



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“Purificación y generación de anticuerpos de la proteína EspB del sistema de secreción de efectores de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena”

T E S I S

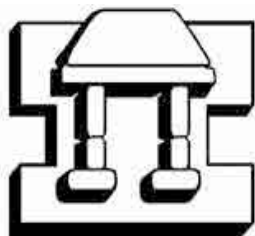
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

MIGUEL ÁNGEL DÍAZ GUERRERO

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX.

2006



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 325 del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo, con el apoyo de los donativos P46551-Q de CONACYT y IN217105 de la DGAPA, UNAM

La muerte existe para que el hombre encuentre, con el rostro descubierto, el complejo universo que es él mismo
Yukio Mishima

DEDICADA:

A mis padres Guadalupe y Eduardo por el inmenso apoyo que me han brindado, pero sobre todo por el amor con el me criaron. A mi hermano y su familia por que aún sin saberlo me han enseñado muchas cosas buenas que me han ayudado a salir adelante. A toda mi Familia, sin distinción de ningún tipo, ya que sin su apoyo e interés no hubiera podido concluir este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Bertha González Pedrajo, por la confianza, asesoría e infinita paciencia que me ha brindado desde el primer día que llegue al laboratorio y por integrar un equipo de trabajo unido y con buena disposición. Muchas gracias Doc.

A la Dra. Norma Espinosa Sánchez, por el apoyo técnico, su invaluable ayuda y buenos consejos durante la realización de este proyecto.

A los revisores de este trabajo: Dr. Sergio Vaca Pacheco, M. C. Ramón Víctor Moreno Torres, Dr. Erasmo Negrete Abascal y al Dr. Diego Arenas Aranda, por las aportaciones que contribuyeron a mejorar este trabajo.

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

A Juan Barbosa y a toda la Unidad de Computo del IFC por su apoyo técnico.

A mis pocos, pero entrañables amigos Luis, Claus, Dulce, Gama, Edgar, Roberto y últimamente Ángel por hacer de mi estancia en Iztacala una de las mejores épocas de mi vida.

A Alejandra por compartir algunos de los mejores recuerdos que puedo tener de mi paso por la Universidad y por impulsarme a seguir adelante las muy contadas veces que quise desistir. Gracias Ale

A mis compañeros del laboratorio: Ángel (nuevamente), Mariana, Ely, Erika, Julia y Fermín, por su ayuda, amistad y buenos momentos que he pasado con ustedes.

A mis tíos Susana, Rosa, Blanca y Abel por tanto cariño y buenos deseos que siempre me han demostrado.

A Margarita, Ángela, Marina, Legnis, Michu, Fany, Caty, Cen, Fer, Abel y Ale por estar siempre pendientes de mí.

Al escuadrón de la muerte: Adrián, Eduardo, Martín y Ricardo por el apoyo y buenos consejos que me han dado estos últimos meses.

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México a través de la FES Iztacala mi querida alma máter.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	1
Vías de secreción dependientes de Sec	4
Sistema de secreción tipo II (SST2)	4
Sistema de secreción tipo V (SST5)	5
Vías de secreción independientes de Sec	7
Sistema de secreción tipo I (SST1)	7
Sistema de secreción tipo IV (SST4)	8
Sistema de secreción tipo III (SST3)	9
<i>Escherichia coli</i> y EPEC	13
SST3 de EPEC	14
Lesión de adherencia y eliminación (A/E)	17
Proteínas formadoras de poro: EspB y EspD	19
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVOS	24
GENERAL	24
PARTICULARES	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
Purificación de DNA cromosomal	26
Amplificación de <i>espB</i> y <i>espD</i>	27
Preparación de células competentes con CaCl ₂	27
Transformación de células competentes	28
Clonación de los genes <i>espB</i> y <i>espD</i>	28
Inducción del gen <i>espB</i> y purificación de la proteína recombinante	29
Cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford	32
Generación de anticuerpos policlonales	32
Ensayos de inmunodetección	33
Ensayo de secreción de proteínas translocadoras	34
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	57

PERSPECTIVAS	58
APÉNDICE	59
LITERATURA CITADA	63

Purificación y generación de anticuerpos de la proteína EspB del sistema de secreción de efectores de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena

RESUMEN

Las infecciones gastrointestinales son un problema prioritario de salud en todo el mundo debido a la alta frecuencia con que se presentan. En nuestro país la diarrea se encuentra entre las primeras causas de hospitalización en niños menores de cinco años y en la mayoría de los casos *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), es la principal variedad de *E. coli* en ser asociada con esta infección. Este microorganismo coloniza el intestino mediante la secreción de proteínas efectoras de virulencia, que destruyen las microvellosidades del epitelio intestinal e inducen cambios fisiológicos importantes en la célula enterocítica. Una aproximación para entender la función de una proteína efectora de este tipo y el cómo la bacteria la secreta, es la de identificar los componentes a los cuales ésta se asocia. Aunque existen muchos métodos para evaluar las interacciones entre proteínas, la obtención de anticuerpos específicos contra éstas proporciona una herramienta muy útil en la identificación de nuevas interacciones. En este trabajo se obtuvo a la proteína recombinante His-EspB altamente pura y con un alto rendimiento, lo que permitió generar anticuerpos policlonales sumamente específicos, capaces de reconocer a la proteína EspB incluso en muestras de lisados celulares completos de EPEC. Por otra parte, los esfuerzos para sobreproducir a la proteína recombinante EspD no fueron exitosos, aún cuando se utilizaron diferentes vectores y cepas de expresión.

INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo muchos grupos de bacterias han desarrollado relaciones estrechas con organismos superiores, las cuales se pueden agrupar en tres categorías: benéficas, dañinas y neutrales (Ghosh, 2004). En la mayoría de los casos, estas interacciones dependen de la secreción de proteínas por parte de las bacterias con lo que pueden realizar diversos aspectos de su ciclo de vida, como la biogénesis de apéndices que le permitan desplazarse y/o adherirse; la adquisición de nutrientes, y la colonización de otras células en el caso de bacterias patógenas (Thanassi y Hultgren, 2000).

Las proteínas que se secretan difieren tanto en secuencia como en función dependiendo del nicho ecológico que ocupe la bacteria. Debido a esto existen diversos sistemas de secreción bacterianos, los cuales poseen características propias que los distinguen entre sí como son el motivo de reconocimiento de las proteínas que serán secretadas, así como la arquitectura estructural de los mismos (Macnab, 2004).

Las bacterias Gram negativas poseen dos compartimentos delimitados por membranas: el espacio periplásmico y el citoplasma; de tal modo que el traslado de proteínas al exterior celular involucra el transporte a través de la membrana interna (MI), el periplasma (PE) y la membrana externa (ME) (Karel, 2001). Para llevar a cabo el transporte de proteínas a través de dichas barreras, estos microorganismos han desarrollado, como se mencionó anteriormente, diversas vías de secreción, y éstas pueden agruparse en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para atravesar la MI: los sistemas Sec-dependientes y los Sec-independientes.

La ruta principal que las proteínas siguen para atravesar la membrana MI es a través de la translocasa Sec. En esta vía se secretan proteínas parcialmente desplegadas a través de la bicapa lipídica por medio de un canal multiprotéico formado en la membrana plasmática, el cual facilita el paso de las proteínas (Fig. 1). Se ha demostrado que la conformación general de dicho canal está altamente conservada en arqueas, bacterias y eucariontes (Karel, 2001 y Stephenson, 2005).

Las proteínas secretadas por la translocasa Sec presentan un péptido líder o secuencia señal hidrofóbica de aproximadamente 30 aminoácidos en la región amino terminal. Una vez que la proteína atraviesa la membrana interna la secuencia señal es removida por peptidasas periplásmicas (Hueck, 1998).

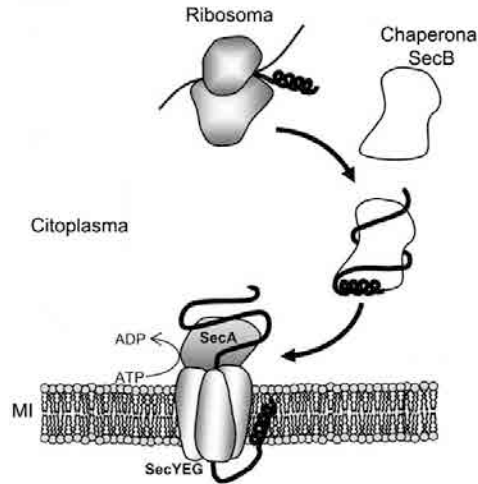


Figura 1. Esquema de la vía Sec en *E. coli*. La chaperona SecB se une al precursor parcialmente plegado, el reconocimiento puede ser cuando la cadena naciente está todavía unida al ribosoma o bien cuando se encuentra libre en el citoplasma. El complejo SecB-proteína precursora se dirige a la MI en donde la proteína se transfiere a la ATPasa SecA unida a la translocasa SecYEG (modificado de Stephenson, 2005).

En la vía Sec de *E. coli* participan las proteínas de membrana interna SecD, SecE, SecF, SecG y SecY, así como una serie de peptidasas de la secuencia señal. La ATPasa SecA, asociada a la cara citoplásmica de la membrana interna, provee la energía para la exportación del sustrato y se encarga de la inserción membranal de éste; mientras que la chaperona citoplásmica SecB, se une a la proteína a secretarse para mantenerla desplegada y subsecuentemente dirigirla al complejo heteroproteico SecYEG (Fig. 1) (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003). Como se mencionó, durante o inmediatamente después de la exportación a través de la MI, la secuencia señal es cortada por peptidasas y las proteínas en el periplasma adquieren su estructura nativa para ser secretadas a través de la ME por otro sistema. En este proceso participan las tiol-disulfuro oxidoreductasas e isomerasas periplásmicas, las que facilitan la formación de puentes disulfuro (Karel, 2001 y Stephenson, 2005).

Vías de secreción dependientes de Sec:

Una vez que las proteínas atraviesan la MI utilizando la translocasa SecYEG con el reconocimiento del péptido líder de la proteína por SecB y utilizando la energía de hidrólisis de ATP de SecA, existen diferentes sistemas de secreción mediante

Sistema de secreción tipo II (SST2)

Las proteínas secretadas por el SST2 incluyen proteasas, pectinasas, lipasas, y toxinas en general. En este sistema la proteína nativa en el periplasma es secretada a través de la ME por un complejo sistema multiprotéico constituido por entre 12 y 16 proteínas, denominadas colectivamente como secretón (Sandkvist, 2001).

En *E. coli* el SST2 incluye dos componentes de membrana externa, la secretina GspD y la lipoproteína GspS (Fig. 2). El carboxilo terminal de GspD se inserta en la ME para formar una estructura anular de 12-14 subunidades con forma de barril β , de aproximadamente 7 nm de diámetro, que permite el paso de proteínas totalmente plegadas que serán secretadas. La proteína GspS funciona como chaperona específica de GspD para mantenerla estable permitiendo su correcto plegamiento y funcionamiento (Henderson, 2004). Recientemente se ha propuesto que GspE (Fig. 2), proteína citosólica que contiene motivos de unión a ATP, utiliza la energía de hidrólisis de ATP para inducir cambios conformacionales en otros componentes del secretón como GspC, F, G, K, L, M y N que son proteínas de MI (Thanassi y Hultgren, 2000). Experimentos realizados con GspE sugieren que el transporte de proteínas y el ensamblaje del SST2 están acoplados íntimamente, de modo que la hidrólisis de ATP podría resultar en una transducción física de esta energía en la secreción de proteínas, como si fuera un pequeño pistón. La hipótesis de la secreción a través de un mecanismo de pistón en este sistema se apoya en el hecho de que algunos de sus componentes son homólogos a las subunidades estructurales del pilus tipo IV, estructura retráctil que se requiere en la competencia natural y en la movilidad de algunas bacterias, y que además sirve como una adhesina en muchas bacterias patógenas. En *Pseudomonas aeruginosa* PilD (homóloga a GspD), es una proteína que se encuentra en ambos sistemas, el de biogénesis del pilus tipo IV y el SST2 (Nunn, 1999).

Sistema de secreción tipo V (SST5)

Este sistema también se conoce con el nombre de autotransportadores (AT). Por definición un AT es aquella proteína que porta todos los elementos necesarios para su translocación a través de la ME. Los AT comprenden una gran familia de porinas caracterizadas por la presencia de un dominio β o translocador en el carboxilo terminal que dirige la secreción del dominio pasajero de la región amino terminal a través de la ME. El dominio translocador es el rasgo característico de los AT, y ha sido identificado en por lo menos 20 géneros de bacterias (Thanassi y col., 2005). Al ser esta una vía dependiente de Sec, la exportación a través de la MI ocurre utilizando la translocasa SecYEG y el transporte de la proteína desde el PE hasta el exterior de la célula es mediado por el dominio β (Henderson, 2004).

Recientemente se ha propuesto la existencia de proteínas chaperonas que interactuarían en el espacio periplásmico con el dominio pasajero del AT para mantenerlo parcialmente desplegado o en estado de secreción competente, y que a su vez auxiliarían al dominio translocador en su correcto plegamiento e inserción en la membrana externa. Si bien la mayoría de los dominios translocadores tienen entre 250 y 300 residuos de longitud, éstos no están conservados entre los diferentes AT y a pesar de esta alta variabilidad se ha observado que se pliegan de manera similar formando un barril tipo β en la ME de hasta 14 hebras con un diámetro aproximado de 1.2 nm. Recientemente se demostró la existencia de una hélice α entre los dominios translocador y pasajero, denominada unidad de translocación, que ayuda a la formación del barril β (Velarde y Nataro, 2004). Esta región queda expuesta en la superficie, sugiriendo que la translocación del dominio pasajero ocurre a través del canal formado por el barril β . Aún no se conoce con precisión cuál es el mecanismo de secreción del dominio pasajero a través de la ME, se cree que este paso no requiere del aporte de energía desde la MI y se propone que la unidad de translocación forma una asa temporal que tira del dominio pasajero, a través del canal monomérico formado por el dominio translocador hasta que finalmente queda expuesto en la superficie de la membrana externa (Thanassi y col., 2005). Una vez que los AT han atravesado la ME las proteínas pueden ser liberadas al medio extracelular, por proteólisis o mecanismos

de autoprocésamiento que no están bien definidos, o permanecer unidas a la ME a través de interacciones iónicas no covalentes entre el dominio β y componentes de la membrana. En este caso el dominio pasajero no es procesado y permanece como una proteína unida a la ME con el extremo amino expuesto al medio (Henderson, 2004).

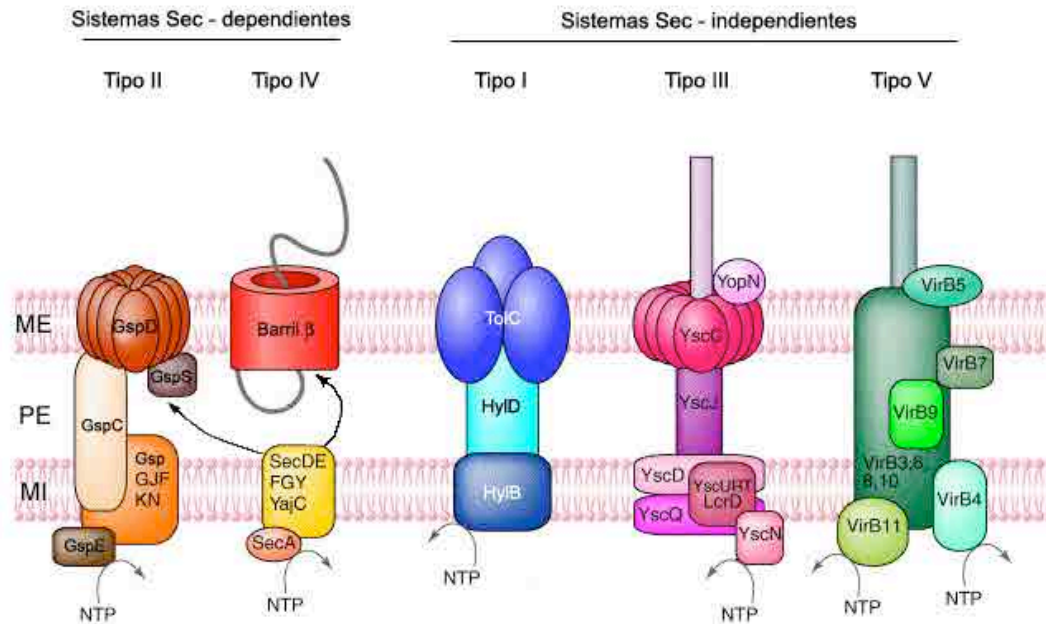


Figura 2. Esquema de los diferentes sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas. El SST2 está representado por el translocon Gsp de *E. coli*. El SST5 ejemplifica el paso del dominio pasajero a través del barril β insertado en la ME de una proteína AT. El SST1 muestra los componentes necesarios para el transporte de la α -hemolisina por *E. coli*. El SST3 se ejemplifica con el ensamblaje del complejo aguja de *Yersinia*. El SST4 representa el ensamblaje de los elementos basales que secretarán las subunidades del pilus T del fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens* (Modificado de Desvaux y col. 2004).

