



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

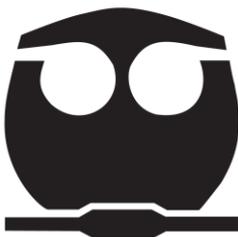
FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETECCIÓN DE RECEPTORES DE LA PROTEÍNA PET SECRETADA POR
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA UTILIZANDO EL MÉTODO DE
PHAGE DISPLAY”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA**

GABRIELA CORTÉS CHI



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Dr. Luciano Hernández Gómez Facultad de Química UNAM
Vocal:	Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova Facultad de Química UNAM
Secretario:	Dr. Ulises Hernández Chiñas Facultad de Medicina UNAM
1er. Suplente:	M. en C. Laura Carmona Salazar Facultad de Química UNAM
2º. Suplente:	Prof. Javier Fernández Torres Facultad de Química UNAM

El tema fue desarrollado en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, en la Unidad de Hemato-Oncología e Investigación, Hospital Infantil de México Federico Gómez Departamento de Salud Pública Facultad de Medicina, UNAM.

**Dr. Ulises Hernández Chiñas
Asesor del tema**

**Dr. Carlos Alberto Eslava Campos
Supervisor técnico**

**Gabriela Cortés Chi
Sustentante**

RESUMEN

Escherichia coli Enteroagregativa (EAEC), es un patógeno intestinal que se caracteriza por su capacidad para adherirse a células en cultivo en un fenotipo definido como de “ladrillos apilados”. EAEC se relaciona con brotes de diarrea aguda y con cuadros de diarrea persistente en niños de países desarrollados y en desarrollo. La toxina Pet (Plasmid-encoded toxin) es liberada por la bacteria utilizando el sistema de secreción tipo V, se considera como uno de los factores de virulencia de la bacteria e induce daño en las células epiteliales del intestino. Pet es una proteína de alto peso molecular (104 kDa), se incluye en la subfamilia de las SPATEs (Serina Proteasas Autotransportadas de la familia Enterobactereace). Es una toxina que induce efectos citopáticos y citotóxicos por efecto sobre su sustrato natural la espectrina (eritrocitos) y fodrina (células nucleadas). El efecto de degradación que ocasiona Pet sobre ambas proteínas del citoesqueleto, está asociado con el motivo GDSGS que es conservado en la familia de las SPATE´s. El efecto de la toxina se inicia con el reconocimiento de un receptor presente en las células y la internalización posterior de la proteína a través de un transporte retrógrado. En este trabajo utilizando el método de Phage Display se identificó el motivo L/VHDL/FLP, al hacer el blast de este, se encontró identidad con la Citoqueratina 8 que en fechas recientes se propuso como el receptor celular de Pet. Los resultados obtenidos plantean que la secuencia identificada, es el sitio específico de unión de la toxina a la Citoqueratina 8. Tal hecho permite plantear el empleo de un péptido sintético para bloquear el receptor de la toxina, y de esta forma interferir con los efectos citopáticos y citotóxicos inducidos por Pet en células epiteliales.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVO GENERAL.....	18
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
6. METODOLOGÍA	
6.1. Obtención de Proteínas.....	19
6.2. Purificación de la Proteína.....	20
6.3. Bioselección.....	21
6.4. Titulación de fagos.....	23
6.5. Selección de las clonas.....	24
6.6. Extracción del ssDNA.....	25
6.7. Secuenciación de Aminoácidos de las clonas.....	25
6.8. Obtención de Anticuerpos.....	26
6.9. Reactividad del Suero de Conejo.....	27
6.10. Obtención de proteínas de membrana.....	28
6.11. Ensayo de ELISA.....	28
7. RESULTADOS	
7.1. Obtención y purificación de PetS260I.....	29
7.2. Selección de fagos con afinidad a Pet.....	30
7.3. ssDNA obtenido de las clonas seleccionadas.....	31
7.4. Obtención y análisis de las secuencias de los péptidos expresados por los fagos seleccionados.....	32
7.5. Antigenicidad del motivo L/VHDL/FLP.....	35
7.6. Reactividad de los anticuerpos anti fagótopo vs proteínas de membrana.....	36
7.7. Alineación del motivo conservado de la citoqueratina-8 ⁶⁸ NQSLLSPL con la secuencia de clonas obtenidas.....	37
8. DISCUSIÓN.....	39
9. CONCLUSIONES.....	46
10. APÉNDICES	
10.1. Abreviaturas.....	47
10.2. Medios y soluciones.....	48
11. REFERENCIAS.....	55

