dutta *et al.*(2002) utilizando oligopéptidos sintéticos, identificaron diferencias en los posibles sitios blancos de las SPATEs. Al respecto Sat y Pet exhibieron una actividad preferencial sobre amino ácidos hidrofobicos (Ala-Ala-Pro-Ala, Ala-Ala- Pro-Abu [2-ácido amino butírico], y Ala-Ala-Pro-Val), así mismo, Sat mostró la propiedad de romper de manera importante los oligopéptidos Ala-Ala-Leu y Tyr-Leu-Val, sobre los cuales Pet no tuvo actividad. Al respecto se puede mencionar que a pesar de la alta similitud de secuencias entre Sat y Pet, no existen diferencias estructurales significativas, que expliquen la especificidad hacia diferentes blancos como lo sugiere Dutta *et al.* (2002).

Trabajo previo en el laboratorio (Hernández Chiñas U. *et al.* 2009), mostró que Pet induce *in vitro* quimiotaxis de células mononucleares (MN), lo anterior sugiere que las SPATEs pudieran estar relacionadas con procesos inflamatorios. Sat es una proteasa involucrada en alteraciones celulares, induce vacuolización en el citoplasma de células de vejiga y riñón de humano, así como daño glomerular en el modelo de ratones CBA con infecciones del tracto urinario (Moblely *et al.* 2002). En el trabajo se analizó con ensayos *in vitro* la capacidad de Sat para activar la migración de células MN, los resultados mostraron que Sat (2,5 µg/ml) al igual que Pet, activa la migración de estas células. Lo anterior permite proponer que esta proteasa, contribuye a la inducción de procesos inflamatorios durante la infección. Taddei *et al.* (2005), han observado en el

modelo con cámaras de Ussing que la proteína induce efecto enterotóxico en mucosa de íleon de rata, ocasionando acumulación de fluidos y necrosis. Sin embargo, es necesario ubicar los sitios específicos de la proteína involucrados en dichos eventos, para proponer alternativas para el diseño de métodos de inhibición contra Sat que contrarresten sus efectos biológicos (Hernandez-Chiñas *et al*, 2009).

Como se hizo referencia previamente, es importante conocer los sitios de interacción entre una proteína y su receptor celular, para esto se requiere conocer las características estructurales de las proteínas involucradas, entre los miembros de la familia SPATEs son pocos los trabajos realizados al respecto (Guyer *et al*. 2002, Dutta *et al*. 2003, Renn *et al*. 2008, Scaglione *et al*. 2008, Tsang *et a*. 2010). Recientemente se determinó que el receptor celular por medio del cual Pet inicia su proceso de internalización a la célula hospedero es la citoqueratina 8 (CK8), adelantando en gran manera el entendimiento de su internalización y el inicio de su actividad citopática y citotóxica (Nava-Acosta *et al*. 2013). CK8 no está presente en líneas celulares de riñón por lo que estas no son susceptibles a Pet, pero por otro lado indica que el receptor celular para Sat debe de ser diferente a la CK8 puesto que riñón es una de las principales líneas celulares sobre las que Sat muestra actividad, además de vejiga, al respecto sería importante el análisis de otras Citoqueratinas presentes en estas líneas celulares que pudieran ser el receptor celular para Sat.

Este trabajo se direccionó hacia el conocimiento de la estructura secundaria de Sat, proteasa que presenta una notable similitud (bajo porcentaje en hélice- α y alto en hoja- β), con estructuras secundarias de otros miembros de las SPATEs (Scaglione *et al.*, 2008, Reen y Clarck 2008). Yen *et al.* (2008), hacen referencia de que el dominio pasajero de las SPATEs muestra una arquitectura similar rica en hojas- β (Renn y Clark 2008), con tendencia a empaquetarse en una estructura de hojas- β paralelas. Lo anterior

ha sido corroborado en las estructuras resueltas por cristalografía como es el caso de la hemoglobina proteasa (Otto *et al.* 2005), EspP (Khan *et al.* 2011), y otras proteínas no-SPATEs como la Pertactina (Emsley *et al.* 2009) y la toxina productora de vacuolas (VacA) de *Helicobacter pylori* (Ganwer *et al.* 2007).

Los resultados obtenidos por nosotros mostraron que la estructura secundaria de Sat es relativamente estable a temperaturas fisiológicas, con pérdida del espectro en la señal de dicroísmo circular hasta los 50°C que se incrementa después de los 60°C. Al respecto, Scaglione *et al.* (2008), analizaron la estructura secundaria de Pet, al comparar dicha estructura con la obtenida con Sat en este estudio, se observó gran similitud entre las estructuras secundarias de ambas proteasas, así mismo los resultados obtenidos con Pet en su análisis por espectroscopia de fluorescencia, mostraron conformación modificada, con desestabilización gradual de la misma y apertura parcial del plegamiento terciario a temperaturas fisiológicas (37°C) y pérdida de la estructura a partir de los 45°C. Esta propiedad pudiera estar relacionada con el proceso de internalización de la proteína a sus células blanco, al respecto Navarro-García *et al.* (2000), han propuesto que Pet utiliza el sistema de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD por sus siglas en inglés), para ser internalizada hasta el citosol de la célula hospedero. Este sistema es el que utilizan las toxinas del tipo AB (Toxina del cólera) y requieren ser desensambladas en sus dos componentes para su reconocimiento por este sistema de internalización (Navarro-García *et al.* 2007). Al respecto los autores antes referidos señalan que la imposibilidad de Pet para desensamblarse se compensa con la pérdida parcial de su conformación y a través de esta acción ser reconocida por el sistema (ERAD) encargado de exportar proteínas mal plegadas. Un hecho similar pudiera ocurrir con Sat ya que se ha observado que comparte muchas propiedades con Pet como es el caso de la degradación de la fodrina de la célula (Villaseca *et al.* 2000).

Por otro lado, se implementaron diferentes métodos para la obtención de cristales de Sat. Se obtuvieron cristales de tamaño y apariencia aceptables, sin embargo, al realizar los ensayos de difracción se observó que estos no eran de buena calidad. Los resultados obtenidos sugerían que no contábamos con una proteína con los requerimientos de pureza necesaria, por lo que se intentó mejorar su calidad modificando las condiciones de purificación de la proteína, al añadir un paso más de purificación, el cual consistió en el uso de cromatografía de exclusión molecular y el empleo de diferentes condiciones de cristalización adicionales a los ya utilizados previamente (datos no mostrados). Se procedió nuevamente a la obtención de cristales, en este nuevo intento para mantener la calidad de éstos, así mismo se utilizaron diferentes crioprotectores, el resultado fue negativo ya que los cristales obtenidos no difractaron. Los resultados adversos sugieren, que la obtención de cristales de Sat incapaces de difractar no está relacionado con los posibles contaminantes en la muestra o con el fenómeno de autodegradación inherente a la proteína, el problema pudiera estar relacionado de manera directa con la inestabilidad o flexibilidad que han mostrado tener las proteínas SPATEs en algunos de sus dominios como lo muestran Khan *et al.* (2011), Jhonson *et al.*(2009) y Otto *et al.* (2005), en donde de manera particular, los tres trabajos mencionan sitios de mayor movilidad, sobre todo en la parte C-terminal, lo que le confiere a la proteína inestabilidad que al parecer afectando la calidad de difracción de los cristales obtenidos de Sat, lo cual, al parecer en los trabajos mencionados lo han resuelto por difracción de dispersión/difracción anómala simple (SAD, single-wavelength dispersion) o dispersión/difracción anómala múltiple (MAD, multiple-wavelength dispersion). En donde se utilizan metales pesados ya sea que están presentes en la proteína de manera natural o son incorporados a la molécula mediante técnicas biológicas o químicas entre

estas la más frecuentemente empleada es la sustitución de los átomos de azufre en el aminoácido metionina por selenio.