Vías de secreción independientes de Sec:

Existen al menos tres características principales que comparten los sistemas de secreción Sec-independientes, la primera es que estas vías son capaces de secretar proteínas directamente desde el citoplasma hasta el exterior de las bacterias sin que existan intermediarios periplásmicos, la segunda es que las proteínas, al no utilizar la translocasa Sec, tampoco presentan el péptido líder y la tercera es que el canal por el cual las proteínas son secretadas es ensamblado por el propio sistema secretor (Thanassi y Hultgren, 2002 y Tampakaki y col., 2004).

Sistema de secreción tipo I (SST1)

Este es un sistema relativamente simple (formado por sólo tres componentes) que acopla la hidrólisis de ATP en el citoplasma al transporte de proteínas a través de la MI, espacio periplásmico y la ME por medio del ensamblaje de un canal proteico (Baker, 2005). En la mayoría de las proteínas que se secretan vía SST1 existe una señal de secreción de al menos 46 aminoácidos en el carboxilo terminal y aunque ésta no es removida durante el transporte, experimentos con proteínas con mutaciones puntuales en estos residuos han demostrado que es indispensable para la secreción (Holland, 2005).

Los principales componentes de este sistema de secreción son: un transportador ABC, por *ATP Binding Cassette*, ubicado en la parte citosólica de la MI; una proteína de ME y una proteína periplásmica, denominada proteína de fusión, que conecta a ambos componentes membranales. Cabe destacar que este sistema está ampliamente conservado entre los organismos, lo presentan tanto bacterias como eucariontes, desde la levadura hasta el ser humano. El prototipo de este sistema secretor es la secreción de la α -hemolisina (HlyA) en *E. coli* que es un factor de virulencia importante debido a su actividad citolítica y citotóxica. La secreción de HlyA requiere del transportador ABC HlyB, de la proteína periplásmica de fusión HlyD y de la proteína TolC (Fig. 2). Esta última es una proteína de ME que mediante su oligomerización forma un barril tipo β con un diámetro interno de 3.5 nm en su porción periplásmica y que conecta a la proteína de fusión HlyD con la membrana externa (Remaut, 2004). La actividad de ATPasa de HlyB provee la energía necesaria para la translocación y posiblemente también para el reconocimiento de la señal de secreción del carboxilo terminal de HlyA. Con la formación del complejo multiproteico HlyA-HlyB-HlyD-TolC la hemolisina es secretada rápidamente al medio extracelular. Si HlyB o HlyD están ausentes HlyA permanece en el citoplasma, donde es degradada, lo que sugiere que el mecanismo de translocación está altamente coordinado (Holland, 2005).

Sistema de secreción tipo IV (SST4)

Este sistema es el último que se descubrió y por lo tanto, el menos caracterizado. Está ampliamente distribuido tanto en patógenos Gram-positivos como Gram-negativos. La característica más sobresaliente del SST4 es que no solamente exporta proteínas, sino que también es capaz de secretar DNA (Henderson, 2004 y Christie y Cascales, 2005). Esta vía de secreción está relacionada con el mecanismo de conjugación bacteriana, ya que involucra la transferencia horizontal de DNA con otras células contribuyendo a incrementar la plasticidad genómica de estos microorganismos. El SST4 ha sido clasificado en cuatro subgrupos, cada uno de los cuales está especializado en una función y contribuye de manera única a la patogénesis: translocación de proteínas al interior de las células, conjugación de DNA cromosomal y plasmídico, adquisición de DNA y transformación así como la liberación de DNA al medio extracelular (Backert y Meyer, 2006).

El SST4 está tipificado por el sistema Vir del fitopatógeno *A. tumefaciens* (Fig. 2), el cual consiste de al menos 12 componentes denominados VirB1 a VirB11 y VirD4, que transfieren el complejo proteína-DNA tumoral u oncogénico (T-DNA) en un solo paso desde el citoplasma hasta la célula eucarionte a través del pilus-T (Remaut, 2004).

El pilus T está constituido por VirB2, VirB5 y VirB7 principalmente aunque se desconoce como es que estas subunidades se asocian entre sí. El SST4 al parecer es energizado por tres ATPasas asociadas a la membrana interna, VirB4, VirB11 y VirD4 mientras que los componentes VirB6-VirB10 forman un canal con componentes en la MI, periplasma y ME, que puede estar involucrado en el reconocimiento de las proteínas que serán secretadas. La proteína VirB6 es altamente hidrofóbica y atraviesa la membrana interna varias veces por lo que se sugiere que este componente juega un papel importante en la translocación (Christie y Cascales, 2005). *A. tumefaciens* secreta diversas proteínas efectoras como VirD2, VirE2, VirE3 y VirF al citoplasma de la célula vegetal. VirD2 es secretada como un complejo nucleoprotéico que mantiene covalentemente unida a una hebra de T-DNA, una vez en el citosol VirE2 interactúa con el complejo

de la agalla tumoral. El papel de VirE3 y VirF al igual que otros componentes de este sistema todavía permanece incierto (Backert y Meyer, 2006).

Sistema de secreción tipo III (SST3)

El SST3 es una vía independiente de Sec que se encuentra presente en un gran número de especies bacterianas y es capaz de transportar proteínas a través de la MI, la capa de peptidoglicano y la ME, sin ningún tipo de intermediario periplásmico. En bacterias patógenas, las proteínas secretadas pueden incluso atravesar la membrana plasmática o la pared celular de células animales o vegetales respectivamente (Ghosh, 2004).

Los SST3 asociados a virulencia de diferentes especies Gram negativas comparten las siguientes características: inyectan proteínas directamente en el citoplasma de células eucariontes, la secreción se dispara cuando la bacteria establece contacto con la célula huésped o cuando se crece en el laboratorio en condiciones que asemejan las condiciones ambientales del hospedero, e inducen la formación de poros en la membrana plasmática eucarionte (Abe y col., 2005). Para llevar a cabo estas funciones los SST3 secretan dos tipos de proteínas: las denominadas translocadoras, las cuales participan en la formación de dicho poro; y las proteínas efectoras, que inducen alteraciones fisiológicas en la célula en donde se introducen (Delahay y Frankel, 2002).

Los genes que codifican para los componentes estructurales del SST3 están frecuentemente localizados en un plásmido, o bien, como un grupo de genes en el cromosoma denominado isla de patogenicidad. El análisis de comparación de secuencias ha demostrado que al menos 9 de los genes que codifican para proteínas de este sistema están conservados entre diferentes especies de patógenos, lo cual sugiere que existe un mecanismo común de reconocimiento y secreción de proteínas por el SST3 (Henderson, 2004).

Aunque no se conoce el mecanismo por el cual las proteínas son reconocidas por el SST3, existen varias propuestas al respecto. Se piensa que puede existir una

que son secretadas por este sistema, lo que implicaría una secreción co-traducciona. Sin embargo, otros estudios apoyan la existencia de una seña peptídica. Utilizando proteínas del SST3 de *Yersinia* se demostró que mutaciones puntales en los aminoácidos anfipáticos de la región amino terminal, inhiben completamente la secreción, sugiriendo que la secuencia seña es de naturaleza anfipática y que podría estar entre los primeros 15 residuos del extremo amino terminal de la proteína (Anderson y Schneewind, 1999). Pero hasta el momento no se ha podido demostrar la presencia de esta secuencia seña en proteínas secretadas por otros SST3 (Abe y col., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que varias de las proteínas secretadas por este sistema se asocian en el citosol con pequeñas proteínas chaperonas que las estabilizan y protegen de los complejos proteolíticos entre otras funciones, por lo que cabe también la posibilidad de que el reconocimiento de proteínas por el aparato de secreción sea mediado por sus respectivas chaperonas (Parsot y col. 2003).

Por mucho tiempo se pensó que el SST3 estaba restringido únicamente a especies patógenas, sin embargo, recientemente se han identificado genes que codifican para componentes de este sistema en bacterias simbiotes de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium*, las cuales inducen la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en plantas leguminosas. Si bien no ha sido definido el papel específico del SST3 en el establecimiento de la simbiosis, la inactivación de éste en dichas bacterias simbiotes incrementa o disminuye el número de nódulos (Büttner y Bonas, 2006). Por otra parte, desde los primeros estudios de microscopía electrónica de la estructura del SST3 de virulencia (también llamado inyectisoma), se observó una gran similitud entre éste y el sistema de exportación de proteínas que participan en la biogénesis flagelar (al que también se le considera un SST3), incluso entre especies bacterianas que no pertenecen a grupos filogenéticos afines (Fig. 3) (Tampakaki, 2004).

La mayoría de los SST3 están constituidos por lo menos de 20 proteínas diferentes, de las cuales, como se mencionó anteriormente, nueve están altamente conservadas entre los inyectisomas de diferentes especies y el flagelo bacteriano (Fig. 3). Estas proteínas conservadas se localizan en el citoplasma y/o en la MI

piensa que este complejo está implicado en el reconocimiento de las proteínas que serán secretadas (Journet y col., 2005).

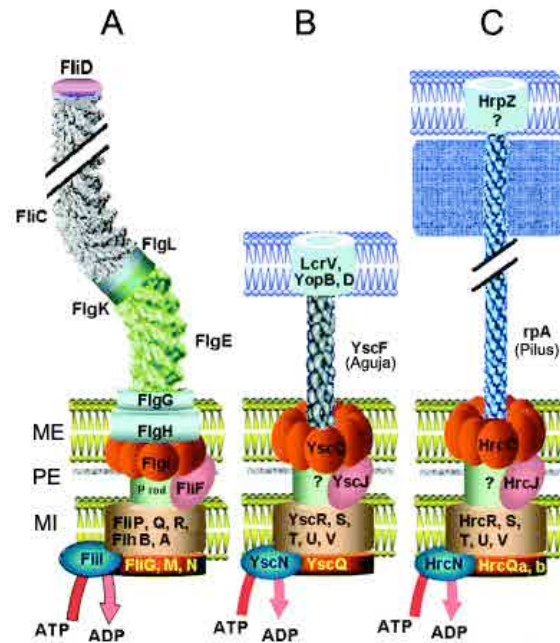


Figura 3. Esquema que muestra la similitud entre el SST3 flagelar de *Salmonella* (A) y los SST3 de diferentes patógenos: *Yersinia* (B) y *Pseudomonas* (C). El aparato de secreción está tipificado por las proteínas YscR, S, T, U, V y N de *Yersinia* que son homólogas a FljP, Q, R, FlhB, FlhA y FljI del SST3 flagelar (modificado de Tampakaki y col., 2004).

Tanto el ensamblaje del SST3, como la secreción de proteínas a través de éste requieren de la hidrólisis de ATP, por lo que las ATPasas son componentes indispensables del aparato secretor. Además del aporte de energía al sistema, se ha observado que las ATPasas de los SST3 interactúan con componentes del aparato de secreción y con otros elementos del sistema como las proteínas secretadas y sus chaperonas. Debido a esto se ha propuesto que las ATPasas podrían participar también en el reclutamiento y reconocimiento de las proteínas que serán translocadas por el SST3 (Gauthier y Finlay, 2003; Akeda y Galán, 2005).

Como se muestra en la figura 3, los SST3 asociados a virulencia están involucrados en la biogénesis de una estructura extracelular denominada aguja en patógenos de animales (Fig. 3B) y un pilus en patógenos de plantas (Fig. 3C), que funciona literalmente como una jeringa molecular que inyecta proteínas de origen

establecido contacto con la célula hospedera (Journet y col., 2005). Las subunidades de la proteína que conforman la aguja se ensamblan de forma helicoidal para formar una estructura cilíndrica hueca, con un diámetro externo de entre 8 y 13 nm y un canal interno de 2 a 3 nm. La aguja está formada por monómeros de la proteína PrgJ en *Salmonella*, MxiH en *Shigella* e YscF en *Yersinia* (Wilson y col., 2001).

***Escherichia coli* y EPEC**

La microbiota intestinal es un ecosistema muy complejo, compuesto por células del intestino, del sistema inmune, un gran número de bacterias, arqueas y virus no patógenos; que participa en importantes procesos biológicos como la absorción de alimentos no digeribles por el intestino y la síntesis de vitamina K así como de algunos precursores del complejo B. Las bacterias son el grupo más numeroso de este ecosistema; se estima que su número total en el intestino humano puede alcanzar las 10^{14} células, de las cuales la mayoría puede clasificarse como simbioses o comensales y un porcentaje bajo puede estar constituido por patógenos oportunistas, entre los que podemos destacar a los de la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros de esta familia son anaerobios facultativos y negativos a la tinción de Gram, tienen forma de bastoncillos y viven en el tracto intestinal de animales vertebrados e invertebrados. Esta familia incluye géneros que son importantes patógenos intestinales de humanos como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y algunas variedades de *Escherichia* (Lupp y Finlay, 2005).

E. coli es la bacteria más abundante de la microbiota intestinal y juega un papel importante en la fisiología del intestino. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theobald Escherich bajo el nombre de *Bacterium coli commune*, y por más de medio siglo se consideró a este microorganismo como el principal comensal no patógeno en humanos (Garmendia y col., 2005). Sin embargo, a principios del siglo XX las evidencias acumuladas indicaban que *E. coli* es capaz de causar una gran variedad de enfermedades en el hombre entre las que se encuentran la diarrea, colitis hemorrágica, disentería, síndrome hemolítico urémico, infecciones en riñón,

pielonefritis, y en vías urinarias altas, así como neumonía y meningitis (Sandner, 2001).

Aunque diversos patógenos están implicados en enfermedades diarreicas, *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es la principal variedad de *E. coli* en ser asociada con esta infección en humanos (Chen, 2005). La diarrea se ha mantenido como un problema primordial de salud pública en todo el mundo, con cerca de 2 millones de muertes ocurridas cada año, particularmente entre niños menores de cinco años (Williams, 2003).

En países en desarrollo como Brasil, México y Sudáfrica, EPEC constituye la principal causa de diarrea infantil, y diversos estudios han demostrado que entre el 30 y 40% de los casos son causados por EPEC (Chen, 2005). En nuestro país, la diarrea es la segunda causa de morbilidad entre la población general y la principal causa de consulta externa y de hospitalización en niños menores de cinco años (Terres, 2002). Se ha demostrado además, que los episodios repetitivos de diarrea pueden causar un retardo de hasta el 25% en el crecimiento de los niños (Corral-Terrazas y col., 2002). Es decir, las consecuencias de este importante problema de salud pública, además del impacto que genera en el estado nutricional de los niños, es el alto costo económico que representa su atención y tratamiento para los sistemas locales de salud (Coria y col., 2002).

SST3 de EPEC

Una característica sobresaliente del SST3 de EPEC es que además de la aguja, presenta un largo filamento flexible formado por subunidades de la proteína EspA que se extiende desde la parte distal de la aguja, la cual está formada por monómeros de la proteína EscF (Wilson y col., 2001), (Fig. 4). El filamento, al igual que la aguja, presenta una simetría helicoidal con un diámetro externo de 12 nm y uno interno de 2.5 nm, con una longitud promedio de 100 nm, pero puede alcanzar los 700 nm (Garmendia y col., 2005). Debido a que EPEC es un patógeno extracelular este filamento le permite adherirse a las células del intestino a través

filamento EspA también funciona como un puente entre la bacteria y la célula que infecta permitiendo el paso de otras proteínas, como EspD y EspB que forman un poro en la membrana citoplasmática de la célula eucarionte (Fig. 4) por el que se introducen las proteínas efectoras (Daniell y col., 2001b y Crepin y col., 2005).

El inyectisoma tiene forma cilíndrica similar al cuerpo basal del flagelo y consta de dos pares de anillos en la MI y la ME, se piensa que ambas estructuras están unidas por un eje interno que atraviesa el PE. En EPEC el anillo de la MI está formado por aproximadamente 24 subunidades de la proteína EscJ (homóloga a FliF en el flagelo), con un diámetro externo de 18 nm y un ancho aproximado de 5.2 nm. Se piensa que el anillo formado por EscJ podría reclutar a los componentes transmembranales EscS, R, T, U y V (Fig. 4), los cuales por homología con el sistema flagelar, se sugiere que forman el aparato de exportación en EPEC (Yip y col., 2005). EL anillo formado en la ME está constituido por la proteína EscC (Fig. 4), que mediante su oligomerización forma un canal con un diámetro externo de 20 nm y uno interno de 9 nm (pertenece a la familia de las secretinas, proteínas formadoras de poro en la ME). Esta estructura puede interactuar con EscF y proporcionarle estabilidad al inyectisoma, ya que hasta el momento no se ha identificado una proteína que ensamble el eje interno como el que se observa en el flagelo. Adicionalmente Ogino y sus colaboradores reportaron que EscD, cuya función se desconoce, podría ser componente del eje interno que conecta a los anillos y que esta proteína al igual que las que forman los poros en la MI y ME, EscJ y EscC respectivamente, son indispensables para el correcto ensamblaje y funcionamiento del SST3 (Ogino y col., 2006).