1. INTRODUCCIÓN

***Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)**

Escherichia coli Enteroagregativa, es reconocido a nivel mundial como un patógeno emergente asociado con infecciones entéricas. Es responsable de diarrea pediátrica, de la llamada del viajero, diarrea persistente, además, es un importante agente etiológico de cuadros de diarrea en pacientes con VIH y de brotes de diarrea asociada con la ingestión de comida o agua contaminada. Las cepas de EAEC son identificadas por su habilidad para adherirse a células HEp-2 cultivadas, en un patrón llamado de adherencia agregativa (AA) en forma de “ladrillos apilados” (Kaur y Asea 2010, Navarro-García y Elías 2011).

La patogénesis de EAEC, aunque no está completamente elucidada presenta tres características; (1) adherencia abundante a la mucosa intestinal, (2) inducción de la inflamación de la mucosa y (3) elaboración de enterotoxinas y citotoxinas (Navarro-García y Elías 2011).

La adherencia a la mucosa está caracterizada por la formación de una estructura tipo biofilm, este se encuentra compuesto por agregados de bacteria en asociación con una capa delgada de moco (Nataro y cols. 1996). La adherencia abundante está asociada con la presencia de adhesinas de naturaleza fimbrial y afimbrial. Las adhesinas afimbriales o proteínas de membrana externa, se han encontrado en diferentes de cepas EAEC, mostrando la heterogeneidad de las estructuras adhesivas (Suzart y cols. 2001). Las fimbrias mejor caracterizadas son las Fimbrias de Adherencia

Agregativa (AAF's) descritas como tipos I, II y III (Bernier y cols. 2002, Czeczulin y cols. 1997, Nataro y cols. 1992).

La inflamación de la mucosa se debe a la respuesta del huésped ante la infección por EAEC por efecto del sistema inmune innato del huésped. La IL-8 es una quimiocina pro-inflamatoria importante en la patogénesis de EAEC, ésta quimiocina es responsable de reclutar neutrófilos a la mucosa epitelial sin necesidad de una lesión y facilita la secreción de fluido intestinal (Kucharzik y cols. 2005, Sansonetti y cols. 1999).

Con respecto a la elaboración de enterotoxinas y citotoxinas, su expresión está relacionada con genes presentes en el cromosoma y en plásmidos de la bacteria. El plásmido llamado pAA, contiene los genes que codifican para la enterotoxina termoestable EAST-1 y algunas de las llamadas Serina Proteasas Autotransportadas de la familia Enterobacteriaceae (SPATE's). Pet (plasmid-encoded toxin) integrante de este grupo de toxinas está codificada en el plásmido (Eslava y cols. 1998), mientras que Pic (mucinasas) y Shet1 (enterotoxina) son codificadas en por genes presentes en el ADN cromosomal (Savarino y cols. 1993, Herdenson y cols. 1999). Estas toxinas son responsables de los efectos enterotóxicos o citotóxicos observados durante la infección por EAEC (Fig 1).