No obstante existen otros caminos que pudiesen ser explorados con posibilidad de resolver el problema de la mala capacidad de difracción de los cristales de Sat obtenidos, dichos caminos consisten por un lado a la cristalización de los principales dominios de Sat (Dominio pasajero, Traslocador- β), por separado, lo cual no se ha realizado en ninguno de los proyectos para la determinación de algunas estructuras SPATEs previamente resueltas, así mismo otra vía que ya ha sido explorada, es realizar una mutación en el residuo Ser260 de la estructura primaria de Sat para eliminar el proceso de autodegradación, no obstante, esto último no dio resultado con EspP (Khan *et al.* 2011).

El análisis de la estructura del dominio pasajero de Pet, a una resolución de 2.3 amstrongs por reemplazo molecular utilizando como templados las estructuras previamente descritas (PDB 1WXR, PDB 3SZE), mostró que comparte 27 % de identidad y 43 % de similitud con la proteasa HbP y 49 % de identidad y 65 % de similitud respecto a EspP.

No obstante la baja identidad entre la secuencias del dominio pasajero de Pet con EspP (Khan *et al.* 2011) y HbP (Otto *et al.* 2005), se observa en forma general una marcada similitud estructural entre estas proteínas, sin embargo, en un análisis detallado de los diferentes dominios que comprenden estas proteínas, se pueden identificar pequeñas variaciones dentro de las cuales pudieran estar enmarcadas las diferencias que muestran las proteínas respecto a sus funciones biológicas.

Este subdominio esta compuesto por 257 aminoácidos (1-257), dentro del cual se encuentra el motivo catalítico conservado GDSGS. Al realizar una superposición de la

estructura del dominio pasagero de Pet con las estructuras de HbP y EspP (Otto *et al.* 2005 y Khan *et al.* 2011) en el espacio tridimensional, revela la misma orientación en los residuos que conforman los sitios catalíticos de Pet y EspP, mientras que los residuos del sitio catalítico de HbP no comparten la misma orientación en el espacio tridimensional. La mayor identidad y similitud entre las secuencias de Pet y EspP pudiera estar influyendo para que los sitios catalíticos confluyan en un mismo espacio, lo anterior podría relacionarse con las propiedades biológicas similares en ambas proteínas (Dautin *et al.* 2010). Caso contrario a lo observado con HbP que presenta actividad de degradación de hemoglobina para la liberación del grupo Hem en los sitios de infección (Otto *et al.* 2005). Sat al igual que Pet y EspP tiene actividad biológica sobre caseína y fodrina (Dautin *et al.* 2010), al analizar su estructura obtenida por modelaje en computadora, se identificó que la orientación de su sitio catalítico es muy parecido al identificado en Pet y EspP, así mismo, la estructura general que muestra Sat es de una gran similitud a las obtenidas por cristalografía, sin embargo, es importante mencionar que a pesar de los avances en el análisis de estructuras por modelaje en computadora, no se compara con lo que se obtiene de manera experimental, por lo que es trascendental realizar esfuerzos tomando en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento para la obtención de la estructura de Sat por cristalografía y difracción de rayos-X.

Una de las principales razones del estudio estructural de una proteína por cristalografía es analizar posibles diferencias estructurales entre la proteína objeto de estudio y sus homólogos, con la finalidad de determinar si estas diferencias son las responsables de la actividad biológica específica que muestran y en ese sentido diseñar metodos de diagnóstico o medidas de neutralización, por otro lado existen técnicas para el análisis de la importancia que reside en aminoácidos que forman parte de la proteína, una de

estas técnicas es mutagénesis dirigida, que consiste en el cambio de un aminoácido por otro y determinar el efecto que deriva de esta mutación, para el caso de la familia SPATEs se ha utilizado para el estudio del proceso de secreción y su actividad toxigénica, Dutta *et al.* (2003) identificaron diversas mutaciones que derivaron en la pérdida de actividad toxigénica de Pet o su incapacidad para ser secretada al medio extracelular, estas mutaciones al parecer inciden directamente en la estabilidad de la proteína, ya que en este presente trabajo se identificó que algunos de los aminoácidos mutados ofrecen estabilidad a la proteína a través de puentes de hidrógeno y puentes salinos, como es el caso de M55, W61, los cuales son parte de un grupo de aminoácidos que forman una red de puentes de hidrógeno que dan estabilidad a este subdominio, al respecto Khan *et al.* (2011), refieren en EspP un conjunto de 4 metioninas (Met58, Met69, Met 227, Met600), el cual confiere estabilidad a EspP, así como una red de puentes de hidrógeno, sin embargo, no se ha comprobado el efecto que se pudiera obtener si se realiza alguna mutación sobre estos aminoácidos en EspP, ya que hasta el momento se sugiere que algunos aminoácidos relacionados con la estabilidad de la proteína al ser mutados modifican la actividad de estas proteínas, sobre todo la especificidad por sustratos y la capacidad de secreción, al parecer sería interesante complementar estos estudios ya que hasta el momento los trabajos indican que la parte de actividad proteolítica se encuentra en el subdominio globular de la proteína sin embargo, la parte más prominente de la proteína conformada por el subdominio helicoidal- β “ β -stalk”, al parecer esta involucrado en otras funciones además de la secreción de la proteína.

En el presente trabajo se encontró que los aminoácidos Phe245, Leu253, Leu256, Phe257, Iso258 conforman una hélice- α , que conecta el dominio globular y el dominio C-terminal (“ β -stalk”) en Pet, Scaglione *et al.* (2008) sugieren en su trabajo que estos

mismos aminoácidos con características hidrófobas no poseen estructura secundaria, lo cual los deja expuestos en la superficie de la molécula, sugiriendo que debido a ello estos aminoácidos son reconocidos por el sistema ERAD para el proceso de internalización de la proteína a la célula hospedero, no obstante la activación del sistema ERAD requiere de cambios estructurales en la proteína, al parecer Pet pudiera activarlo al tener aminoácidos hidrófobos expuestos en la superficie, sin embargo, este trabajo indica que los aminoácidos Phe245, Leu253, Leu256, Phe257, Iso258 no están expuestos totalmente a la superficie ya que se encuentran formando una hélice- α , por lo que es improbable que sean relevantes para la activación del sistema ERAD en las células hospedero y que deben de ser otros sitios de la proteína relacionados con este proceso. Por ello, para poder descartar totalmente su propuesta, se requiere realizar sobre estos residuos ensayos de sustitución por mutagénesis y determinar su efecto en el proceso de internalización a las células hospedero.

En los modelos de las SPATEs reportados hasta el momento, las diferencias más notables muestran la existencia de un subdominio 2 presente solo en HbP (Otto *et al.* 2008) y en IgAP (Jhonson *et al.* 2009), este subdominio 2 al parecer en HbP es necesario para el reconocimiento del grupo Hem, y para IgAP tiene un papel importante en el reconocimiento y la unión al dominio Fc de IgA1. Por otro lado en las estructuras de EspP (Khan *et al.* 2011), Pet (este trabajo) y Sat (obtenida por modelaje), no presentan el subdominio 2, Tal hecho confirma que el dominio globular es el único responsable de la actividad proteolítica de estas SPATEs.