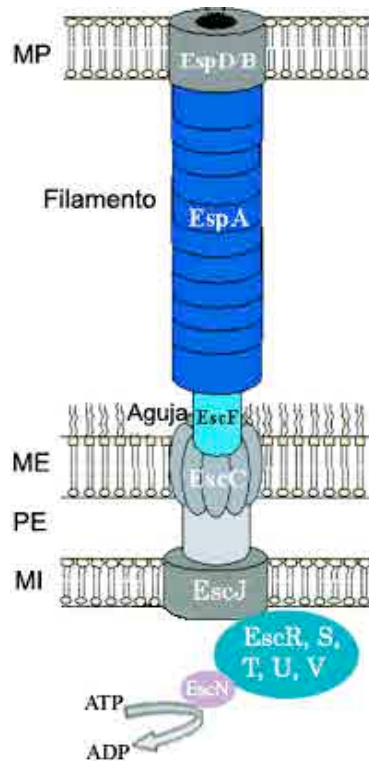


Figura 4. Esquema del SST3 de EPEC donde MP corresponde a la membrana plasmática de la célula infectada, ME y MI a la membrana externa e interna respectivamente (modificado de Delahay y Frankel, 2002).

Está demostrado que para que se lleve a cabo la secreción de las proteínas EspA, EspB y EspD es necesario que previo a ésta, se unan a sus chaperonas específicas en el citoplasma de EPEC. Kaper y colaboradores identificaron una proteína chaperona a la que designaron CesD, que es indispensable para estabilizar y secretar a EspD. La mutación del gen que codifica para esta chaperona inhibe completamente la secreción de EspD y disminuye considerablemente la secreción de EspB (Wainwright y Kaper, 1998). Además de CesD, EspD tiene una segunda chaperona designada CesD2, la cual desempeña una función auxiliar en la secreción de EspD. No se sabe por qué ésta proteína requiere de dos chaperonas para su secreción, se piensa que podría deberse a que EspD tiene diversas funciones dentro de la patogénesis de EPEC (Neves y col., 2003). Por otra parte, en el 2003 Frankel y colaboradores reportaron que el marco de lectura *orf3* de la isla de patogenicidad que contiene los genes del SST3 de EPEC, codifica también para una proteína chaperona, a la que nombraron CesAB. Estos autores reportaron que células mutantes en *orf3* son incapaces de secretar a EspA y EspB, y que esta última se acumula en el citoplasma de las

indica que CesAB es indispensable para la estabilidad intracitoplásmica de EspA (Creasy y col., 2003b).

Lesión de adherencia y eliminación (A/E)

Otra característica importante de la patología de EPEC es la formación de una lesión histopatológica intestinal conocida como lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E) en la cual la bacteria causa la eliminación de las microvellosidades de la célula infectada y establece contacto íntimo con la membrana plasmática del enterocito. La bacteria adherida ocasiona fuertes cambios en el citoesqueleto de la célula eucarionte como la acumulación de actina polimerizada y otras proteínas del citoesqueleto, que da lugar a la formación de una estructura parecida a un pedestal debajo del sitio de adhesión bacteriana (Fig. 5) (Daniell y col., 2001a y Kaper y col., 2004).

Para entender mejor la infección de EPEC se diseñó un modelo de tres etapas. En la primera, y bajo condiciones ambientales apropiadas, EPEC ensambla el filamento EspA y el pili BFP (*Bundle Forming Pili*) con el cual forma agregados bacterianos y el que a su vez funciona como mecanismo inicial de adhesión con la célula eucarionte (Fig. 5). En la segunda etapa comienza la inyección de proteínas efectoras al interior de la célula hospedera, para lo cual utiliza al SST3. Una vez en el citoplasma, el efector Tir (*translocated intimin receptor*), es fosforilado en el residuo de tirosina Y474 de la región carboxilo terminal, por tirosín cinasas del enterocito, lo que promueve que se inserte en la membrana plasmática. La fosforilación de Tir es esencial para la adherencia íntima, la reestructuración del citoesqueleto y la formación del pedestal (Caron y col., 2006). En la tercera etapa, el filamento EspA es removido de la superficie bacteriana por despolimerización a través de un mecanismo desconocido, y la intimina, adhesina de la ME de EPEC, se une a la región amino terminal expuesta de Tir dando como resultado la adherencia íntima de la bacteria con el enterocito, la activación de diversas vías de transducción y la formación de la lesión A/E (Clarke y col., 2003).

En cuanto a las alteraciones específicas que producen algunos de los efectores inyectados, estudios de la proteína EspF sobre monocapas lipídicas artificiales,

incrementando la permeabilidad paracelular. Por otro lado estudios realizados con Map, otra proteína efectora, han revelado que los primeros 44 residuos de su amino terminal constituyen una señal que la dirige a la mitocondria, en donde interrumpe el potencial de membrana generando también la muerte celular por apoptosis. También se ha visto que Map participa en la reestructuración de los componentes del citoesqueleto formando estructuras similares a filopodios a partir de éstos (Clarke y col., 2003). Por su parte, el efector EspG desestabiliza la red de microtúbulos del citoesqueleto y rompe a éstos debajo del sitio donde la bacteria hizo contacto con la célula enterocítica (Caron y col., 2006).

Se ha propuesto que la formación de la lesión A/E resulta en la disminución de la capacidad de absorción de la mucosa intestinal lo cual conduce a la alteración del balance electrolítico y subsecuentemente a la diarrea (Clarke y col., 2003).

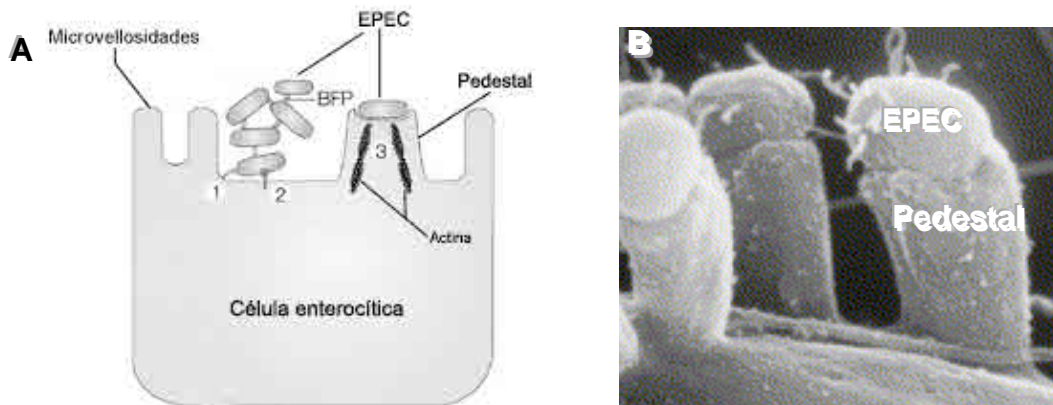


Figura 5. Lesión A/E de EPEC. (A) Esquema de las etapas de formación de la lesión A/E (modificada de Kaper y col., 2004). (B) Fotografía de microscopía electrónica que muestra la estructura del pedestal (tomada de Campellone y col., 2003).

Los genes que confieren el fenotipo A/E a EPEC están codificados en una isla de patogenicidad llamada LEE (locus de esfacelamiento enterocítico), de 35.6 kb, que está organizada en cinco operones policistrónicos denominados de LEE 1 a LEE 5 (Elliot y col., 1998 y Crepin, 2005). La región 5' de LEE codifica principalmente para reguladores transcripcionales y componentes estructurales del SST3; la región central codifica para la intimina, Tir y su chaperona CesT entre otros y el

genes *espD*, *espB* y *espA* (Fig. 6), que codifican para proteínas translocadoras que formarán el poro de translocación (Garmendia y col., 2005). Existen a su vez varios marcos de lectura abiertos (*orf*) de función desconocida.

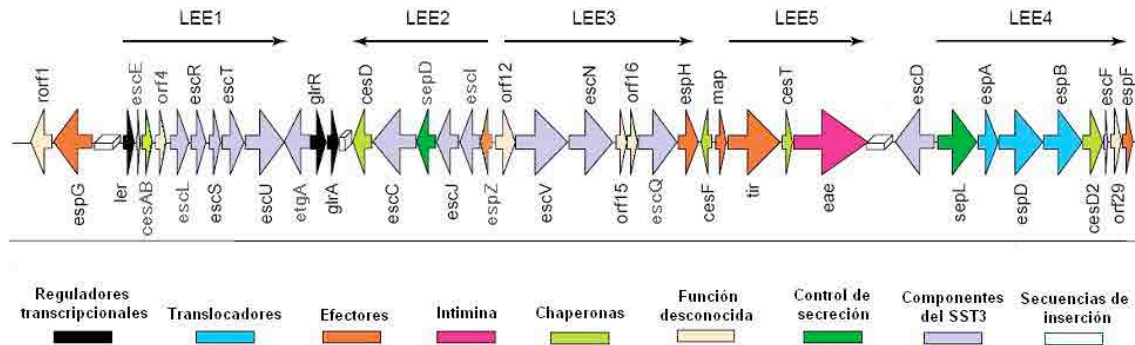


Figura 6. Esquema de la organización de la isla de patogenicidad LEE de EPEC (tomado de Deng y col., 2004).

Proteínas formadoras de poro: EspB y EspD

El primer trabajo en vislumbrar el importante papel que juegan estos translocadores en la patogénesis de EPEC fue desarrollado por Donnenberg y colaboradores en 1996, en donde se observó que células de EPEC mutantes en *espD* son incapaces de inducir la lesión A/E y por lo tanto no desarrollaron la infección (Lai, 1997). En el 2001 Ide y col., demostraron que células de EPEC que presentan adherencia difusa (DA-EPEC), inducen hemólisis en eritrocitos de ovejas mediada por EspD y EspB. A partir de imágenes de microscopía electrónica pudieron reconstruir en tercera dimensión un poro formado por éstas en la membrana del eritrocito (Fig. 7), el cual tiene la forma de un embudo con un vestíbulo amplio que se va estrechando conforme se acerca a la membrana plasmática. Estos investigadores reportaron que el poro tiene un diámetro externo de 55-65 nm y un diámetro interno de 3-5 nm y que parece estar compuesto de 6 a 8 subunidades, aunque la estequiometría exacta no pudo ser determinada (Ide y col., 2001).

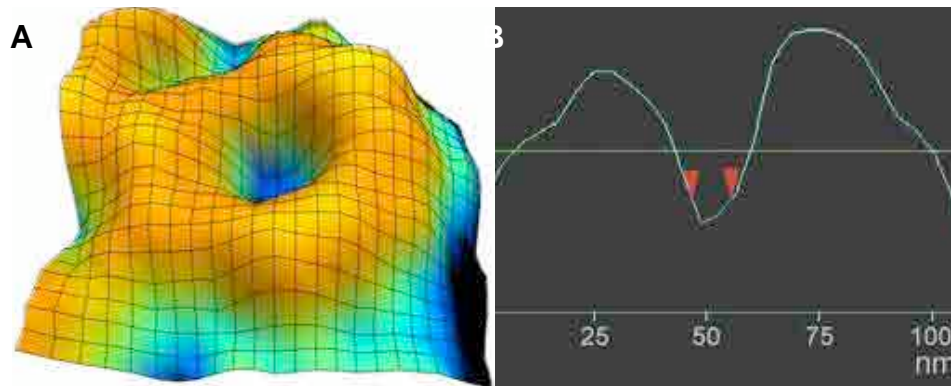


Figura 7. Poro formado por DA-EPEC en eritrocitos de oveja. (A) Reconstrucción tridimensional de un poro. Se estimó una elevación del poro de aproximadamente 20 nm con respecto a la superficie membranal que lo rodea. (B) Perfil de un poro en donde se observa la forma de embudo en la que se señala con triángulos rojos el canal interno (Modificado de Ide y col., 2001).

En las proteínas EspB y EspD se ha predicho la presencia de dominios transmembranales hidrofóbicos y dominios *coiled-coil*, los cuales están involucrados frecuentemente en interacciones proteína-proteína (Fig. 8). A diferencia de EspB que sólo posee un dominio transmembranal entre los residuos 99 a 149 y uno *coiled-coil* entre los aminoácidos 189 y 216, EspD posee dos dominios *coiled-coil* entre los residuos 145 y 177 de su región amino terminal y 336 a 368 del carboxilo, y en la parte central de esta proteína se ubican los dominios hidrofóbicos o transmembranales (Fig. 8). Se piensa que dichos dominios se insertan en la membrana plasmática de la célula hospedero y participan en la formación del poro de translocación (Delahay y Frankel, 2002).

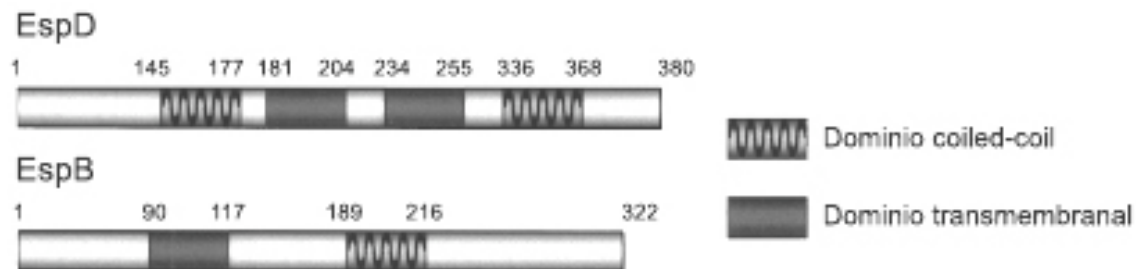


Figura 8. Representación esquemática de los dominios predichos para las proteínas formadoras del poro EspD y EspB (Modificado de Delahay y Frankel, 2002).

Aunque se ha demostrado que EspB de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) es detectada dentro de la célula en el citoplasma y que interactúa con

sitio de formación del pedestal (Delahay y Frankel, 2002); en el caso de EPEC no se ha demostrado esta interacción. No obstante, se piensa que esta proteína puede despolimerizar la actina causando cambios en la morfología de las fibras y microtúbulos del citoesqueleto, lo que sugiere que EspB puede ser una proteína con actividad dual, comportándose como una proteína efectora adicionalmente a su papel en la formación del poro de translocación (Luo y col., 2006). Esta suposición puede sustentarse en los reportes que afirman que EspD es el principal componente del poro y que EspB tiene un papel secundario en este proceso (Daniell y col., 2001a). Por otro lado, aunque la proteína EspD no parece ser un componente estructural del filamento EspA, células de EPEC mutantes en *espD* producen sólo estructuras reminiscentes del filamento EspA, lo que indica que EspD juega un papel importante en la biogénesis del filamento. También mediante experimentos de interacción entre proteínas se identificó la interacción de EspD con proteínas del aparato de secreción del SST3, se sugirió que ésta podría asociarse a la MI para establecer una jerarquía en la secreción de otras proteínas a través del SST3 (Creasey y col., 2003a). Sin embargo, recientemente se encontró que la interacción entre las proteínas SepL y SepD es la responsable de regular el orden de secreción de las proteínas translocadoras y efectoras mediante la represión de la secreción de efectores, sin interferir con la transcripción de las proteínas, facilitando así la secreción de los translocadores y determinando de este modo la jerarquía de la secreción (Deng y col., 2005).

Planteamiento del problema

Las interacciones proteína-proteína tienen un papel central en la mayoría de los procesos biológicos bacterianos, como en la patogénesis. Si bien diversas interacciones han sido descritas en el proceso de ensamblaje del SST3, no se ha determinado el tipo de interacciones que permiten el reconocimiento de las proteínas efectoras por los componentes del sistema secretor. Debido a esto, los esfuerzos del laboratorio están enfocados en identificar el mecanismo de reclutamiento, reconocimiento y transporte de las proteínas efectoras y los complejos efector-chaperona por los componentes basales del aparato de secreción tipo III.

ANTECEDENTES

Mediante cromatografía de afinidad (ensayos de pull down), Thomas y colaboradores demostraron la interacción trimolecular entre la chaperona CesT, el efector Tir y la ATPasa EscN. Estos autores demostraron que CesT además de estabilizar a Tir en el citoplasma de EPEC recluta a este efector al aparato de exportación y que este direccionamiento depende de la ATPasa EscN, la cual se piensa que esta situada en la base del SST3 abasteciendo de energía al sistema. Adicionalmente demostraron que CesT interactúa con otros efectores como NleA, NleH, NleF, EspH y EspZ de los cuales los tres primeros no son codificados por LEE lo que sugiere que CesT podría funcionar como una chaperona general (Thomas y col., 2005).

Por otra parte Akeda y Galán investigaron el papel que la ATPasa InvC de Salmonella desempeña en el reconocimiento de los sustratos a secretarse. Para lo cual utilizaron al efector SptP y a su chaperona SicP. Estos autores demostraron que InvC interactúa con la chaperona sola y con el complejo efector-chaperona, SptP-SicP, pero no reconoce al efector que carece del dominio de unión a la chaperona. También sugieren que la hidrólisis de ATP es necesaria para el reconocimiento, ya que en presencia de ATP- γ S, sustrato que no es hidrolizable, InvC no reconoce al complejo SptP-SicP (Akeda y col., 2005).