En Pet, los aminoácidos 569-631 constituyen el subdominio 3, la estructura que adopta presenta un notable parecido al dominio de unión a quitina de la quitinasa b (PDB:1E15), con un motivo estructural hélice-vuelta-hélice que descansa sobre el subdominio globular. En el caso de Pet este subdominio 3 pudiera estar participando en

la estabilidad del subdominio globular. Lo anterior por efecto de la formación de una interface entre ambos subdominios, con la interacción de 8 puentes de hidrogeno, un puente salino y la presencia de las dos cisteinas de la estructura que no parecen estar formando un enlace disulfuro, lo cual vendría a ofrecer mayor estabilidad.

La formación de esta interfaz se ha propuesto en HbP (Otto *et al.* 2005) conformada por 36 aminoácidos (608-644) y en EspP por 62 residuos (569-630), en este último además se estima la formación de 13 enlaces de hidrogeno y 6 puentes salinos, permitiendo la formación de una interfaz más fuerte comparada con la interfaz que se pudiera estar formando entre los subdominios globulares y el subdominio 3 de Pet y HbP. Aunque la función real de estos subdominios no esta bien definida, la interfaz que ofrecen estos subdominios, por un lado podrían ofrecer mayor estabilidad a este complejo, pero por otro lado, podría estar restringiendo la movilidad del subdominio globular y jugar un papel importante en el reconocimiento y afinidad por sustratos, al mantener la estructura nativa de este subdominio. Dutta *et al.* (2003) mencionan la importancia de algunos aminoácidos para la actividad de Pet, específicamente algunos residuos que forman parte de esta interface, como perspectiva es importante determinar si la especificidad o la afinidad de Pet se modifican al realizar mutaciones en algunos de los residuos que forman la interface entre el subdominio globular y el subdominio 3.

El subdominio 4 en Pet está compuesto por 33 aminoácidos (615-648), saliendo directamente de la parte helicoidal- β . Este es conservado en las estructuras de Hbp, IgAP y EspP, formando enlaces de hidrogeno con la parte que funciona como translocador, se sugiere que este subdominio junto con el subdominio 3 actuan como pedestal en donde el dominio de serina proteasa puede descansar, este modo de interacción es conservado tanto en Hbp, EspP, IgAP como en Hap (Meng *et al.* 2011).

Se estima que más del 97 % de las proteínas autotransportadas adoptan la estructura helicoidal- β en su parte C-terminal, no obstante la función de este subdominio dentro de esta familia de proteínas no se ha definido aún. Lo observado al analizar la estructura obtenida de Pet, mostró que este subdominio está constituido por 26 vueltas, mientras que EspP y HbP poseen 28 y 29 vueltas respectivamente. Las vueltas están compuestas de 23 a 24 aminoácidos, formando cada vuelta 3 hebras- β de 2 a 12 aminoácidos interconectadas por “asas o loops”.

En estudios previos Yen *et al.*(2008), plantean por análisis bioinformático de todas las SPATEs descritas, que de los 1200 aminoácidos que aproximadamente conforman estas proteínas, 173 son residuos conservados. Tal hecho plantea que éstos contribuyen de manera general a la estabilidad estructural y la capacidad funcional de dichas proteasas, en su reporte sugiere además que estos 173 aminoácidos comprenden 6 regiones, en donde la mayoría de ellas están localizadas en “loops”. Nuestros resultados de la estructura tridimensional de Pet muestran en el dominio β -helicoidal (“ β -stalk”) un alto contenido de Asparagina (N) y ácido aspártico (D) presentes en los “loops”, lo que sugiere que estas regiones participan en forma importante en la funcionalidad de la proteína y en menor cuantía en su función estructural. La invariabilidad que Yen *et al.* (2008) reportaron en “loops” de proteínas autotransportadas es congruente con lo que muestra Pet en su estructura, particularmente en el dominio β -helicoidal (“ β -stalk”), donde se identificó la secuencia de residuos N511, D590, N609, D659, D679 y N833 y N855. Esta secuencia es una característica común también observada en otras proteínas autotransportadas (Otto *et al.*, 2005 Jhonson *et al.* 2009), con pequeñas modificaciones, así mismo, Meng *et al.*, (2011) refieren que la proteína autotransportada Hap secretada por *H. influenzae* contiene esta misma secuencia y que debido a esto Hap es capaz de formar oligómeros en forma de estructuras conocidas como autotransportes auto-

asociados ó SAATs por sus siglas en ingles, los cuales promueven la agregación bacteriana y la formación de microcolonias, importantes en el proceso de formación de biofilms (Klemm *et al.* 2006), lo que le confiere a la bacteria mayor capacidad de sobrevivencia en medios adversos, incluyendo hospedero, además, incrementa considerablemente la resistencia bacteriana a antibióticos y detergentes.

Meng *et al.* (2011), mencionan que la eliminación del subdominio 2 en Hbp la imposibilita para la formación de estas superestructuras, por otro parte IgAP1 con un subdominio 2 más voluminoso y dominio helicoidal- β más corto que los demás SPATEs además de variaciones en su parte C-terminal explicarían la ausencia del fenómeno de autoagregación en esta proteína. Sin duda, es importante resaltar la gran importancia que al parecer reside en la parte helicoidal- β de las SPATEs, ya que por un lado sigue un mecanismo vectorial y sirve como templado o auto chaperona para iniciar el proceso de plegamiento siendo así como hasta el momento se explica la ausencia de energía externa en este proceso, por otro lado está involucrado en el proceso de translocación de las SPATEs al medio extracelular. No obstante la aparente importancia de este dominio, para la translocación de las SPATEs al medio extracelular, ha sido puesta en entredicho al existir otras proteínas autotransportadas como EstA de *P. auroginosa* que está desprovista del dominio helicoidal- β y es secretada normalmente al medio extracelular (Dautin *et al.* 2010), así mismo, Khan *et al.* (2011), removieron el dominio helicoidal- β entero en EspP, YpsA, IgAP y AIDA-I, reemplazando este dominio por anticodinas (Proteínas artificiales de 20 kDa derivadas de lipocalinas de humano) sin derogar la translocación del dominio pasajero al medio extracelular, demostrando claramente que la estructura del dominio helicoidal- β no es un requerimiento absoluto para el mecanismo de translocación de los dominios pasajeros de las proteínas autotransportadas a través de la membrana externa bacteriana de acuerdo

con esto, sería de suma importancia realizar ensayo *in vitro* para analizar la formación de autoagregados de Pet en forma de biofilms o la formación de estructuras tipo cuerdas “ropes” (Xicohtencatl-Cortez *et al.* 2010) también asociadas a la resistencia a antibióticos bacteriana, así como el diseño de mutaciones o de sustitución de residuos en regiones que pudieran estar involucradas en la autoasociación de Pet sobre todo en los residuos N511, D590, N609, D659, D679 y N833 y N855. La flexibilidad que presenta Pet en su parte C-terminal puede ser una característica intrínseca del dominio helicoidal- β (“ β -stalk”) en Pet y podría jugar un importante rol en la interacción del patógeno con las células del hospedero o para desencadenar la formación de biofilms de acuerdo a lo que se ha descrito en otras proteínas autotransportadas (Meng *et al.* 2011).