JUSTIFICACIÓN

Las infecciones gastrointestinales son un problema prioritario de salud en todo el mundo debido a la alta frecuencia con que se presentan. En el año 2003 estimaciones clínicas revelaron que los habitantes de países en desarrollo pueden presentar de 5 a 10 infecciones gastrointestinales por año. Aunque cabe mencionar que este problema no es exclusivo de los países en vías de desarrollo, ya que un habitante promedio de Estados Unidos de Norte América puede padecer hasta 3 infecciones del tracto intestinal en el mismo periodo de tiempo. La magnitud de este problema de salud es tal que solamente las enfermedades diarreicas matan al menos a un niño cada 15 segundos en alguna parte del mundo (Alper, 2003).

Aunque diversos patógenos están implicados en enfermedades diarreicas, EPEC es la principal variedad de *E. coli* asociada con esta infección en humanos (Chen, 2005). En nuestro país la diarrea se ha mantenido como un problema primordial de salud pública y es la principal causa de consulta externa y hospitalización en niños menores de cinco años (Terres, 2002). Es debido a esto que es importante el desarrollo de proyectos de investigación enfocados a entender los mecanismos de patogénesis que utiliza este microorganismo.

Las interacciones proteína-proteína tienen un papel central en la mayoría de los procesos biológicos bacterianos, como en la patogénesis. Si bien diversas interacciones han sido descritas en el proceso de ensamblaje del SST3, no se ha determinado el tipo de interacciones que permiten el reconocimiento de las proteínas efectoras por los componentes del sistema secretor. Debido a esto, los esfuerzos del laboratorio están enfocados en identificar el mecanismo de reclutamiento, reconocimiento y transporte de las proteínas efectoras y los complejos efector-chaperona por los componentes basales del aparato de secreción tipo III.

OBJETIVOS

GENERAL

El objetivo general del presente trabajo es la purificación de la proteína EspB y EspD así como la obtención de anticuerpos contra estas proteínas. Para generar las herramientas necesarias para cumplir esta meta, se plantearon los objetivos específicos que a continuación se describen.

PARTICULARES

1. Clonación de los genes *espB* y *espD* del SST3 de EPEC
2. Expresión de los genes clonados.
3. Purificación de las proteínas recombinantes.
4. Obtención de anticuerpos policlonales contra EspB y EspD

MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se enlistan y describen brevemente las cepas de *E. coli*, los vectores y las construcciones generadas en este estudio.

Tabla 1. Descripción de las cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepa	Descripción	Referencias
E2349/68	EPEC tipo silvestre serotipo 0127:H6	Elliot y col., 1998
EPEC Δ escN	Cepa de EPEC mutante nula en el gen <i>escN</i> que codifica para la ATPasa del SST3	Puente, J. L. Instituto de Biotecnología, UNAM
Nova Blue	Cepa mutante en endonucleasas y recombinación que rinde DNA plasmídico de alta calidad.	Manual de Novagen Merck
Top10	Cepa mutante en recombinación que permite clonar DNA metilado que provee de DNA de alta calidad	Cartálogo de Invitrogene
BL21(DE3)pLysS	Cepa para expresión que posee el gen de la RNA polimerasa T7 en el cromosoma bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> (lisógena λ DE3). Carece de las proteasas Lon y OmpT. Provee la lisozima T7 para reducir los niveles de expresión basal.	Studier y col., 1990
HMS174(DE3)pLysS	Cepa para expresión (lisógena λ DE3). Mutante en recombinación. Provee la lisozima T7 para reducir los niveles de Bioscience expresión basal.	Manual de Novagen Merck
SJW1368	Cepa de <i>Salmonella</i> incapaz de ensamblar flagelo, mutante en <i>flhDC</i> , regulador maestro, que controla la expresión de las proteínas estructurales del flagelo	Ohnishi y col., 1994
Vectores		
pUC18	Vector de clonación de alto número de copia que confiere resistencia a ampicilina, el cual presenta el sitio de multiclonación en el gen <i>lacZ</i> , lo que permite distinguir a las clonas que contengan el DNA de interés mediante α -complementación.	Catálogo de New England Biolabs
pTrc99AFF4	Vector generado a partir del plásmido pTrc99A por la sustitución del sitio de restricción NcoI del sitio de multiclonación por el sitio NdeI, y la eliminación del único sitio NdeI en el vector	Ohnishi y col., 1997
pET19b	Vector de expresión que contiene un promotor T7 y genera la expresión de proteínas recombinantes en fase con una etiqueta de 10 residuos de histidinas fusionada al amino terminal. Confiere resistencia a ampicilina.	Manual de Novagen Merck Bioscience
Construcciones		
pMUespB	espB clonado en pUC18	Este trabajo
pMTespB	espB clonado en pTrc99AFF4	Este trabajo
pMEespB	espB (con etiqueta de histidinas en el N-terminal) clonado en pET19b	Este trabajo
pMUespD	espD clonado en pUC18	Este trabajo
pMTespD	espD en pTrc99AFF4	Este trabajo
pMEespD	espD (con etiqueta de histidinas en el N-terminal) clonado en pET19b	Este trabajo

Purificación de DNA cromosomal

De dos colonias aisladas de EPEC, una variedad resistente a ácido nalidíxico y otra a estreptomicina, se prepararon dos precultivos de 2 ml de medio Luria-Bertani[†] (LB) adicionado con ácido nalidíxico 20 µg/ml o estreptomicina 25 µg/ml respectivamente, y se incubaron a 37° C con agitación por 12h. Se inocularon 50 ml de LB fresco y el antibiótico respectivo, con una dilución 1:50 de cada uno de los precultivos por separado. Las células se crecieron hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.8-1.0 y se cosecharon por centrifugación a 10000 x g por 10 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 25 ml de amortiguador TE y las células se centrifugaron nuevamente en las condiciones antes mencionadas. Se guardó la pastilla y se resuspendió en 500 µl de amortiguador de sacarosa suplementado con 50 µl de lisozima 5mg/ml y 8 µl de RNAsa 10 mg/ml disuelta en acetato de sodio 0.1 M pH 5.0. Esta mezcla se incubó en hielo 15 min y después se agregaron 150 µl de mezcla lítica de tritón y se incubó 15 min adicionales en hielo; se agregaron 500 µl de agua estéril y se centrifugó a 15000 x g por 30 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con sumo cuidado en 50 µl de amortiguador TES adicionado con 50 µl de proteasa K (5mg/ml disuelta en el mismo amortiguador). La mezcla se incubó a 37° C por 12h con agitación moderada. Para purificar el DNA, éste se extrajo con fenol, se agitó por 15 min y se centrifugó a 10500 x g por 10 min guardando siempre la fase acuosa, este procedimiento se repitió hasta eliminar la interfase blanca que contiene a las proteínas. Una vez eliminada la fase proteica, el fenol se eliminó con 2 volúmenes de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó como se mencionó antes. El DNA se precipitó con 1/10 (del volumen de la fase acuosa) de acetato de sodio 5 M pH 5.3 y 2½ volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla se mantuvo a -70° C por 2h y se centrifugó como antes; la pastilla se lavó con 2 volúmenes de etanol al 80% y se centrifugó en las mismas condiciones. El DNA se secó al vacío por 5 minutos. Finalmente el DNA cromosomal se resuspendió con mucho cuidado en 400 µl de agua estéril y filtrada y se almacenó a -20° C.

Amplificación de *espB* y *espD*

El DNA obtenido se utilizó como templado para amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los genes *espB* y *espD*. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador de la marca JM Research modelo PTC150 utilizando la enzima DNA polimerasa termoresistente de alta fidelidad, *Pfu* (Stratagene), en un volumen final de 100 μ l. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 2 min a 95° C; y 28 ciclos de 1 min a 95° C, 1 minuto a 56° C, 3 min a 72° C y al finalizar éstos, una incubación de 10 min a 72° C para permitir la extensión de productos residuales incompletos.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para amplificar los genes *espB* y *espD* con los sitios de restricción en negritas y subrayados. En ambos casos los oligonucleótidos designados Forward contienen el sitio de restricción para la enzima *NdeI* y los Reverse para *BamHI*.

Oligonucleótidos	
Para <i>espB</i>	
5'	3'
Forward	AGGCGTTT CATATG AATACTATCG
Reverse	ATCGACCAG GGATCC ATTACCCAGC
Para <i>espD</i>	
5'	3'
Forward	AACCGGAGATA CATATG CTTAATG
Reverse	ACGCCTCTT GGATCC TTAACCTCG

Preparación de células competentes con CaCl_2

De una colonia aislada de *E. coli* Top 10 se inició un precultivo de 2 ml de LB que se incubó a 37° C con agitación por 12h. Se inocularon 30 ml de LB fresco con una dilución 1:100 del precultivo, y las células se crecieron a 37° C con agitación hasta alcanzar una DO a 650 nm de 0.3 a 0.5. Las células se cosecharon por centrifugación a 7650 x g por 5 min a 4° C. La pastilla se resuspendió cuidadosamente (sin utilizar vortex), con 30 ml de CaCl_2 100 mM frío. Las células se incubaron en hielo por 40 min y se centrifugaron como se mencionó anteriormente. La pastilla se resuspendió en 3 ml de CaCl_2 frío. Estas células se pueden incubar a 4°C durante 12 h para aumentar su eficiencia. Si las células no

se ocupan inmediatamente se les agregan 3 ml de glicerol al 50% y se almacenan a -70° C.

Transformación de DNA plasmídico

Se tomaron 200 µl de células competentes que se incubaron 60 min en hielo con 1 µl DNA plasmídico. Enseguida se les aplicó un choque térmico a 42° C por 2 min y se regresaron al hielo por 3 min. Las células se distribuyen en placas de LB sólido adicionadas con el antibiótico respectivo. Cuando las células fueron transformadas con reacciones de ligación, para incrementar la eficiencia de la transformación, se les agregó 1 ml de medio SOC frío después de recibir el choque térmico y se incubaron a 37° C con agitación moderada por 60 min.

Clonación de los genes *espB* y *espD*

Los productos de la amplificación, previa digestión y purificación mediante su extracción de gel de agarosa utilizando el paquete comercial QIAquick Gel Extraction de Qiagen, y siguiendo las recomendaciones del fabricante; se clonaron en los sitios *NdeI* y *BamHI* del vector pUC18 (Fig. 9). Se escogió este vector para la clonación inicial ya que mediante α -complementación es posible distinguir visualmente aquellas clonas que hayan integrado correctamente el gen amplificado, así como por su accesible tamaño, su alto número de copias por célula y la disponibilidad de oligonucleótidos de éste para la secuenciación.

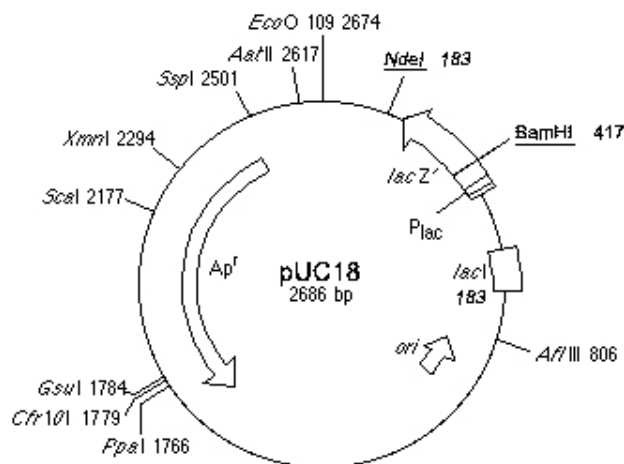


Figura 9. Mapa de pUC18 con la ubicación de los sitios de restricción, subrayados y en negritas, en donde se clonaron los genes amplificados.

Para la reacción de ligación entre el vector y los productos de PCR se utilizó la enzima T4 DNA ligasa, de New England Biolabs (NEB), ésta se incubó 16 h a 16° C. Antes de transformar el producto de la ligación en células competentes de *E. coli* Top 10, la enzima se inactivó a 70° C. Las células transformantes se seleccionaron por su resistencia a ampicilina y se obtuvo el DNA plasmídico de una colonia aislada mediante lisis alcalina utilizando el paquete comercial QIAprep spin miniprep, de Qiagen, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Al DNA purificado se le realizó análisis de restricción, utilizando las enzimas *Bam*HI y *Nde*I. EL producto de la digestión se cargó en geles de agarosa al 1% que se tiñeron con bromuro de etidio. Una vez comprobado que las clonas contenían los genes *espB* o *espD*, se transformaron en células Nova Blue para obtener DNA plasmídico de alta calidad que se envió a secuenciar a la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, para verificar que los genes no tuvieran mutaciones.

Para poder expresar dichos genes fue necesario subclonarlos en los vectores de expresión pTrc99AFF4 (Fig. 10) y pET19b (Fig. 11A), utilizando los mismos sitios de restricción.

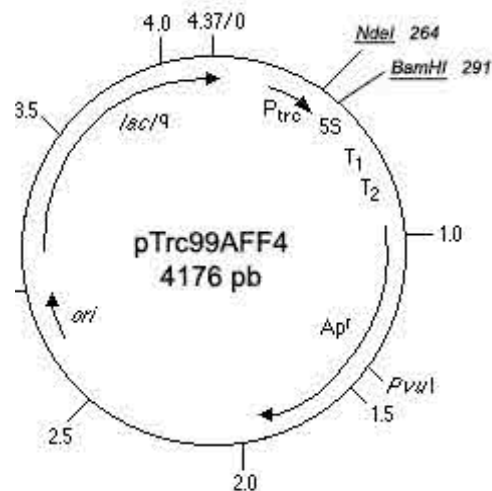


Figura 10. Mapa de pTrc99AFF4 con los sitios en donde los genes fueron subclonados en negritas y subrayados.

Para purificar las proteínas recombinantes, ambos genes fueron subclonados en pET19b, el cual añade una etiqueta de 10 histidinas al extremo amino terminal de la proteína (Fig. 11B).

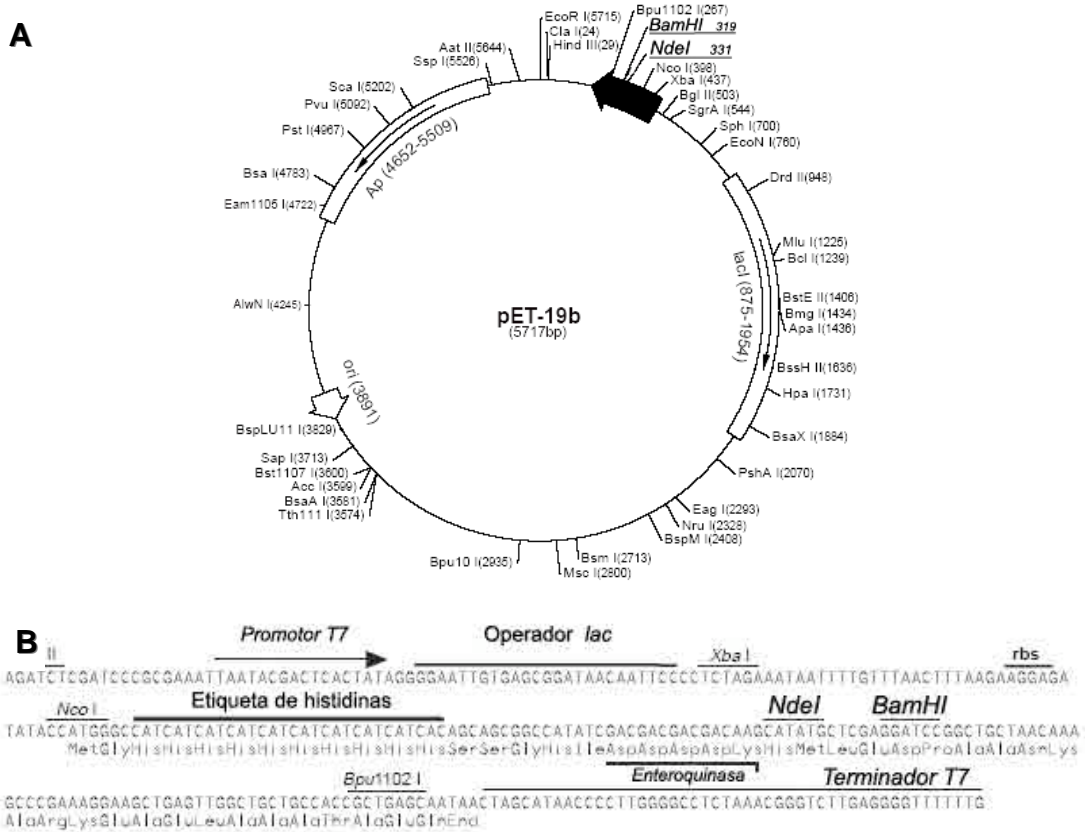


Figura 11. Mapa del vector de expresión pET19b (A) Los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* están subrayados y en negritas. (B) Región promotora con la etiqueta de 10 histidinas y los sitios de clonación resaltados en negritas.