Previamente referimos la dificultad que representa la obtención de cristales de Sat para el estudio de su estructura por difracción de rayos X. Como sabemos Pet y Sat tienen una alta identidad y similitud en su secuencia de aminoácidos, tal situación fue considerada para utilizar como template la estructura del dominio pasajero de Pet obtenida por cristalografía y diseñar un modelo tridimensional por computadora de Sat. El resultado mostró que de manera general la estructura tridimensional de ambas proteínas es muy parecida (figura 25a) aunque, existen pequeñas diferencias. Lo anterior se puede corroborar al observar los residuos de serina e histidina componentes del sitio catalítico de ambas proteínas que se localizan en la misma posición y orientación (figura 25E), además, los subdominios de la parte media del dominio C-terminal entre los aminoácidos 517-577, 615-648, 712-726, 765-784 (Figura 25C) tampoco muestran diferencias en cuanto a su plegamiento, al respecto consideramos que las diferencias sustanciales entre Pet y Sat podrían estar en el dominio helicoidal- β (“ β -stalk”) de ambas proteínas, sin embargo, es importante señalar que la estructura de Sat es por modelaje en computadora y existe la posibilidad de variaciones importantes a lo

que se podría obtener por cristalografía, por ello es necesario seguir trabajando en el estudio de estas proteínas por cristalografía de rayos-X, a fin de obtener más datos experimentales de sus estructuras que permitan aumentar el entendimiento de la relación que guarda la estructura con la función que muestran estas proteínas, lo que permitira construir caminos alternos en el desarrollo de nuevos fármacos contra estos notorios grupos de bacterias patogénicos en el futuro.

10. CONCLUSIONES

Las modificaciones en el proceso de aislamiento y purificación de Sat y Pet permitió reducir el tiempo de obtención en 50 %. La caracterización biológica de Sat demostró que esta posee su mayor capacidad proteolítica *in vitro* a pH 9 utilizando caseína marcada, además, utilizando membranas celulares de eritrocito de carnero, Sat generó dos fragmentos de 120 y 150 KDa productos de la degradación de las cadenas α y β de espectrina. Sat activa las células mononucleares *in vitro*. La estructura secundaria de Sat por diroísmo circular se estima con un 7.32 % en hélice- α , 37.02 % en hojas- β , 21.47 % en “loops” y 33.66 % en estructura desordenada. Sat cristaliza en la condición de sulfato de magnesio hidratado 0.6 M, sodium-HEPES 0.1 M pH 7.5, 2-methyl-2,4 pentanodiol 4 % utilizando una concentración de 7 mg/ml a 18 °C, durante 3 semanas de incubación, los cristales obtenidos bajo estas condiciones no tienen capacidad de difracción. Pet se cristalizó en la condición de prolina 0.2 M, HEPES 0.1 M (pH 7.5), 10 % w/v PEG 3350 en un tiempo de incubación de 3 semanas a 18 °C utilizando una concentración de 13 mg/ml y se logró obtener la estructura con un nivel de resolución de 2.3 Å por reemplazo molecular. La estructura tridimensional posee dos dominios principales; dominio globular el cual se asocia a la actividad catalítica constituido por 257 aminoácidos (1-257) y dominio C-terminal o β -stalk con 707 aminoácidos (258-964), además la estructura muestra dos subdominios que salen directamente del dominio C-terminal, dominio 3 con 61 aminoácidos (517-578) y dominio 4 con 33 aminoácidos (615-648), ambos subdominios son conservados en HbP, IgAP y EspP. Pet no muestra el subdominio 2 presente en IgAP y HbP.

11 APÉNDICES

11.1 Abreviaturas

aa	Aminoácido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
BSA	Albúmina Sérica Bovina
°C	Grados centígrados
cm	Centímetros
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Gramos
h	Horas
kDa	Kilo Daltones
Kg	Kilogramos
LB	Medio Luria Bertroni
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
FPLC	Fast protein liquid chromatography
M	Molaridad
mA	MiliAmperes
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
μL	Microlitros
N	Normalidad
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
PBS	Solución amortiguadora de Fosfatos
Sat	Toxina autotransportada secretada
Pet	Toxina codificada en Plásmido
SPATES	Serin Proteasas de la Familia <i>Enterobacteriaceae</i>
Abs	Absorbancia
RMSD	Root-Mean Square Deviation
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
HbP	Hemoglobin Protease
EspP	Extracelular serine protease plasmid-encoded
PDB	Protein Data Bank

11.2 Medios y soluciones

Medios de Cultivo

Caldo Luriacon 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 Na_2HPO_4
- 2.4 g KH_2PO_4

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 Fosfato de Sodio

- Na₂HPO₄ 0.0669 M
- NaH₂PO₄ 0.0030 M

Disolver las sales y ajustar el pH a 8.2.

Solución Amortiguadora de Buffer Leammli (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
- Glicina 0.1M

Solución de Desteñido

- Metanol 30%
- Ácido Acético Glacial 10%

Buffer Universal

Ácido Citríco 0.1 M 21.01g/L)

Fosfato de Potasio 0.1 M (13.61g/L)

Tereaborato de Sodio 0.1 M (19.07g/L)

Tris 0.1 M (12.11g/L)

Cloruro de potasio 0.1 M (7.46g/L)

Disolver en 1 litro de agua destilada y ajustar pH (2-10)

Sulfato de Amonio

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 % Saturación (221 g/l)

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

12 REFERENCIAS

Abby S. S., Rocha E. P. (2012). The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. *PLoS Genet.* 8:e1002983 10.1371

Abdallah A. M, Gey van Pittius N. C, Champion P. A, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls C. M, Appelmelk B. J, Bitter W. (2007) Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol*;5(11):883-91.

Adams P. D, Afonine P. V, Bunkóczi G, Chen V. B, Davis I. W, Echols N, Headd J. J, Hung L. W, Kapral G. J, Grosse-Kunstleve R. W, McCoy AJ, Moriarty N. W, Oeffner R, Read R. J, Richardson D. C, Richardson J. S, Terwilliger T. C, Zwart P. H, PHENIX: (2010) a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*; 66: 213–221.

Aguirre B, Costas M, Cabrera N, Mendoza-Hernández G, Helseth D. L Jr, Fernández P, de Gómez-Puyou M. T, Pérez-Montfort R, Torres-Larios A, Gómez Puyou A. (2011). A ribosomal misincorporation of Lys for Arg in human triosephosphate isomerase expressed in *Escherichia coli* gives rise to two protein populations. *PLoS One*;6(6):e21035.

Al-Hasani K, Henderson I. R, Sakellaris H, Rajakumar K, Grant T, Nataro J. P, Robins-Browne R, Adler B. (2010). The sigA Gene Wch is Borne on the she Pathogenicity Island of *Shigella flexneri* 2^a. Encodes an Exported Cytopathic Protease Involved In Intestinal Fluid Accumulation. *Infect. Immun.*; 68(5):2457-63.

Al-Hasani K, Rajamumar K, Bulach D, Robins-Browne R, Adler B, Sakellaris H. (2001). Genetic Organization of the she Pathogenicity Island in *Shigella flexneri* 2^a. *Microbiol. Patho.*; 30(1):1-8.

Al-Hasani K, Navarro-García F, Huerta J, Sakellaris H, Adler B. (2009). The Immunogenetic Enterotoxin of *Shigella flexneri* 2^a binds to HEp-2 Cells and Induces Fodrin Redistribution in Intoxicated Epithelial Cells. *Plos One*; 4(12):e8223.

Anderson M, Aly K. A, Chen Y. H, Missiakas D. (2013). Secretion of atypical protein substrates by the ESAT-6 secretion system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*;90(4):734-43.

Barnard TJ, Dautin N, Lukacik P, Bernstein H. D, Buchanan S. K. (2007). Autotransporter Structure Reveals Intra-Barrel Cleavage Followed by conformational Changes. *Nat. Struct. Mol. Biol*; 14(23):132-25.

Bassinat, L., P. Gueirard, B. Maitre, B. Housset, P. Gounon, and N. (2000). Guiso. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun*; 68:1934–1941.

Beare P. A, Chen C, Bouman T, et al. (2008). Candidate antigens for Q fever serodiagnosis revealed by immunoscreening of a *Coxiella burnetii* protein microarray. *Clin. Vaccine Immunol.* 15:1771–1779.

- Benjelloun-Touimi Z**, Sansonetti PJ, Parsot C. (1995). SepA, The Major Extracellular Protein of *Shigella flexneri*: Autonomous Secretion and Involvement in Tissue Invasion. *Mol. Microbiol*; 17(1):123-35.
- Benjelloun-Touimi Z**, Si Tahar M, Montecucco C, Sansonetti P. J, Parsot C. (1998). SepA, the 110 KDa Protein Secreted by *Shigella flexneri*; two-domain Structure and Proteolytic Activity. *Microbiology*; 144(pt 7):1815-22.
- Betancourt-Sánchez M**, Navarro-García F. (2009). Pet Secretion, Internalization and Induction of Cell Death During Infection of Epithelial Cells by Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Microbiology*; 155(pt 9): 1815-22.
- Bernhard Rupp and Katherine A. Kantardjieff**, *Molecular Biomechanics Handbook*, 2nd Edition, chapter 47
- Binet R**, Létoffé S, Ghigo JM, Delepelaire P, Wandersman C. (1997). Protein Secretion by Gram-negative Bacterial ABC Exporters. *Gene*; 192(1):7-11.
- Bingle L. E**, Bailey CM, Pallen MJ. (2008). Type VI Secretion: a Beginner's Guide. *Curr. Opin. Microbiol*: 11(1):3-8.
- Bradford M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal.Biochem*; 72: 248–254.
- Braun, V.**, Ondraczek, R. & Hobbie, S. (1993). Activation and secretion of Serratia hemolysin. *Zentralbl. Bakteriologie*. 278, 306–315.
- Brunder W**, Schmidt H, Karch H.(1997). EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V, *Mol. Microbiol*; 24: 767–778.
- Brünger A. T**, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*; 54: 905–921.
- Brünger A. T**, Adams PD, Fromme P, Fromme R, Levitt M, Schroeder GF. (2012). Improving the Accuracy of Macromolecular Structure Refinement at 7 angstrom Resolution, *Structure*; 20: 957–966.
- Boisen N**. Ruiz-Pérez F, Scheutz F, Kroghfelt KA, Nataro JP. Short Report: (2009). High Prevalence of Serine Protease Autotransporter Cytotoxins Among Strains of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*; 80(2):294-301.
- Canizalez-Román A**, Navarro-García F. (2003). Fodrin CaM-binding domain Cleavage by Pet from Enteroaggregative *Escherichia coli* Leads to Actin Cytoskeletal Disruption. *Mol. Microbiol*; 48(4):947-58.
- Chandran V**, Fronzes R, Duquerroy S. (2009). Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature*; 462:1011–1015.
- Chow SC.**, Weis M., Kass GE., Holmstrom TH., Eriksson JE., and Orrenius S. (1995).

Involvement of multiple proteases during Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes. FEBS Lett. 364:134–138.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. Appl. Environ. Microbiol; 66(10):4555-8.

Czajkowsky D. M, Iwamoto H, Cover T. L, Shao Z. (2006). The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999; 96:2001

Daleke M. H, Ummels R, Bawono P, Heringa J, Vandembroucke-Grauls CM, Luirink J, Bitter W. (2012). General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion pathway. Proc Natl Acad Sci U S A; 109(28):11342-7.

Dautin N, Barnard TJ, Anderson DE, Bernstein HD. (2007b). Cleavage of a Bacterial Via the Autotransporter by Evolutionarily convergent Autocatalytic Mechanism. EMBO J; 26(7):1942-52.

Dautin N, Bernstein HD. (2007a). Protein Secretion in Gram-negative Bacteria Via the Autotransporter Pathway. Annu. Rev. Microbiol; 61:89-112.

Dautin N. (2010). Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function, Toxins Basel; 2(6):1179–1206.

Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR. (2004). Type V Protein Secretion: Simplicity Gone Awry? Curr Issued Mol. Biol; 6(2):111-24.

Desvaux M, Cooper LM, Filenko NA, Scott-Tucker A, Turner SM, Cole JA, Henderson IR. (2006). The Unusual Extended Signal Peptide Region of the Type V Secretion System in Phylogenetically Restricted. FEMS Microbiol. Lett; 264 (1)22-30.

Desvaux M, Scott-Tucker A, Turner SM, Cooper LM, Huber D, Nataro JP, Henderson IR. (2007). A conserved Extended Signal Peptide Region Directs Posttranslational Protein Translocation Via a Novel Mechanism. Microbiology; 153(pt 1):59-70.

Djafari S., Ebel F, Deibel C, Krämer S, Hudel M, Chakraborty T. (1997). Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Mol. Microbiol. 25:771–784.

Drago-Serrano M. E, Parra SG, Manjarrez-Hernández HA. (2006). EspC, an Autotransporter Protein Secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Displays Protease Activity on human Hemoglobin. FEMS Microbiol. Lett; 265(1):35-40.

Dutta P. R, Sui BQ, Nataro JP. (2003). Structure-function Analysis of the Enterogagregative *Escherichia coli* Plamid-Encoded Toxin Autotransporter Using Scanning Linker Mutagenesis. J. Biol. Chem, 278(41):39912-20.

Dutta P. R, Cappello R, Navarro-García F, Nataro J. (2002). Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae, Infect. Immun., 70 7105–7113.

D'enfert C, Chapon C, Pugsley AP. (1987). Export and Secretion of the Lipoprotein Pullulanase by *Klebsiella Pneumoniae*. Mol Microbiol; 1(1):107-16.

Economou A, Christie PJ, Fernández RC, Palmer T, Plano GV, Pugsley AP. (2006). Secretion by numbers: Protein Traffic in Prokaryotes. *Mol. Microbiol.*; 62(2):308-19.

Edman P. (1950). Chemistry of amino acids and peptides. *Annu Rev Biochem*;28:69-96.

Egan F., Barret M. and O’Gata F. (2014). The SPI-1-like Type III secretion system: more roles than you think. *Front Plant Sci*; 5(34). 1-7.

Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW. (1996). Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P69 pertactin, *Nature*, 381 90–92.

Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Le Bouguéne C, Denamur E. (2004). A Specific Genetic Background is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol*; 21(6):1085-94.

Eslava C, J. Villaseca, R. Morales, A. Navarro and Cravioto. (1993). Identification of a protein with Toxigenic Activity Produced by Enteroaggregative *Escherichia coli*, Abstr.B-105. In Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Eslava C, Navarro-García F, Czczulin J.R, Henderson I. R, Cravioto A, Nataro J. P. (1998). Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, 66 3155–3163.