Inducción del gen *espB* y purificación de la proteína recombinante

A partir de una colonia aislada de BL21(DE3)pLysS (BDP) que contenía la construcción pMEespB se preparó un precultivo de 5 ml de medio LB con ampicilina, que se creció 12 h a 37° C con agitación. Al día siguiente se inocularon 200 ml de LB fresco con ampicilina con una dilución 1:100 del precultivo. Las células se crecieron a 30° C con agitación hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0.6-0.8. Una vez alcanzada la DO se agregó al cultivo β-D isopropil-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.1 mM y se continuó la incubación con agitación a 30° C. Después de 4 h las células se cosecharon por

centrifugación a 10500 x g por 10 min a 4° C. La pastilla se resuspendió en 15 ml de amortiguador TNI y las células se fraccionaron por sonicación; las bacterias no lisadas, los restos celulares y los componentes insolubles se removieron por centrifugación a 27000 x g por 20 min a 4° C. El sobrenadante se recuperó y se ultracentrifugó a 172590 x g por 1h a 4° C. Las proteínas recombinantes se purificaron del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad por níquel en una resina de agarosa acoplada a níquel de Qiagen. En una columna empacada con 2 ml de resina y equilibrada con 10 ml de TNI, se cargó el sobrenadante del lisado celular con la proteína recombinante, la cual fue inmovilizada en la columna por medio de interacciones iónicas entre los anillos imidazol de las histidinas y el ión Ni^{2+} unido a la resina. La columna se lavó con 50 ml de TNI con 60 mM de imidazol para remover las proteínas unidas inespecíficamente. La proteína recombinante se eluyó de la columna con 2 ml de TNI con concentraciones crecientes de imidazol: 100, 200, 300 y 600 mM respectivamente. Las fracciones eluidas con 200 y 300 mM de imidazol se dializaron en amortiguador salino fosfatado[†] (PBS) para lo cual se utilizó una membrana de celulosa Spectra/Por 2, que permite el intercambio de solutos menores a 12 kDa, de la marca Spectrum Laboratories siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para eliminar completamente el imidazol de las muestras, las fracciones eluidas se dializaron 12 h con tres cambios del amortiguador.

Cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford

Este método colorimétrico se basa en la especificidad de unión del colorante azul de Coomassie a las proteínas y en el subsiguiente viraje del color del reactivo al unirse a éstas, la reacción provoca un cambio en la absorbancia del colorante a 595 nm.

Se preparó 1 ml de albúmina bovina como proteína estándar a una concentración de 10 mg/ml. Después ésta se diluyó a 100, 200, 300, 400 y 500 μ g/ml en un volumen final de 100 μ l para hacer una curva patrón. Se tomaron 20 μ l de la proteína recombinante dializada, así como de cada una de las diluciones de la proteína estándar y se les agregó 1 ml de colorante diluido (1 parte de colorante concentrado de BioRad en 5 partes de agua desionizada). Las muestras se

incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 595 nm. Con los datos obtenidos de la proteína estándar se realizó una curva patrón y sobre ésta se interpolaron los resultados de absorbancia obtenidos para la proteína recombinante.

Generación de anticuerpos policlonales

Dos conejos hembras de la cepa Nueva Zelanda con peso de entre 1 a 1.5 kg, fueron inmunizados subcutáneamente con las proteínas recombinantes purificadas y dializadas en amortiguador PBS. Al conejo número 58 se le inyectó en total 1.14 mg de proteína, y al conejo número 57, 770 µg, repartidos equitativamente en tres inmunizaciones. La inmunización consistió de 1 ml de solución de proteína dializada más 1 ml de adyuvante completo de Freund (CFA). Para los refuerzos se sustituyó el CFA por el adyuvante incompleto de Freund. La emulsión obtenida se inyectó en cinco sitios del lomo de los conejos con una jeringa de 3 ml acoplada a una aguja del número 20. Se colectaron 10 ml de sangre de cada conejo antes de la primera inmunización para obtener el suero preinmune. Al cabo de 5 días de tomada la muestra se les inyectó la primera, de tres dosis, dejando transcurrir 21 días entre éstas para incrementar el título de los anticuerpos, después de 12 días de aplicada la tercera dosis los conejos fueron sangrados a blanco por punción cardíaca para obtener el mayor volumen de sangre posible. Para separar el suero de la sangre, ésta se incubó a 37° C por 1h para facilitar la formación del coagulo. El coagulo se incubó a 4° C un par de horas antes de separar el suero por centrifugación a 10000 x g por 10 minutos a 4° C.

Ensayos de inmunodetección

Las muestras de proteína se cargaron en dos geles de poliacrilamida al 15 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Un gel se tiñó con azul de Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, de la marca Protran de Bios Science, para realizar la inmunodetección por la técnica de Western blot. Al concluir la transferencia, la membrana se bloqueó con solución de leche en polvo descremada al 5% en amortiguador salino de Tris (TBS) adicionado con Tween 20 al 0.1% (TBS-T) por 1 h a 4° C con agitación, para eliminar la adherencia de los

anticuerpos en sitios inespecíficos. La membrana bloqueada se lavó 10 min cinco veces con 30 ml de TBS-T frío, cambiando el amortiguador entre los lavados. A continuación, la membrana se incubó con el suero anti-EspB diluido 1:30000 en TBS-T por 1 h a 4° C con agitación, y posteriormente se realizaron lavados sucesivos como antes se describió. La membrana se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP), que reconoce las IgG de conejo, diluido 1:20000 en TBS-T. Después de lavar sucesivamente la membrana se incubó con solución detectora del paquete quimioluminiscente ECL Western Blotting de Amersham Bioscience, la cual consta de una parte de luminol y una de peróxido de hidrógeno. En este sistema de detección la HRP cataliza la oxidación del luminol que inmediatamente después de ser oxidado emite luz con una longitud de onda de 428 nm, la cual puede ser captada en una película fotosensible. La autoradiografía se obtuvo colocando, dentro de un casete de impresión, la membrana en contacto con una hoja de papel para radiografías que posteriormente fue revelada.

Ensayo de secreción de proteínas translocadoras de EPEC

De una colonia aislada de EPEC se realizó un precultivo en 2 ml de LB con 25 µg/ml de estreptomina, las células se crecieron a 37° C sin agitación por 12 h. Se inocularon 4 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin antibiótico, con una dilución 1:100 del precultivo y se incubaron a 37° C sin agitación hasta alcanzar una DO cercana a 0.7 a 600 nm. Las células se separaron por centrifugación a 13000 x g por 5 min. La pastilla se resuspendió en amortiguador de corrida para SDS-PAGE[†] 2X de acuerdo a sus valores normalizados de DO.

Las proteínas del sobrenadante se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA). Por cada 1.5 ml de sobrenadante se agregaron 145 µl de TCA al 100% y se incubaron a 4° C por 12 h. Las proteínas se recuperaron por centrifugación a 16000 x g por 30 min. El sobrenadante se removió con sumo cuidado y el precipitado se resuspendió en amortiguador de corrida para SDS-PAGE 2X, de acuerdo con sus valores normalizados de DO y se agregó 1 µl de Tris saturado para neutralizar al TCA residual. Se cargaron 8 µl de las muestras en un gel SDS-PAGE al 15 %.

RESULTADOS

Purificación de DNA cromosomal

La obtención del DNA cromosomal de dos variedades de EPEC de la cepa silvestre E2348/69 se realizó con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, como se indicó en material y métodos. EL DNA se obtuvo sin contaminación de RNA (Fig. 12), y se utilizó como templado para la amplificación de los genes *espB* y *espD*. La cantidad de DNA se cuantificó en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia de luz UV a 260 mn de la muestra. Se determinó que el rendimiento de DNA de la cepa resistente a ácido nalidíxico fue de aproximadamente 1.85 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, mientras que el de la cepa resistente a estreptomicina fue de 2.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

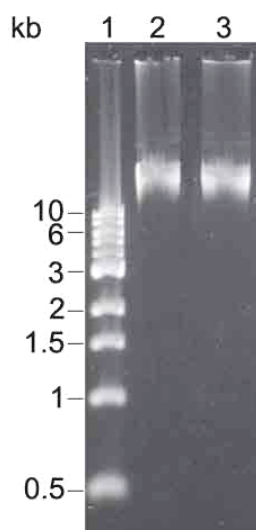


Figura 12. Electroforesis de DNA cromosomal de EPEC en gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de tamaño molecular en kilobases (kb). Carril 2: 1 μl (240 ng) de DNA de EPEC resistente a ácido nalidíxico. Carril 3: 1 μl (300 ng) de DNA de EPEC resistente a estreptomicina.

Amplificación de *espB* y *espD*

Se corrió una muestra de 5 µl del producto de amplificación de ambos genes, en geles de agarosa para determinar su tamaño. Se observa que los productos amplificados migran en el intervalo de 0.5 a 1.5 kb con respecto al marcador, esto coincide con el tamaño reportado para los genes *espB* y *espD* de EPEC tipo silvestre, que es de 965 y 1142 pb, respectivamente (Fig. 13).

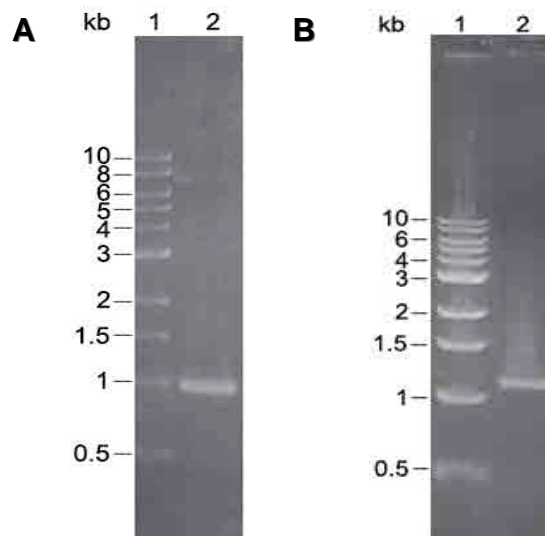


Figura 13. Amplificación por PCR de (A) *espB* y (B) *espD*.

Clonación de *espB* y *espD*

Para clonar los productos amplificados en pUC18, los genes así como el vector se digirieron y purificaron antes de realizar la ligación. Se tomaron muestras del vector así como de ambos genes para determinar electroforéticamente la concentración de DNA, y verificar la pureza de los fragmentos. Se obtuvo un rendimiento aproximado de 65, 48 y 36 ng/µl de DNA para pUC18, *espB* y *espD* respectivamente (Fig 14).

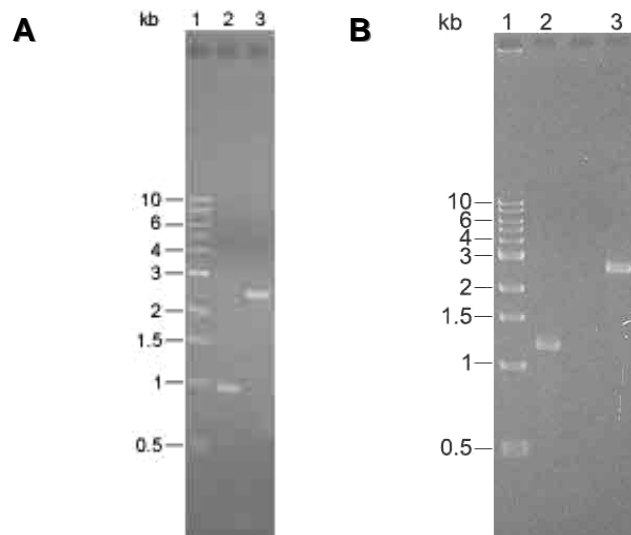


Figura 14. Vector pUC18 de 2.6 kb (en ambos geles carril 3) y productos de PCR digeridos y purificados de geles de agarosa. (A) Carril 2: *espD* de 1142 pb y (B) Carril 2: *espB* de 965 pb.

Los productos de las reacciones de ligación se transformaron en células competentes Top10. Para el gen *espB* se obtuvieron 30 colonias transformantes, de éstas se seleccionaron 4 clonas al azar de las que se obtuvo el DNA plasmídico y se analizó por restricción con las enzimas *NdeI* y *BamHI*, las 4 clonas tenían el inserto *espB*, por lo que se tomó una de ellas que se denominó pMUespB (Fig. 15A) y las restantes se desecharon. De la ligación pUC18 con *espD* se obtuvieron 352 transformantes, se seleccionaron 5 de ellas al azar que se analizaron por restricción con las mismas enzimas, sólo una de éstas contenía a *espD*, a la que se designó pMUespD (Fig. 15B).

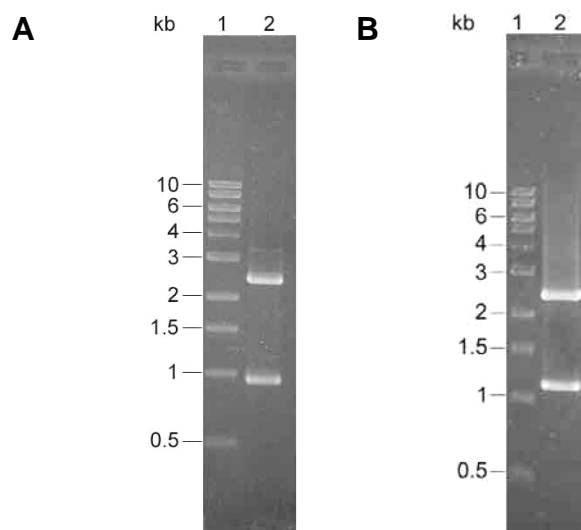


Figura 15. Análisis de restricción con *NdeI* y *BamHI* de las construcciones (A) pMUespB y (B) pMUespD.

Después de confirmar, mediante análisis de restricción, que las construcciones pMUespB y pMUespD contenían a los genes *espB* y *espD* respectivamente; se obtuvo la secuencia nucleotídica de éstas para compararlas con las secuencias reportadas para los genes de la isla de patogenicidad por Elliott y sus colaboradores (Elliott y col., 1998). El gen de pMUespB presentó 100% de identidad con *espB* de la secuencia reportada (datos no mostrados), mientras que *espD* de pMUespD mostró 99%, ya que se observó el cambio de una citosina por una guanina, esta mutación puntual originó la sustitución de un residuo de alanina por uno de prolina (Fig. 16).

Figura 16. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la secuencia nucleotídica del gen *espD*. Donde ESPD_wt corresponde a la secuencia previamente reportada y ESPD_compl a la secuencia obtenida en este trabajo.

Una vez comparadas las secuencias nucleotídicas obtenidas en este trabajo con las ya reportadas, el siguiente paso fue subclonar a los genes en los vectores de expresión pET19b y pTrc99AFF4, para lo cual los genes se extrajeron de las construcciones pMUespB y pMUespD mediante restricción con las enzimas *NdeI* y *BamHI* (Fig.17)

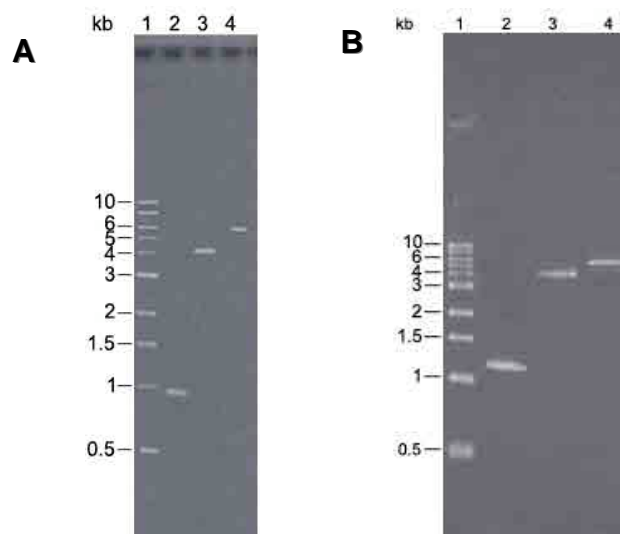


Figura 17. Vectores pTrc99AFF4 (4.1 kb), pET19b (5.7 kb), (en ambos geles carriles 3 y 4 respectivamente) y productos de PCR digeridos y purificados de geles de agarosa. (A) Carril 2: *espB* de 965 pb y (B) Carril 2: *espD* de 1142 pb.

De las ligaciones de *espB* con pET19b y con pTrc99AFF4 se obtuvieron 50 y 84 transformantes respectivamente, de las que se escogieron para analizarlas por restricción 2 colonias de la ligación en pET19b y 4 de la ligación en pTrc99AFF4. Después de los análisis de restricción se obtuvieron finalmente 1 clona de cada una de las reacciones de ligación que fueron designadas pMEespB y pMTespB, siguiendo el mismo orden (Fig. 18).