Evans M. L, Chapman M. R. (2013). Curli biogenesis: Order out of disorder. *Biochim Biophys Acta*; 27: 167-4889

Fekkes P, Driessen AJ. (1999). Protein Targeting to the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*; 63(1):161-73.

Felix Cleemann, and Peter Karuso. (2008). Fluorescence Anisotropy Assay for the Traceless Kinetic Analysis of Protein Digestion. *Anal. Chem*; 80 (11), 4170-4174

Fenton M. J, Vermeulen M. W. (1996). Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 64:683–690.

Filloux A, Hachani A, Bleves S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*;154(Pt 6):1570-83.

Filloux A. (2013). The rise of the Type VI secretion system. *F1000Prime Rep.*;5:52

Fink D. L, Cope L. D, Hansen E. J, Geme JW 3rd. (2001). The *Haemophilus influenzae* Hap Autotransporter is a Chymotrypsin clan Serine Protease and Undergoes Autoproteolysis via an Intermolecular Mechanism. *J. Biol. Chem.*; 276(42):39492-500.

Fink D. L, Buscher A. Z, Green B, Fernsten P, Geme JW 3rd. (2003). The *Haemophilus influenzae* Hap Autotransporter Mediates Microcolony Formation and Adherence to Epithelial Cells and Extracellular Matrix via Binding Regions in the C-terminal end of the Passenger domain. *Cell Microbiol*; 5(3):175-86.

Fink, S. L., Bergsbaken, T., and Cookson, B. T. (2008). Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 4312–4317.

Finlay B. B, Falkow S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:136–169.

Gangwer K. A, Mushrush D. J, Stauff D. L, Spiller B, McClain M. S, Cover T. L, Lacy D. B. (2007). Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104;16293–16298.

Gawarzewski I, Tschapek B, Hoepfner A, Jose J, Smits S. H, Schmitt L. (2013). Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the transport unit of the monomeric autotransporter AIDA-I from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*;69

Gey van Pittius N. C, et al. (2001). The ESAT-6 gene cluster of Mycobacterium tuberculosis and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol*, 2(10)

Greenfield N. J. (1996). Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Analytical Biochemistry*; 235, 1–10.

Greenfield N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protocol*; 6(1):2876-90

Goessweiner-Mohr N, Arends K, Keller W, Grohmann E. (2013). Conjugative type IV secretion systems in Gram-positive bacteria. *Plasmid*;70(3):289-302.

Guignot J, Chaplais C, Coconnier-Polter M. H, Servin A. L. (2007). 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*;9(1):204-21.

Gutiérrez-Jiménez J, Arciniega I, Navarro-García F. (2008). The Serine Protease Motif of Pic Mediates a Dose-Dependent Mucolytic Activity After Binding to Sugar constituents of Mucin Substrate. *Microb. Patho*; 45(2):115-23.

Guyer D. M, Henderson I. R, Nataro J. P, Mobley H. L. (2000). Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, 38;53–66.

Guyer D. M, Radulovic S, Jones F. E, Mobley H. L. (2002). Sat, the Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli* is a Vacuolating Cytotoxin for Bladder and Kidney Epithelial Cells. *Infect. Immun*; 70(8):4539-46.

Hedstrom L. (2002). An Overview of Serine Proteases. *Curr. Protoc Protein Sci*; Chapter 21: Unit 21.10.

Henderson IR, Navarro-García F, Nataro JP. (1998). The Great Escape: Structure and Function of the Autotransporter Proteins. *Trends Microbiol*; 6(9):370-8.

Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. (1999). Characterization of

pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, 67;5587–5596.

Henderson I. R, Cappello R, Nataro J. P. (2000). Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol*;8(12):529-32

Henderson I. R, Nataro J. P. (2001). Virulence functions of autotransporter proteins, *Infect.Immun.* 69;1231–1243.

Henderson I. R, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernández RC, Ala'Aldeen D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR, 68 692–744.

Hernández-Chiñas U, Sr. J. Lama-Plata, M. Solano, A. Navarro, T. Sainz, C. González, C. Eslava. (2008). Correlation Between the Presence of pet, pic and sat Genes and their expression in Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Children With and Without Diarrhea. ¹⁰⁸ American Society for Microbiology. Boston Mass. USA.

Heras B, Totsika M, Peters K. M, Paxman J. J, Gee C. L, Jarrott R. J, Perugini M. A, Whitten A. E, Schembri M. A. (2014). The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 7;111(1):457-62

Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. (1999). Phylogenetic Distribution of Branched RNA-linked Multicopy Single Stranded DNA Among Natural Isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*; 172(11):6175-81.

Hoiczyk, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A. & Heesemann, J. (2000). Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo. J*. 19, 5989–5999.

Hood R. D, Singh P, Hsu F, Güvener T, Carl M. A, Trinidad R. R, Silverman J. M, Ohlson B. B, Hicks K. G, Plemel R. L, Li M, Schwarz S, Wang W. Y, Merz A. J, Goodlett D. R, Mougous J. D. (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe*;7(1):25-37.

Hubber A, Roy CR. (2010). Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*; 26:261–283.

Jarvis K. G, Girón J. A, Jerse AE, McDaniel T. K, Donnenberg M. S, Kaper J. B. (1995). Enteropathogenic *Escherichia coli* Contains a Putative Type III Secretion System Necessary for the Export of Proteins Involved In Attaching and Effacing Lesion Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*; 92(17):7996-8000.

Johnson T. A, Qiu J, Plaut A. G, Holyoak T. (2009). Active-site gating regulates substrate selectivity in a chymotrypsin-like serine protease: The structure of *Haemophilus influenzae* immunoglobulin A1 protease. *J Mol Biol*; 389:559–574.

Johnson, W. C., Jr. (1999). Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins: Struct. Funct. Genet*;35, 307–312.

Kabsch W. (2010) .XDS, *Acta Crystallogr.D Biol. Crystallogr.*, 66;125–132.

Kajava AV, Steven AC. (2006). The turn of the screw: variations of the abundant beta-solenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. *J Struct Biol*;155(2):306-15.

Karplus PA, Diederichs K. (2012). Linking Crystallographic Model and Data Quality, *Science*, 336;1030–1033.

Kelly SM., Price NC. (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function, *Curr. Prot. Pept. Sci.* 1 ;349–384.

Kelly MS, Jess JT, Price NC.(2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751;119 – 139

Khan S, Mian HS, Sandercock LE, Chirgadze NY, Pai EF. (2011). Crystal structure of the passenger domain of the *Escherichia coli* autotransporter EspP. *J Mol Biol*; 413(5):985-1000

Klemm P, Vejborg RM, Sherlock O. (2006). Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. *Int J Med Microbiol* 296: 187–195

Knowles T. J., Scott-Tucker A., Overduin M., Henderson I. R. (2009). Membrane protein architects; The role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* 7; 206-214.

Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 1004–1010.

Kostakioti M, Stathopoulos C. (2006). Role of the Alpha-helical Linker of the C-terminal Translocatos in the Biogenesis of the Serine Protease Subfamily of Autotransporter. *Infect. Immun*; 74(9):4961-9.

Langer G, S.X. Cohen, V.S. Lamzin, A. Perrakis. (2008). Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7, *Nat. Protoc.*, 3;1171–1179.

Lambert C, Leonard N, De Bolle X, Depiereux E. (2002). ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics*;18:1250–1256.

Leo JC, Grin I, Linke D. (2012). Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Apr 19;367(1592):1088-101

Létoffé S, Ghigo JM, Wandersman C. (1994). Secretion of the *Serratia marcescens* HasA Protein by an ABC Transport. *J. Bacteriol*; 176(17):5372-7.

Leva R, Bernstein HD. (2009). Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*;106(45):19120-5.

Levin-le M. V., Comenge Y, Ruby V, Amsellem R, Nicolas V, and Servin A. L. (2011). Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that

relies on cell detachment. *Cell. Microbiol.* 1-22.

Leyton D. L., Sloan J, Hill RE, Doughty S, Hartland EL. (2003). Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*: similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA, *Infect. Immun.*, 71;6307–6319.

Leyton D. L., Rossiter AE, Henderson IR. (2012). From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nat Rev Microbiol*;10(3):213-25.

Leo, J. C., Elovaara, H., Bihan, D., Pugh, N., Kilpinen, S. K., Raynal, N., Skurnik, M., Farndale, R. W. & Goldman, A. (2010). First analysis of a bacterial collagen-binding protein with collagen Toolkits: promiscuous binding of YadA to collagens may explain how YadA interferes with host processes. *Infect. Immun.* 78, 3226–3236.

Lohou D., Lonjon F, Genin S, Vaillau F. (2013). Type III chaperones & Co in bacterial plant pathogens: a set of specialized bodyguards mediating effector delivery. *Front Plant Sci*;22;4:435.

Manjarrez-Hernández H. A., Gavilanes-Parra S, Chávez-Berrocal E, Navarro-Ocaña A, Cravioto a. (2000). Antigen Detection in Enteropathogenic *Escherichia coli* Using Secretory Immunoglobulin A Antibodies Isolated from Human Breast Milk. *Infect. Immun*; 68(9): 5030-6.

Martin, S. J., G. A. O'Brien, W. K. Nishioka, A. J. McGahon, A. Mahboubi, T. C. Saido, and D. R. Green. (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 270:6425–6428

Matthews B. W. (1968). Solvent content of protein crystals, *J. Mol. Biol.*, 33;491–497.

Meng G., Spahich N, Kenjale R, Waksman G. (2011). Crystal structure of the *Haemophilus influenzae* Hap adhesin reveals an intercellular oligomerization mechanism for bacterial aggregation, *EMBO J.*, 30;3864–3874.

Morales M. E., Rico G, Gomez JL, Alonso R, Cortes R, Silva R. (2006). Could the homologous sequence of anti-inflammatory pentapeptide (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* in the N protein of rabies virus affect the inflammatory process? *Parasitol Res*;98:232–6.

Moroncle N. M., Sivick KE, Brady R, Stokes FE, Mobley HL. (2006). Protease Activity, Secretion, Cell Entry, Cytotoxicity, and Cellular Targets of Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun*; 74(11):6124-34.

Mougous J. D., Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordoñez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*;, 312:1526-30.

Mulks M. H., Plaut AG. (1978). IgA protease production as a characteristic

distinguishing pathogenic from harmless neisseriaceae. *N Engl J Med*;299(18):973-6.

Natato J. P. (2005). Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21: 4-8.

Nath, R., K. J. Raser, D. Stafford, I. Hajimohammadreza, A. Posner, H. Allen, R. V. Talanian, P. Yuen, R. B. Gilbertsen, and K. K. Wang. (1996). Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 betaconverting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem. J.* 319:683–690.

Niyogi SK, Vargas M, Vila J. (2004). Prevalence of the sat, set and sen genes Among Diverse Serotypes of *Shigella flexneri* Strains Isolated from Patients with Acute Diarrhoea. *Clin. Microbiol. Infect*; 10(6):574-6.

Nava-Acosta R., Navarro-Garcia F. (2013). Cytokeratin 8 Is an Epithelial Cell Receptor for Pet, a Cytotoxic SerineProtease Autotransporter of Enterobacteriaceae. *MBio.* 4(6); 1-12.

Navarro-García F, Eslava C, Villaseca JM, López-Revilla R, Czczulin JR, Srinivas S, Nataro JP, Cravioto A. (1998). In vitro Effects of a High-Molecular-Weight Heat-labile Enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun*; 66(7):3149-54.

Navarro-García F, Sears C, Eslava C, Cravioto A, Nataro JP. (1999). Cytoskeletal Effects Induced by Pet, the Serine Protease Enterotoxin of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun*; 67(5):2184-92.

Navarro-García F, Canizalez-Román A, Luna J, Sears C, Nataro JP. (2001). Plasmid-encoded Toxin of Enteroaggregative *Escherichia coli* is Internalized by Epithelial Cells. *Infect. Immun*;36(1):233-40.

Navarro-García F, Canizalez-Román A, Sui BQ, Nataro JP, Azamar Y. (2004). The Serine Protease Motif of EspC from Enteropathogenic *Escherichia coli* Produces Epithelial Damage by a Mechanism Different from of Pet Toxin from Enteroaggregative *E. coli*. *Infect. Immun*; 72(6):3609-21.

Navarro-García F, Canizalez-Román A, Vidal JE, Salazar MI. (2007a). Intoxication of Epithelial Cells by Plasmid-Encoded Toxin Requires Clathrin-Mediated Endocytosis. *Microbiology*; 153(pt 9):2828-38.

Navarro-García F, Canizalez-Román A, Burlingame KE, Teter K, Vidal JE. (2007b). Pet, a Non-AB Toxin, is transported and Translocated into Epithelial Cells by a Retrograde Trafficking Pathway. *Infect. Immun*; 75(5):2101-9.

Norma J Greenfield. (2006). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat. Protocol*; 1(6): 2527-35

Oliver DC, Huang G, Fernández RC. (2003). Identification of Secretion Determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA Autotransporter. *J. Bacteriol*; 185(2):489-95.

Otto B. R, van Dooren SJ, Nuijens JH, Luirink J, Oudega B. (1998). Characterization

of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1, J. Exp. Med., 188;1091–1103.

Otto B. R., Sijbrandi R, Luirink J, Oudega B, Heddle JG, Mizutani K, Park SY, Tame JRH. (2005). Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 280;17339–17345.

Pallen M. J., Beatson SA, Bailey CM. (2007). Bioinformatics, Genomics and Evolution of Non-Flagellar Type-III Secretion Systems: a Darwinian Perspective. FEMS Microbiol. Methods; 68(2):225-35.

Parham N. J., Srinivasan U, Desvaux M, Foxman B, Marrs CF, Henderson IR. (2004). PicU, a Second Serine Protease Autotransporter of Uropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett; 230(1):73-83.

Parham N. J., Pollard SJ, Desvaux M, Scott-Tucker A, Liu C, Fivian A Henderson IR. (2005). Distribution of the Serine Protease Autotransporter of the Enterobacteriaceae Among Extraintestinal clinical Isolates of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol; 43(8):4076-82.

Parreira V. R., Gyles CL. (2003). A Novel Pathogenicity Island Integrated Adjacent to the thrW tRNA Gene of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Encoded a Vacuolating Autotransporter Toxin. Infect. Immun; 71(9):5087-96.

Patel S. K., Dotson J, Allen KP, Fleckenstein JM. (2004). Identification and Molecular Characterization of EatA, an Autotransporter Protein of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun; 72(3): 1786-94.

Perrin D. D., and Boyd Dempsey. (1974). Buffers for pH and Metal Ion Control. Chapman and Hall, London.