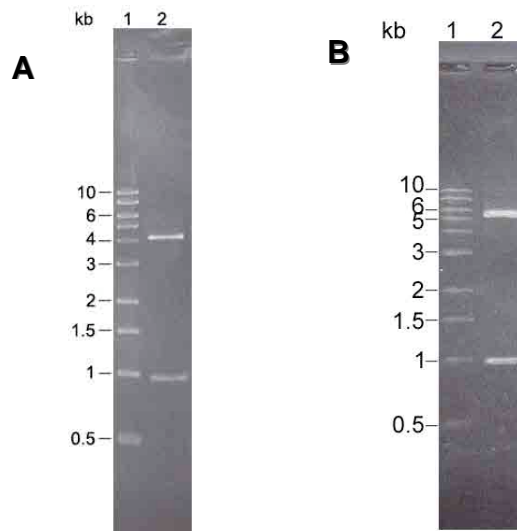


Figura 18. Análisis de restricción con *NdeI* y *BamHI* de (A) pMTespB y (B) pMEespB.

De las ligaciones *espD* con pET19b y pTrc99AFF4 se obtuvieron 37 y 21 colonias transformantes en el orden citado, de las cuales se tomaron 2 colonias de cada una de las reacciones para analizarlas mediante restricción como se mencionó antes. Finalmente se obtuvo una clona de *espD* en pET19b, que se designó pMEespD y otra clona conteniendo a *espD* en pTrc99AFF4 designada pMTespD (Fig. 19).

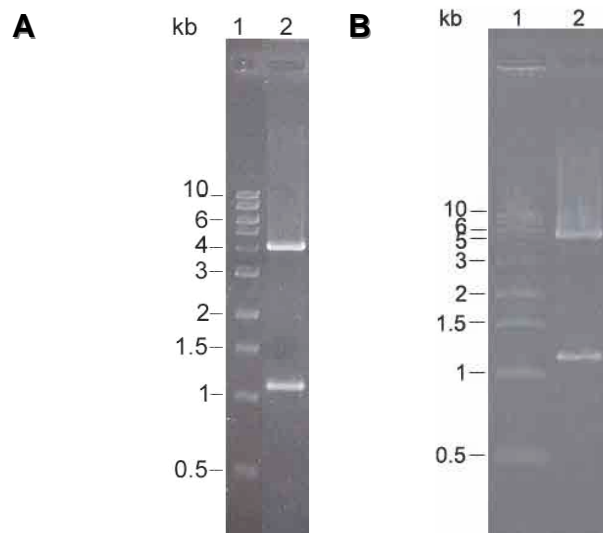


Figura 19. Análisis de restricción con *NdeI* y *BamHI* de (A) pMTespD y (B) pMEespD.

Inducción de la construcción pMEespB

La construcción pMEespB se uso para transformar células competentes de *E. coli* BDP. La inducción de *espB* se realizó con 0.1 mM de IPTG a 30° C por 5h. Se tomaron muestras antes de inducir el cultivo y cada hora después de inducirlo. Estas muestras se analizaron por SDS-PAGE al 15 %.

En la figura 20 se observa que al cabo de 1h de inducción comienza la producción de una proteína que migra por encima del marcador de peso molecular de 32.5 KDa. Si bien el peso estimado para EspB a partir de su secuencia es de 33 kDa, hay que tomar en cuenta la etiqueta de 10 residuos de histidinas y otros 11 aminoácidos fusionados al amino terminal de la proteína recombinante. Se ha predicho que esta etiqueta aumenta el peso molecular de la proteína alrededor de 2 kDa. La figura también muestra que la mayor producción de proteína se obtiene hasta las 4 h posteriores a la inducción del cultivo.

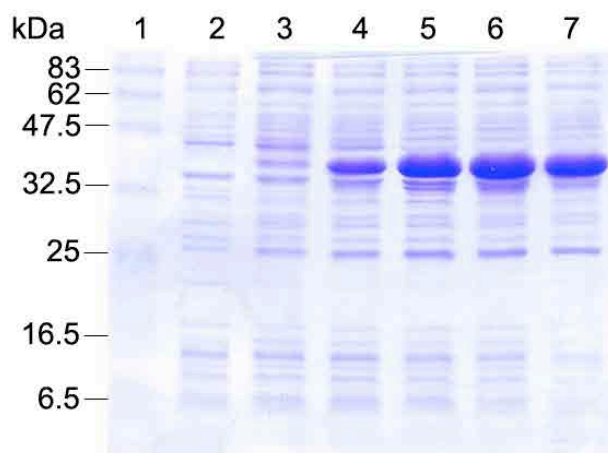


Figura 20. SDS-PAGE de un cultivo inducido de células BDP con la construcción pMEespB. Carril 1: marcador de tamaño molecular. Carril 2: cultivo sin inducir. Carril 3: inducido 1 h. Carril 4: inducido 2 h. Carril 5: inducido 3 h. Carril 6: inducido 4 h. Carril 7: inducido 5 h.

Para determinar si la proteína producida se encontraba soluble en el citoplasma o insoluble formando cuerpos de inclusión, las células de un cultivo inducido cuatro horas en las condiciones antes mencionadas se fraccionaron mediante sonicación y las fracciones se analizaron por SDS PAGE al 15 %. En la figura 21A se muestra que la mayor cantidad de proteína recombinante se encuentra soluble en el

citoplasma. Para confirmar que esta proteína posee la etiqueta de histidinas, ambas fracciones se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos anti-histidinas (Fig. 21B). El ensayo de inmunodetección muestra que el mayor reconocimiento del anticuerpo se obtuvo de la fracción soluble, y confirma que la proteína sobreproducida es la recombinante que posee la etiqueta de histidinas.

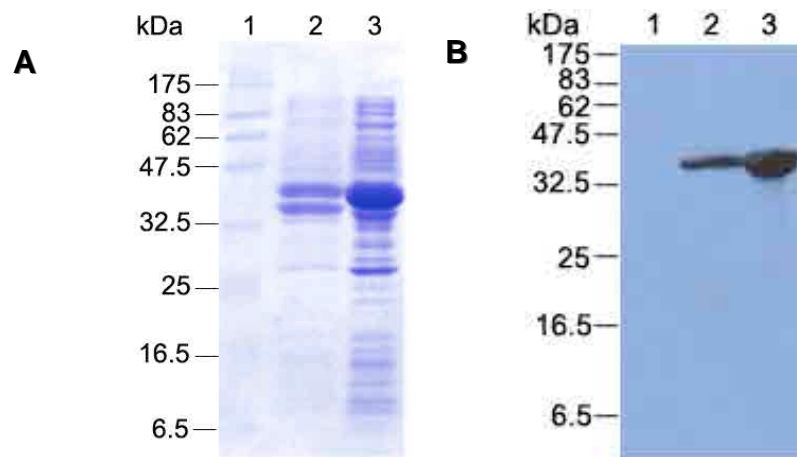


Figura 21. SDS-PAGE de las fracciones del cultivo de pMEespB en BDP inducido 4 horas. Carril 1: marcador de tamaño molecular. Carril 2: fracción insoluble. Carril 3: fracción soluble. (A) Tinción con azul de Coomassie y (B) Inmunodetección con anticuerpos anti-histidinas.

Purificación de his-EspB

La purificación de his-EspB se realizó a partir de la fracción soluble de un cultivo de 200 ml de pMEespB en células BDP. Se tomaron muestras de cada una de las fracciones obtenidas de la purificación y se cargaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 15 % (Fig. 22).

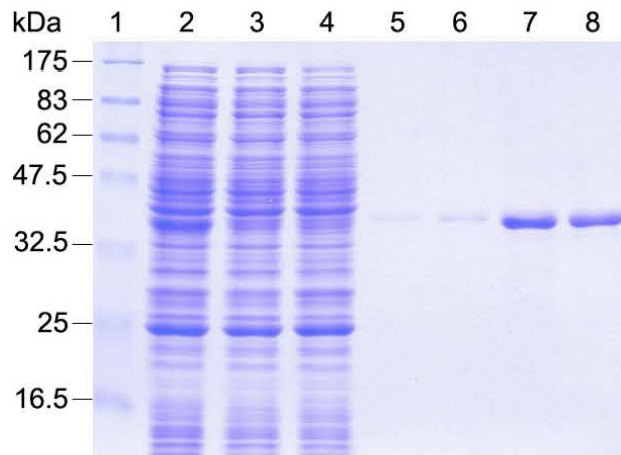


Figura 22. Purificación de la proteína recombinante his-EspB. Carril 1: marcador de tamaño molecular. Carril 2: fracción soluble. Carril 3: fracción que pasó a través de la columna sin adherirse. Carriles 4 y 5: lavados con TNI 60 mM de imidazol. Carril 6: elución con TNI 100 mM. Carriles 7 y 8: fracciones eluidas con 200 y 300 mM de imidazol respectivamente.

Se observa que en las fracciones eluidas con 200 y 300 mM de imidazol se libera la proteína. Una vez determinadas las condiciones de purificación, dichas fracciones se dializaron en amortiguador PBS por 12 h con tres cambios, para inmunizar conejos y obtener anticuerpos policlonales contra EspB. Previo a la inmunización, se determinó la concentración de proteína; la fracción eluida con 200 mM de imidazol contenía 240 $\mu\text{g/ml}$ de his-EspB, mientras que la fracción eluida con 300 mM de imidazol contenía 350 $\mu\text{g/ml}$ de proteína recombinante.

Obtención de anticuerpos policlonales

Proteínas de lisados celulares completos de la construcción pMEespB en células BDP, así como la proteína pura (Fig. 23), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con el suero preinmune y con los sueros obtenidos de los dos conejos.

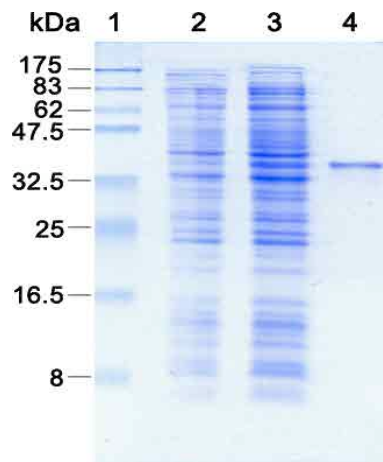


Figura 23. SDS-PAGE al 15 %. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado celular de un cultivo de pMEespB en BDP sin inducir, carril 3: inducido 1 hora y carril 4: his-EspB purificada y diluida 1: 5.

La figura 24 muestra el ensayo de inmunodetección de la membrana a la que se transfirieron las proteínas del gel de la figura 22, incubada con el suero preinmune del conejo 57, diluido 1:6000. Se observa que no existe reconocimiento de una proteína que coincida con el peso estimado para his-EspB.

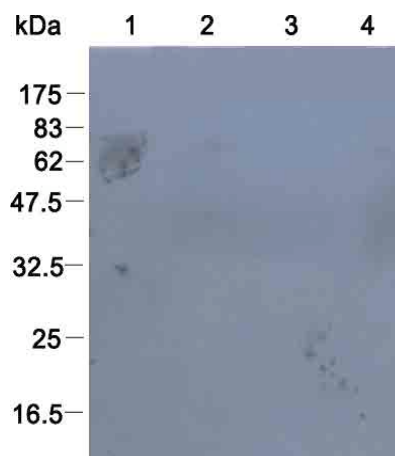


Figura 24. Inmunodetección con el suero preinmune del conejo 57. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: cultivo de pMEespB en BDP sin inducir, carril 2: inducido 1 hora y 3: his-EspB purificada y diluida 1: 5 (ver Fig. 22).

Los resultados obtenidos para el suero preinmune del conejo 58 fueron los mismos (datos no mostrados).

El suero obtenido con los anticuerpos anti-EspB se probó a diferentes diluciones, 1:6000; 1:10000 y 1:20000 en TBS-T (datos no mostrados). La dilución óptima de los

anticuerpos fue de 1:30000 la cual se utilizó en los experimentos posteriores. Los anticuerpos obtenidos de ambos conejos son muy específicos y reconocen a la proteína de interés incluso en lisados de células completas (Fig. 25). Independientemente de la dilución de los anticuerpos se observó que el suero del conejo 57, al que se le administró la dosis de 770 µg totales de proteína presenta un reconocimiento inespecífico mínimo, a diferencia del suero del conejo 58, inmunizado con 1.0 mg de proteína total, el cual presenta un fondo mayor y más persistente a los lavados.

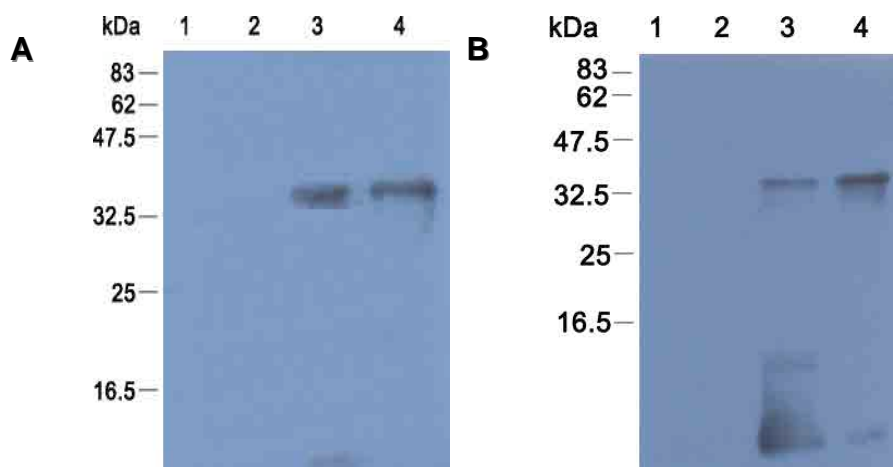


Figura 25. Inmunodetección de his-EspB con anticuerpos policlonales anti EspB de proteínas de lisados celulares completos de la construcción pMEespB en células EBDP. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: cultivo sin inducir, carril 3: inducido 1 hora y carril 4: his-EspB purificada y diluida 1: 5 (ver Fig. 22). (A) inmunodetección con suero 57 y (B) inmunodetección con suero 58.

Ensayo de secreción

Para estudiar la secreción de las proteínas translocadoras EspA, EspB y EspD, células de EPEC tipo silvestre y EPEC Δ escN (cepa mutante en la ATPasa EscN que energiza al SST3), se crecieron en medio DMEM y LB a 37° C sin agitación. En la figura 25 se observa que la secreción de estas proteínas sólo se produce cuando EPEC silvestre se crece en medio DMEM y no en LB, como ha sido reportado (Keny y col., 1997). En el ensayo de la mutante en EscN la secreción es afectada aún cuando la bacteria es crecida en medio DMEM. Las proteínas secretadas (Fig. 26) se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con el suero anti-EspB del conejo 57.

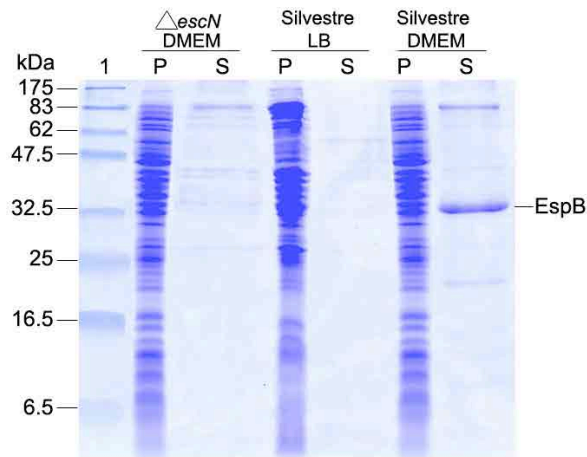


Figura 26. SDS PAGE de las proteínas secretadas por EPEC cuando se crece en medios distintos. Carril 1: marcador de peso molecular. P corresponde a lisados celulares completos y S a las proteínas secretadas.

El ensayo de inmunodetección (Fig. 27) muestra el reconocimiento específico de los anticuerpos al reaccionar con la proteína EspB nativa, se observa que el mayor reconocimiento se da en la fracción de las proteínas secretadas por EPEC silvestre cuando se crece en medio DMEM a diferencia de en medio LB en el que no hubo reconocimiento. La figura también muestra que EPEC $\Delta escN$ es incapaz de secretar proteínas translocadoras; por lo que EspB se acumula en el citoplasma (Fig. 27). Estos resultados se discutirán más adelante.

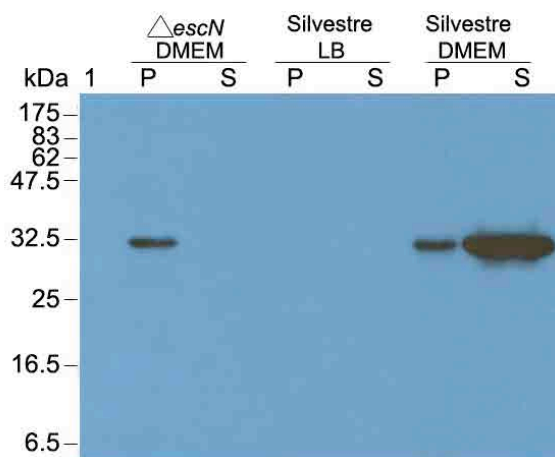


Figura 27. Inmunodetección con anticuerpos anti-EspB en proteínas secretadas por EPEC. P corresponde a lisados celulares completos y S a las proteínas secretadas.

A pesar de que en la figura 26 pareciera existir secreción de EspB en la mutante *escN*, los anticuerpos confirman que la proteína se produce, pero es incapaz de ser secretada.

Inducción de la construcción pMEespD

La construcción pMEespD se uso para transformar células BDP para sobreproducir a la proteína EspD en las mismas condiciones que pMEespB. Sin embargo, el resultado no fue el mismo ya que no se observó la sobreproducción de una proteína que migre cerca del tamaño estimado para EspD nativa, que es de 39.49 kDa (Fig. 28).

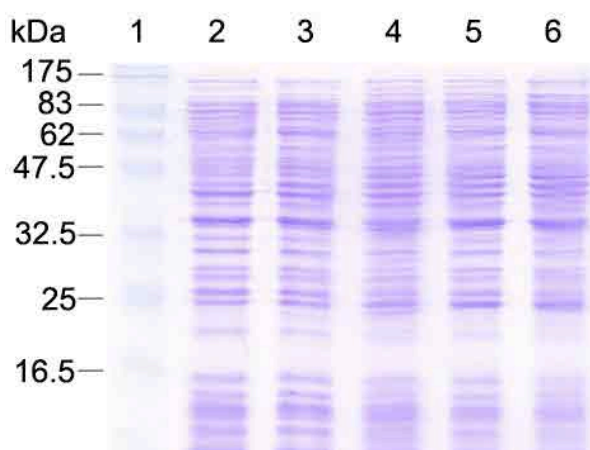


Figura 28. SDS PAGE de la inducción de pMEespD en células BDP. Carril 1: Marcador de tamaño molecular, carril 2: cultivo sin inducir, carril 3: inducido 1 h, carril 4: 2 h, carril 5: 3 h y carril 6: 4 h.

Se intentó expresar a *espD* en otra cepa, la HMS174 que al igual que BDP posee también la RNA polimerasa T7 pero a diferencia de ésta es mutante en recombinación. Aunque esta vez se observó la producción de una proteína al cabo de tres horas de inducción, que migró por debajo del marcador de 47.5 kDa los resultados fueron los mismos que en BDP, la proteína recombinante his-EspD no se produjo (Fig. 29), lo cual se corroboró con anticuerpos como se describe más adelante.

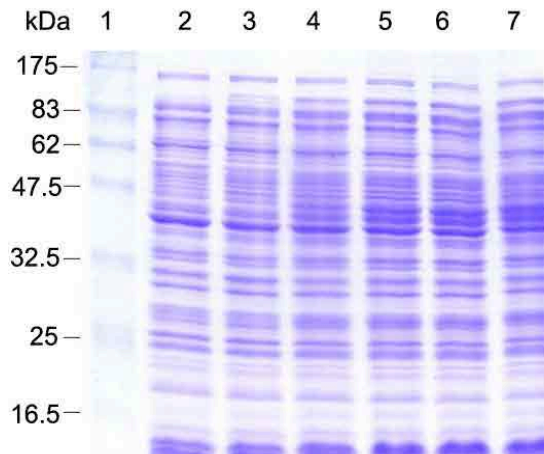


Figura 29. SDS PAGE de la inducción de pMespD en HMS174. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: cultivo sin inducir, carril 3: inducido 1 h, carril 4: 2h, carril 5: 3 h, carril 6: 4 h, carril 7: 5 h.

Se realizó un ensayo de inmunodetección utilizando anticuerpos anti-histidinas para detectar a la proteína recombinante, para lo cual muestras de lisados celulares completos de las diferentes cepas utilizadas en la expresión de pMespD (Fig. 30) se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa.

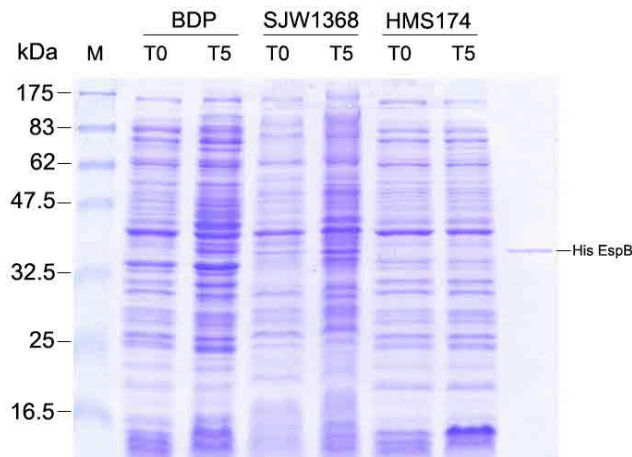


Figura 30. SDS PAGE de dos diferentes tiempos de inducción de pMEespD en diversas cepas. Carril 1: marcador de peso molecular. T0 corresponde al cultivo sin inducir y T5 a las 5 h de inducción. Como control positivo se cargó una muestra diluida de his-EspB.

La figura 31 muestra el ensayo de inmunodetección de las cepas en las que se indujo a pMEespD. Las cepas BDP y HMS174 fueron descritas anteriormente. La cepa SJW1368 de *Salmonella* es una mutante en el SST3 flagelar, que se utilizó para expresar la construcción pMT_{his}espD. En ninguna de las cepas hubo

reconocimiento de la proteína recombinante his-EspD, sólo se detectó his-EspB que se utilizó como control positivo.



Figura 31. Inmunodetección de diferentes cultivos inducidos de pMEspD y pMT_{His}espD utilizando anticuerpos anti-histidinas. Carril 1: marcador de peso molecular. T0 corresponde al cultivo sin inducir y T5 a las 5 h de inducción. Como control positivo se cargó una muestra diluida de his-EspB.

Tratando de producir a EspD las condiciones de inducción se modificaron. Por ejemplo se incrementó la concentración de IPTG hasta 1 mM y lo mismo sucedió con la DO a la cual se indujeron las células, que se aumentó a 1.0. La temperatura se disminuyó a 25° C (datos no mostrados), sin embargo con ninguna de las modificaciones se obtuvieron resultados satisfactorios.

DISCUSIÓN

EPEC utiliza las proteínas translocadoras EspB y EspD para formar poros sobre la membrana plasmática de las células que infecta. Estos poros son estructuras esenciales en la patogénesis de la bacteria ya que forman el conducto por el cual penetran las proteínas efectoras de origen bacteriano que alteran las funciones de la célula eucarionte (Ide y col., 2001). A pesar de que ya se conoce la función general de las proteínas translocadoras, aún no se conocen aspectos tan básicos como la estequiometría de sus componentes en la formación del poro, el motivo de reconocimiento que permite a EspD y EspB insertarse en la membrana plasmática eucarionte y los mecanismos de señalización que le indican a la bacteria el momento en que debe comenzar la secreción de proteínas efectoras hacia el citoplasma de la célula que infectó (Mota y col., 2005).

Si bien en la última década el conocimiento sobre el SST3 se ha incrementado notablemente, proporcionando datos muy importantes acerca de la biogénesis de este complejo macromolecular y de los efectos desencadenados en la célula hospedero después de que EPEC inyecta sus efectores, aún se desconocen muchos aspectos del sistema, como por ejemplo, cómo está compuesto el aparato secretor, cómo es que el SST3 de EPEC reconoce a las proteínas que serán secretadas y de qué tipo es la señal de secreción que estas proteínas poseen.

A pesar de que se han identificado diversas interacciones proteína-proteína durante el ensamblaje del SST3 flagelar, pocas de estas interacciones se han demostrado para el SST3 asociado a virulencia. Debido a esto, es necesario implementar metodologías confiables que nos permitan identificarlas. Aunque se han desarrollado diferentes enfoques experimentales para abordar esta problemática, como el sistema de doble híbrido en levadura y la copurificación de complejos proteicos (Aronheim, 2000 y Yu y Fotouhi, 2006), la generación de anticuerpos específicos contra las proteínas de interés es una herramienta muy útil para tales fines. Utilizando anticuerpos se pueden llevar a cabo experimentos de inmunoprecipitación e inmunodetección en diferentes ensayos como el de inmunoréplica de afinidad

(*affinity blotting*). En EPEC sólo se ha demostrado la interacción del complejo heteroproteico chaperona-efector CesT-Tir con la ATPasa EscN, componente esencial del aparato secretor del SST3 (Gauthier y Finlay, 2003). A su vez, recientemente se propuso que las interacciones entre chaperonas y efectores del SST3 de *Salmonella* pueden participar en el reconocimiento de las proteínas que serán secretadas por este sistema (Akeda y Galán, 2005 y Edqvist y col., 2006).

En el laboratorio estamos interesados en identificar cómo los efectores o los complejos efector-chaperona son reconocidos por el aparato secretor y con qué componentes de éste interactúan. Para ello, en este trabajo se purificó a la proteína EspB con una etiqueta de histidinas fusionada a su región amino terminal, con dos finalidades, la primera de ellas, para obtener proteína soluble en estado nativo y con un alto grado de pureza, y la segunda para obtener un alto rendimiento, se obtuvo más de 1 mg de proteína recombinante His-EspB altamente pura, cantidad suficiente para inmunizar (Fig. 18). Debido a que el interés de nuestro laboratorio es la caracterización del SST3 de EPEC, la obtención de EspB recombinante es una herramienta muy útil que nos permitió obtener anticuerpos sumamente específicos que serán claves en la identificación de posibles interacciones entre esta proteína con su chaperona y con componentes del aparato secretor de EPEC.

La alta especificidad de los anticuerpos obtenidos contra EspB se demostró en los experimentos de inmunodetección, ya que sólo reconocen una proteína tanto en lisados celulares completos, como en las proteínas secretadas por EPEC cuando es crecida en medio DMEM. La falta de reconocimiento en las mismas fracciones de proteínas secretadas por EPEC cuando se crece en medio LB concuerda con lo reportado por Kenny y colaboradores quienes demostraron que en condiciones de laboratorio la secreción de proteínas translocadoras y efectoras por EPEC está determinada por el medio en que las bacterias son crecidas. En medio DMEM la cepa silvestre secreta grandes cantidades de estas proteínas en comparación con las bacterias crecidas en medio mínimo M9 o incluso en LB, en donde la secreción se inhibe completamente (Kenny y col., 1997). A su vez, estos investigadores demostraron que la secreción de EspB está determinada por las concentraciones de hierro, cloruro de calcio y bicarbonato de sodio presentes en el medio DMEM, y

proponen que los componentes del medio asemejan las condiciones ambientales que EPEC encontraría en su desplazamiento por el tracto digestivo. Por ejemplo, *in vivo* la naturaleza ácida del contenido estomacal es rápidamente neutralizada inmediatamente después de su entrada al intestino delgado por altos niveles de bicarbonato de sodio. Por lo que este compuesto puede funcionar como indicador a EPEC de que se encuentra en el intestino delgado y debe comenzar a expresar las proteínas que utilizará en la colonización del epitelio intestinal (Kenny y col., 1997).

Entre los elementos más conservados de los SST3 se encuentran las ATPasas que aportan la energía necesaria para que se lleve a cabo la secreción de proteínas a través de este sistema. Por lo que la falta de secreción de la cepa de EPEC Δ *escN* concuerda con lo reportado por Colin y colaboradores. Estos investigadores reportaron que una cepa mutante de EPEC que carece de la ATPasa es incapaz de secretar proteínas translocadoras y efectoras aún cuando las bacterias se crecen en condiciones que estimulen la secreción. Estos autores compararon los niveles de transcripción de *espB* de la cepa tipo silvestre con la de la mutante en *escN*, sin embargo no encontraron diferencias que les indicaran que la falta de secreción se debiera a una falla en la síntesis de la proteína. También observaron que EspB se acumulaba en el citoplasma de la mutante (Colin y col., 2004).

En cuanto a la proteína translocadora EspD, los esfuerzos para expresar a *espD* utilizando diferentes vectores, cepas y condiciones de expresión no fueron exitosos, a pesar de que en estudios previos reportaron que la proteína EspD unida a diferentes etiquetas es completamente insoluble (Daniell y col., 2001a). Este fenómeno se puede explicar por diversas causas, la primera es que la clona a partir de la cual se generaron las construcciones utilizadas para sobreproducir a la proteína recombinante presenta una mutación que cambia la secuencia de aminoácidos (Fig. 16) lo que podría ocasionar de algún modo la inestabilidad de la proteína y por ende su rápida degradación. Con el fin de aislar una clona que tuviera la secuencia correcta de *espD* se repitió todo el proceso de clonación, desde la amplificación del gen hasta la secuenciación de la construcción en pUC18, el resultado fue el mismo. En el año 2006 se dio a conocer la secuencia del genoma completo de EPEC E2348/69 por investigadores del instituto Sanger, la Universidad

de Oxford y de Birmingham, en Inglaterra y el Instituto Pasteur de Francia. Para disipar cualquier duda las secuencias de *espD* obtenidas en este trabajo se compararon con el genoma completo de EPEC y en los dos casos se obtuvo el mismo cambio nucleotídico de una citosina por guanina. Esto sugiere que posiblemente la secuencia de *espD* obtenida en este trabajo este correcta y no se trate de una mutación como originalmente se pensó.

Otra posible causa es que debido a que EspD es el principal componente del poro de translocación, la sobreproducción de esta proteína resultaría tóxica para las células. Sin embargo, si esto sucediera, habría lisis celular y la DO del cultivo después de la inducción debería estabilizarse, pero esto no es así. Neyt y Cornelis observaron que la sobreproducción de YopB (homóloga a EspD en *Yersinia*), disminuye la DO del cultivo, sugiriendo que esta proteína es altamente tóxica para las células (Neyt y Cornelis, 1999). Lo mismo se observó con la sobreproducción de PopB (homóloga a EspD en *Pseudomonas*) (Schoehn y col., 2003). Por otro lado, se ha reportado que la sobreproducción de proteínas extrañas en *E. coli* frecuentemente ocasiona la formación de agregados proteicos insolubles llamados cuerpos de inclusión, en los cuales la proteína carece de su conformación nativa (Jana y Deb, 2005). Sin embargo, esto tampoco parece ser el caso de EspD ya que ni siquiera se observó la producción de la proteína en la fracción insoluble. La otra causa probable es que la proteína recombinante His-EspD no sea estable en el citoplasma y sea rápidamente degradada, debido a que los valores de DO observados durante las diferentes condiciones de inducción no disminuyeron a lo largo del tiempo y se asemejan a los de la cepa silvestre. Esta parece ser la causa más probable por la que EspD no se detectó en los lisados celulares completos.

Experimentos realizados con cepas de EPEC mutantes en *cesD*, gen que codifica para la chaperona de EspD y EspB, demostraron que CesD es indispensable para la estabilidad en el citoplasma y la secreción de EspD. En el mismo trabajo se observó que EspD no se acumuló en el citoplasma de la mutante $\Delta cesD$ (Wainwright y Kaper, 1998 y Edqvist y col., 2006); a diferencia de EspB que no necesita de CesD para su estabilidad en el citosol, sugiriendo que CesD es una chaperona auxiliar de EspB. El

grupo de Frankel caracterizó a otra chaperona, de EspB y EspA, a la que denominaron CesAB (Creasey y col., 2003a). Esto puede explicar que la proteína recombinante His-EspB, aunque carece de sus chaperonas, sea estable en el citoplasma y se obtenga principalmente en forma soluble.

Es importante resaltar que EspD posee dos chaperonas, CesD y CesD2, las cuales resultan indispensables para su secreción, a diferencia de otras proteínas translocadoras como EspA y EspB, aunque esta última se asocia con CesD, esta chaperona no es indispensable para su translocación (Wainwright y Kaper, 1998 y Neves y col., 2003). Estos datos apoyan la hipótesis que sugiere que EspD puede tener varias funciones en la patogénesis de EPEC. Está claro que esta proteína es el componente principal del poro de translocación, pero también se ha demostrado que EspD participa en la biogénesis del filamento EspA (Daniell y col. 2001a). A su vez, Creasy y colaboradores observaron que EspD se asocia con las proteínas EscR,S y U, las cuales se piensa forman el aparato de exportación en la MI. Estos investigadores proponen que EspD podría participar en el establecimiento de la jerarquía de secreción a través del SST3 (Creasey y col., 2003a), como la que se observa en el ensamblaje del flagelo en *Salmonella*, en donde la proteína integral de membrana FlhB cambia la especificidad de las proteínas que son secretadas durante el ensamblaje del filamento. Una vez que el gancho (estructura que da soporte al filamento del flagelo) ha alcanzado el tamaño apropiado, la interacción de FlhB con otros componentes del aparato de exportación flagelar como FlhA, FliH, FliI, FliO, FliP,FliQ, y FliR (Fig. 3A) detiene la secreción de FlgE, proteína del gancho, y promueve la secreción de FliC, proteína forma el filamento del flagelo (Minamino y Macnab, 1999).

CONCLUSIONES

- Los genes *espB* y *espD* se clonaron a en los vectores pUC18, pTrc99AFF4 y pET19b.
- La proteína recombinante his-EspB se obtuvo altamente pura y con un alto rendimiento.
- Se generaron anticuerpos policlonales sumamente específicos contra la proteína EspB, capaces de reconocer solo a esta proteína incluso en lisados celulares completos de EPEC.
- No fue posible sobreproducir a la proteína recombinante his-EspD, aún cuando se utilizaron diferentes vectores y cepas de expresión.