Price N. C. (2001). Circular Dichroism: Studies of Proteins; Encycl. Life Sci. 1-4.

Provence DL, Curtis R 3rd. (1994). Isolation and Characterization of a Gene Involved in Hemagglutination by an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. Infect. Immun; 62(4):1369-80.

Provencher & Glockner. (1981). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism *Biochemistry*;20, 33-37.

Rajakamur K, Sasakawa C, Adler B. (1997). Use of a Novel Approach, Termed Island Probing, Identifies the *Shigella flexneri* she Pathogenicity Island Which Encodes a Homolog of the Immunoglobulin A Protease-like Family of Proteins. Infect. Immun; 65(11):4606-14.

Renn JP, Clark PL. (2008). A conserved stable core structure in the passenger domain beta-helix of autotransporter virulence proteins. Biopolymers;89(5):420-7.

Rossiter A. et al. (2011). The essential B-barrel assembly machinery complex components BamD and BamA are required for autotransporter biogenesis. J. Bacteriol; 193: 4250-4253.

Ruiz-Pérez J, Henderson IR, Leyton DL, Rossiter AE, Zhang Y, Nataro JP. (2009). Roles of Periplasmic Chaperone Proteins in the Biogenesis of the Serine Protease

Autotransporters of Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol*; 191(21):6571-83.

Russell AB, Hood RD, Bui NK, LeRoux M, Vollmer W, Mougous JD: (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* ;475:343-7.

Sainz T, Pérez J, Fresan MC, Flores V, Jiménez L, Hernández U, Herrera I and Eslava C. (2002). Histological Alterations and Immun Response Induced by Pet Toxin During Colonization with Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) in a Mouse Model Infection. *J. Microbiol*; 40:91-97.

Salmond G. P, Reeves P. J. (1993). Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem Sci*;18(1):7-12

Salvadori MR, Yano T, Carvalho HE, Parreira VR, Gyles CL. (2001). Vacuolating Cytotoxin Produced by Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis*; 45(1):43-51.

Sandkvist M. (2001a). Biology of Type II Secretion. *Mol. Microbiol*;40(2):271-83.

Sankvist M. (2001b). Type II Secretion and Pathogenesis. *Infect. Immun*; 69(6): 3523-35.

Sandt CH, Hill CW. (2000). Four Different Genes Responsible for Nonimmune Immunoglobulin-Binding Activities within a Single Strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun*; 68(4):2205-14.

Scaglione P, Nemeč KN, Burlingame KE, Grabon A, Huerta J, Navarro-Garcia F, Tatulian SA, Teter K. (2008). Structural characteristics of the plasmid-encoded toxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Biochemistry*;47(36):9582-91

Schmidt H, Zhang WL, Hemmrich U, Jelacic S, Brunder W, Tarr PI, Dobrindt U, Hacker J, Karch H. (2001). Identification and Characterization of a Novel Genomic Island Integrated at SelC in Locus of Enterocyte Effacement-negative, Shiga toxin-Producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun*; 69(11):6863-73.

Schröder GF, Levitt M, Brunger AT. (2010). Super-resolution biomolecular crystallography with low-resolution data, *Nature*; 464:1218–1222

Schwarz CK, Lenders MH, Smits SH, Schmitt L. (2012). Secretion of slow-folding proteins by a Type 1 secretion system. *Bioengineered*;3(5):289-92.

Serruto D, Adu-Bobie J, Scarselli M, Veggi C, Pizza M, Rappouli R, Aricó B. (2003). *Neisseriae meningitidis* App, a New Adhesin with Autocatalytic Serine Protease Activity. *Mol Microbiol*; 48(2):323-34.

Sharon M. Kelly, Thomas J. Jess, Nicholas C. Price. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751;119 – 139

Sikora AE. (2013). Proteins secreted via the type II secretion system: smart strategies of *Vibrio cholerae* to maintain fitness in different ecological niches. *PLoS Pathog*;9(2):e1003126

Skillman KM, Barnard TJ, Peterson JH, Ghirlando R, Bernstein HD. (2005). Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter. *Mol*

Microbiol;58(4):945-58.

Stathopoulos C, Provence DL, Curtiss R 3ed. (1999). Characterization of the Avian Pathogenic *Escherichia coli* Hemagglutinin Tsh, a Member of the Immunoglobulin A Protease-Type Family of Autotransporters. *Infect. Immun*; 67(2):772-81.

Stein M, Kenny B, Stein MA, Finlay BB. (1996). Characterization of EspC, a 110-Kilodalton Protein Secreted by Enteropathogenic *Escherichia coli* Which is Homologous to Members of the Immunoglobulin A Protease-like Family of Secreted Proteins. *J. Bacteriol*; 178(22):6546-54.

Studier W. F. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Prot expres purify*; (41) 207-34.

Szabady RL, Peterson JH, Skillman KM, Bernstein HD. (2005). An Unusual Signal Peptide Facilitates Late Steps in the Biogenesis of a Bacterial Autotransporter. *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A*;102(1):221-6.

Taddei CR, Fasano A, Ferreira AJ, Trabulsi LR, Martinez MB. (2005). Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. *FEMS Microbiol Lett*;15;250(2):263-9.

Tekaia F, et al. (1999). Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. *Tuber Lung Dis* 79:329–342

TowbinH, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76;4350–4354.

Troisfontaines P, Cornelis GR. (2005). Type III Secretion: More Systems Than you Think. *Physiology (Bethesda)*; 20:326-39.

Van Ulsen P, Tommassen J. (2006). Protein secretion and secreted proteins in pathogenic *Neisseriaceae*. *FEMS Microbiol Rev*;30(2):292-319.

Velarde J. J, Nataro JP. (2004). Hydrophobic Residues of the Autotransporter EspP Linker Domain are Important for Outer Membrane Translocatin of its Passenger. *J. Biol. Chem*; 279(30):31495-504.

Vidal J. E, Navarro-García F. (2008). EspC Translocation into Epithelial Cells by Enteropathogenic *Escherichia coli* Requires a Concerted Participation of Type V and III Secretion Systems. *Cell. Microbiol*; 10(10):1975-86.

Villaseca J. M, Navarro-García F, Mendoza-Hernández G, Nataro JP, Cravioto A, Eslava C. (2000). Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption, *Infect. Immun.*, 68;5920–5927.

Vogel J. P, Andrews HL, Wong SK, Isberg RR. (1998). Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science*; 279:873–876.

Voth D. E, Broederdorf L. J, Graham J. G. (2012). Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiol*;7(2):241-57.

Wards B. J., de Lisle G. W, Collins D. M. (2000). An *esat6* knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. *Tuber Lung Dis* 80:185–189.

Weiss A, Brockmeyer J. (2012). Prevalence, biogenesis, and functionality of the serine protease autotransporter EspP. *Toxins (Basel)*;5(1):25-48

Willems, R. J., Geuijen, C., van der Heide, H. G., Renauld, G., Bertin, P., van den Akker, W. M., Locht, C. & Mooi, F. R. (1994). Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* *fim/fha* gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol. Microbiol.* 11;(337–347.)

Winn MD, Ballard CC, Cowtan XD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AGW, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov JN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS. (2011). Overview of the CCP 4 suite and current developments, *Acta Crystallogr.D Biol. Crystallogr.* 67;235–242.

Yen YT, Kostakioti M, Henderson IR, Stathopoulos C. (2008). Common Themes and Variations in Serine Protease Autotransporter. *Trends Microbiol*; 16(8):370-9.