PERSPECTIVAS

Debido a que la estabilidad de EspD es disminuida en ausencia de sus chaperonas específicas CesD y CesD2, los genes que codifican para estas chaperonas se clonaran en el vector de expresión híbrido pACTr, el cual posee diferente origen de replicación lo que permite coexpresarlo en la misma célula con vectores que tengan el origen colE1. Se evaluará la co-expresión de *espD* en presencia de sus chaperonas. Por otro lado, estamos interesados en evaluar las interacciones de los complejos heteroproteicos efector-chaperona como CesD:CesD2:EspD, así como CesAB:EspB con componentes del aparato de exportación, como la ATPasa EscN.

APÉNDICE

Medios de cultivo

Luria-Bertani (LB)

Para 1 L

10 g de bacto triptona

5 g de extracto de levadura

5 g de cloruro de sodio (NaCl)

Solución de timina tiamina 10%

Para hacer placas de LB se agrega 1.5% de agar

Medio SOC

Para 1 L

20 g de bacto triptona

5 g de extracto de levadura

0.5 g de NaCl

Cloruro de potasio (KCl) 2.5 mM

MgCl₂ 10 mM

MgSO₄ 10mM

Glucosa 20 mM

Se disuelven todos los compuestos en agua desionizada, a excepción del MgSO₄ y la glucosa que se agregan una vez que la solución se esterilizó. Se afora a 1 IL y se esteriliza a 120° C por 20 minutos.

DMEM

EL medio DMEM se adquirió en GIBCO

Componentes	Molaridad mM
Glicina	0.400
L-Hidrocloruro de arginina	0.398
L-Cisteina 2HCl	0.201
L-Glutamina	4.00
L-Hidrocloruro de histidina	0.200
L-Isoleucina	0.802
L-Leucina	0.802
L- Hidrocloruro de lisina	0.798
L-Metionina	0.201
L-fenilalanina	0.400
L-Serina	0.400
L-Treonina	0.798
L-Triptofano	0.0784
L-Sal dihidratada de tirosina	0.398
L-Valina	0.803
cloruro de colina	0.0286
D-pantotenato de calcio	0.00839
Ácido fólico	0.00907
i-Inositol	0.0400
Niacinamida	0.0328
Hidrocloruro de piridoxina	0.0196

Riboflavina	0.00106
Hidrocloruro de Tiamina	0.0119
Cloruro de calcio (CaCl ₂) (anhidro)	1.80
Nitrato ferrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0.000248
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) (anhyd.)	0.814
Cloruro de potasio (KCl)	5.33
Cloruro de sodio (NaCl)	110.34
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0.906
D-Glucosa (Dextrosa)	25.00
Rojo fenol	0.039

Una vez disuelto el contenido de un sobre en 800 ml de agua desionizada se agregaron 3.7 g de bicarbonato de sodio, se ajustó el pH a 7.1 con HCl, se aforó a un litro y se esterilizó por filtración con filtro de nitrocelulosa de 0.22 µm (Milipore).

Antibióticos

Concentración de las soluciones madre de antibióticos

Ampicilina 50 mg/ml. Disuelta en agua desionizada. La solución se filtra a través de un filtro de 0.45 µm PTFE (socorex)

Ácido nalidíxico 5 mg/ml. Disuelto en agua desionizada. La solución se filtra a través de un filtro de 0.45 µm PTFE (socorex)

Estreptomina 10 mg/ml. Disuelta en agua desionizada. La solución se filtra a través de un filtro de 0.45 µm PTFE (socorex)

Cloranfenicol 25 mg/ml. Disuelto en metanol.

Soluciones

Acetato de sodio 3 M pH 5.3

Para 100 ml disolver 246.60 g de acetato de sodio en 80 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 5.3 con ácido acético puro. Después aforar a 100 ml

Bromuro de etidio (10 mg/ml) disuelto en amortiguador TAE

Cloruro de calcio (CaCl₂) 100mM

Para 500ml disolver 5.5 g de CaCl₂ en 500 ml de agua desionizada. Esterilizar en autoclave

EDTA 0.5 M pH 8.0

Disolver 187.12 g en 800 ml de agua desionizada ajustar el pH a 8.0 con Y aforar a 1 l

IPTG 100mM

Para 20 ml disolver 476 mg en 20 ml de agua desionizada y esterilizar por filtración utilizando un filtro de 0.45 µm PTFE (socorex)

Lisozima (5 mg/ml) disuelta en Tris 25 mM pH 8.0

Mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico

Para 200 ml

192 ml de cloroformo

8 ml de alcohol isoamílico

Mezcla lítica de tritón

Para 100 ml

3 ml de tritón al 10%

EDTA 0.25 M (37.5 ml de solución 0.5 M pH 8.0)

15 ml de Tris 1 M pH 8.0

Aforar a 100 ml con 44.5 ml de agua desionizada

Proteasa K (5mg/ml) disuelta en amortiguador A

RNAsa (10 mg/ml) disuelta en acetato de sodio 100 mM pH 5.0

Solución Timina-Tiamina

Para 100ml

Timina 0.4g

Tiamina (10mg/ml) 1ml

Tris 1 M pH 8.0

Disolver 121.1 g de tris en 800 ml de agua desionizada ajustar el pH a 8.0 con ácido clorhídrico y aforar a 1 l.

Tritón al 10%

Para 50 ml disolver 5 g de tritón en 50 ml de agua desionizada.

Amortiguadores

Amortiguador A

Tris 50 mM pH 8.0

EDTA 2mM pH 8.0

SDS al 5%

Amortiguador de sacarosa

Para 100 ml

25 g de sacarosa

50 mM de Tris (5 ml de solución 1 M de Tris pH 8.0)

0.2 mM de EDTA (200 µl de solución 0.5 M de EDTA pH 8.0)

Amortiguador salino fosfatado (PBS)

NaCl 8 g

Cloruro de potasio 0.2 g

Fosfato dibásico de sodio hidratado (Na_2HPO_4) 1.44 g

Fosfato de potasio monobásico hidratado (KH_2PO_4) 0.24 g

Se disuelven los compuestos en 800 ml de agua desionizada, se ajusta el pH a 7.4 con HCl, afora a 1 l y esterilice en autoclave a 120° C por 20 minutos.

Amortiguador salino de Tris (TBS)

Cloruro de sodio 8 g

Cloruro de potasio 0.2 g

Tris 3 g

Para 1 l se disuelven los compuestos en 800 ml de agua desionizada y se ajusta el pH a 7.4 con HCl afora a 1 l y esterilice en autoclave a 120° C por 20 minutos.

De corrida 4X para SDS PAGE para 50 ml

Tris 200 mM pH 6.8, 20 ml de la solución madre Tris 0.5 M

SDS al 8% ,4 g

Azul de bromofenol 0.4%, 200 mg

Glicerol al 40%, 20 ml

TAE

4.84 g de Tris (40 mM)

1.2% de ácido acético glacial

EDTA 1 mM pH 8.0

TE (10 mM de Tris 0.1 mM de EDTA pH 8.0)

TNI

20 mM de Tris pH 8.0

0.5 M de NaCl

Concentraciones de 5 mM hasta 600 mM de imidazol.

LITERATURA CITADA

- Aronheim, A. 2000. Protein recruitment systems for the analysis of protein–protein interactions. *Biochemical Pharmacology*. 60:1009–1013
- Abe, A., Matsuzawa, T. and Kuwae, A. 2005. Type-III effectors: Sophisticated bacterial virulence factors. *Comptes Rendus Biologies*. 328:413-428
- Akeda, Y. and Galán, J. 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature Letters*. 437(6):911-915
- Alper, J. 2003. Data gaps need bridging to assess infectious gastrointestinal diseases. *The New Magazine of the American Society for Microbiology*. 69(2):65-68
- Anderson, D. and Schneewind, O. 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Molecular Microbiology*. 31(4):1139–1148
- Backert, S. and Meyer, T. 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 9:207–217
- Baker, A. 2005. Foreword: Translocation of proteins across membranes: systems, conservation and evolutionary origin. *Molecular Membrane Biology*. 22(1-2):1-2
- Büttner, D. and Bonas, U. 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Current Opinion in Microbiology*. 9:193-200
- Caron, E., Crepin, V., Simpson, N., Knutton, S., Garmendia, J and Frankel, G. 2006. Subversion of actin dynamics by enteropathogenic *Escherichia coli* and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*. 9:40–45
- Chen, H. and Frankel, G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis *FEMS Microbiology Reviews*. 83-98
- Christie, P. and Cascales, E. 2005. Structural and dynamic properties of bacterial Type IV secretion systems. *Molecular Membrane Biology*. 22(1-2):51-61
- Clarke, S., Haigh, R., Freestone, P. and Williams, H. 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli* a global pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(3):365-378
- Colin, B. O., Creasey, E., Knutton, S., Elliott, S., Crowther, L. J., Luo, W., Albert, M. J., Kaper, J., Frankel, G. and Donnenberg, M. 2004. SepL, a protein required for enteropathogenic *Escherichia coli* type III translocation, interacts with secretion component SepD. *Molecular Microbiology*. 52(6):1613–1625
- Coria, L. J, Villalpando, C. S. y Gómez, B. D. 2002. Aspectos microbiológicos y epidemiológicos para el uso racional de antibióticos en niños con gastroenteritis bacteriana aguda. *Gaceta Mexicana de Pediatría*. 68(5):200-215.

- Corral-Terrazas y Martínez, M. H. 2002. Conocimientos de un grupo de médicos sobre el manejo de la alimentación del niño con diarrea aguda. *Salud Pública Mexicana*. 44:303-314
- Creasey, E., Delahay, R., Daniell, S. and Frankel, G. 2003a. Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*. 149: 2093-2106
- Creasey, E., Friedberg, D., Shaw, R., Umanski, T., Knutton, S., Rosenshine, I. and Frankel, G. 2003b. CesAB is an enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB. *Microbiology*. 149:3639–3647
- Crepin, V., Shaw, R., Abe, C., Knutton, S. and Frankel, G. 2005. Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. *Journal of Bacteriology*. 187(8):2881–2889
- Daniell, S., Delahay, R., Shaw, R., Hartland, E., Pallen, M., Booy, F., Ebel, F., Knutton, S. and Frankel, G. 2001a. Coiled-Coil Domain of enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis. *Infection and Immunity*. 69(6):4055–4064
- Daniell, S., Takahashi, N., Wilson, R., Rosenshine, I., Knutton, S., Frankel, G. and Aizawa, S. 2001b. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 3(12):865-871 4
- Daniell, S., Wilson, R., Knutton, S. and Frankel, G. 2001c. Role of EscF, a putative needle complex protein in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 3(11):753-762
- Delahay, R. and Frankel, G. 2002. Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Molecular Microbiology*. 45 (4):905-916
- Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B., Vázquez, J. B., Ibarra, J. A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T. and Finlay, B. 2004. Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA*. 101(10):3597–3602
- Deng, W., Li, Y., Hardwidge, P. R., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Lee, S., Gruenheid, S., Strynakda, N. C., Puente, J. L. and Finlay, B. 2005. Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infection and Immunity*. 73(4):2135–2146
- Edqvist, P., Bröms, J., Betts, H., Forsberg, A., Pallen, M. and Francis, M. 2006. Tetratricopeptide repeats in the type III secretion chaperone, LcrH: their role in substrate binding and secretion. *Molecular Microbiology*. 59(1):31-44

- Elliott, S., Wainwright, L., McDaniel, T., Jarvis, K., Deng, Y., Lai, L., McNamara, B., Donnenberg, M. and Kaper, J. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Molecular Microbiology*. 28(1):1-4
- Garmendia, J., Frankel, G. and Crepin, V. 2005 Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*. 73(5):2573-2585
- Gauthier, A. and Finlay, B. 2003. Translocated intimin, receptor and its chaperone interact with ATPase of Type III secretion apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 185 (23):6747-6755
- Ghosh, P. 2004. Process of protein transport by type III secretion system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(4):771-795
- González-Pedrajo, B. y Dreyfus, G. 2003. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico*. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. UNAM. XXVII:45-63
- Henderson, I., Navarro-García, F., Desvaux, M., Fernandez, R. and Aldeen, A. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter Story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(4):692-744
- Holland, T., Schmitt, L. and Young, J. 2005. Type I protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Molecular Membrane Biology*. 22(1-2): 29-39
- Hueck, C. 1998. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(2):379-433
- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberleithner, H. and Schmidt, A. 2001. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 3(10):669-679
- Journet, L., Hughes, K. and Cornelis, G. 2005 .Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence. *Molecular Membrane Biology*. 22 (1-2): 41-50
- Kaper, J., Nataro, J. and Mobley, L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2:123-140
- Karel, M. 2001. Translocation of proteins of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 25:437-454
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M. and Finlay, B. 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*. 167(7):2606-2612

- Lai, C., Wainwright, L., Stone, K. and Donnenberg, M. 1997. A Third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infection and Immunity*. 65(6):2211–2217
- Luo, W. and Donnenberg, M. 2006. Analysis of the function of enteropathogenic *Escherichia coli* EspB by random mutagenesis. *Infection and Immunity*. 74(2): 810-820
- Lupp, C. and Finlay, B. 2005. Intestinal microbiota. *Current Biology*. 15(7): R235 y R236
- Macnab, R. 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochemistry and Biophysics Acta*. Elsevier:207-214
- Minamino, T. and Macnab, R. 2000. Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Molecular Microbiology*. 35(5):1052-1064
- Mota, L. J., Sorg, I. and Cornelis, G. R. Type III secretion: The bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microbiology Letters*. 252: 1–10
- Neves, B., Mundy, R., Petrovska, L., Dougan, G., Knutton, S. and Frankel, G. 2003. CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD. *Infection and Immunity*. 71(4):2130-2141
- Neyt, C. and Cornelis, G. 1999. Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Molecular Microbiology*. 31(1):143-156
- Nunn, D. 1999. Bacterial Type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? *Trends in Cell Biology*. 9: 402-408
- Ogino, T., Ohno, R., Sekiya, K., Kuwae, A., Matsuzawa, T., Nonaka, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S. and Abe, A. 2006. Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 188(8):2801–2811
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S., Macnab, R. and Iino, T., 1994. FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 176(8):2272-2281
- Ohnishi, K., Schoenhals, G. J., Kihara, M and Macnab, R. 1997. The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: Putative components for flagellar assembly. 179(19): 6092–6099
- Parsot, C., Hamiaux, C. and Page, A. L. 2003. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology*. 7:7-14
- pET System Manual. 2003. 10^a Ed. Novagen, Merck Bioscience. USA.

- Remaut, H. and Waskman, G. 2004. Structural biology of bacterial pathogenesis Current Opinion in Structural Biology. Vol.14:161-170
- Sandner, L., Eguiarte, L., Navarro, A., Cravioto, A. and Souza, V. 2001. The elements of the locus of enterocyte effacement in human and wild isolates of *Escherichia coli*: evolution assemblage or disruption? Microbiology. 147:3149–3158
- Sandkvist, M. 2001. Type II Secretion and Pathogenesis. Infection and Immunity. 69(6):3523–3535
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C and Abe, A. 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA. 98(20):11638-11643
- Schoehn, G., Di Guilmi, A. M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W. and Dessen, A. 2003. Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. The EMBO Journal. 22(19):4957-4967
- Stephenson, K. 2005. Sec-dependent protein translocation across biological membranes: evolutionary conservation of an essential protein transport pathway. Molecular Membrane Biology. 22(1-2):17-28
- Tampakaki, A., Fadouloglou, V., Gazi, A., Panopoulos, J. y Kokkinidis, M. 2004. Conserved features of type III secretion. 6(9):805-816
- Terres. M. A. y Casas. T. L. 2002. Enfermedad diarreica en México. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 40(4):329-341
- Thanassi, D. y Hultgren, S. 2000, Multiple pathway allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Current Opinion in Cell Biology. 12:420-430
- Thanassi, D. y col. 2005. Protein secretion in absence of ATP the utotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of Gram-negative bacteria. Molecular Membrane Biology. 22(1-2):63-72
- Thomas, N., Deng, W., Puente, J., Frey, E., Yip, C., Strynadka, N. and Finlay, B. 2005. CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 57(6):1762–1779
- Tu, X., Nisan, R., Yona, C., Hanskiand, E. y Rosenshine, I., 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 47(3):595–606
- Velarde, J. y Nataro, J. 2004. Hydrophobic residues of the autotransporter EspP linker domain are important for outer membrane translocation of its passenger. The Journal of Biological Chemistry. 279(30):31495–31504

- Wainwright, L. y Kaper, J. 1998. EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 27(6):1247-1260
- Wilson, R. K., Shaw, R. K., Daniell, S., Knutton, S. and Frankel, G. 2001. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 3(11):753-762
- Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Finlay, B., Miller, S. I., and Strynadka, N. C. 2005. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature Letters*. 435(2):702-707
- Yu, J. and Fotouhi, F. 2006. Computational approaches for predicting protein–protein interactions: A survey. *Journal of Medical System*. 30(1):39–44