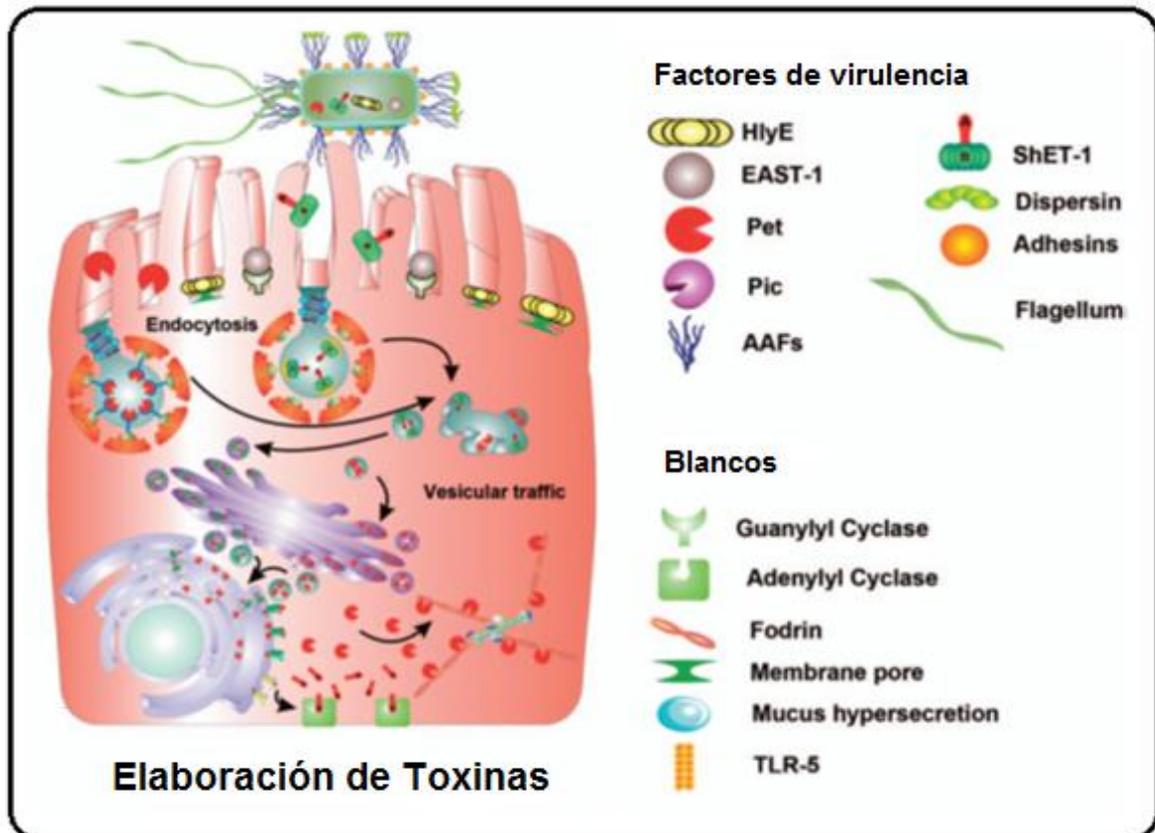


Figura 1. Esquema de elaboración de toxinas, una de las características de la patogénesis de EAEC. (Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*, Navarro-García *et al.* 2011).

Serina Proteasas Autotransportadas

Las SPATE's son proteínas elaboradas por diferentes integrantes de la familia enterobacteriaceae entre las que se incluyen *Shigella* y los diferentes patotipos de *E. coli* (Riuz-Pérez y Nataro 2013). Se han definido como factores de virulencia de estas bacterias y participan de manera importante en la patogénesis de las diferentes alteraciones que ocasiona EAEC (Henderson y Nataro 2001).

La estructura general de las SPATE's está conformada por tres dominios funcionales; el primero es el péptido señal (48-59 aa), este contribuye a la translocación de la proteína al espacio periplásmico a través de la membrana interna; el segundo es el llamado dominio pasajero N-terminal, en este se encuentran los motivos implicados en la función biológica de la toxina. Finalmente el último dominio llamado β -barril o translocón contribuye a la liberación de la proteína al medio externo, en este evento el dominio pasajero pasa a través de un poro que se forma en la membrana externa (Ruiz-Pérez y Nataro 2013).

El sitio de corte entre el dominio pasajero y el translocón se encuentra ubicado entre dos asparaginas (N-N), en el dominio pasajero se encuentra el motivo **GDSGS** característico de las SPATE's, en este se localiza la serina catalítica (Figura 2), que junto con la histidina y asparagina forman la triada catalítica His, Asp y Ser (Hernández-Chiñas *etal.* 2009) .

Estas proteínas son secretadas a través del Sistema de Secreción tipo V, para ello, la translocación de las SPATE's al espacio periplásmico ocurre después del reconocimiento del péptido señal por un conjunto de proteínas localizada en la membrana interna, llamado aparato de secreción Sec. La extensión del péptido señal en la membrana interna previene el doblamiento en el espacio periplásmico, lo que podría interferir en el subsecuente transporte a través de la membrana externa.

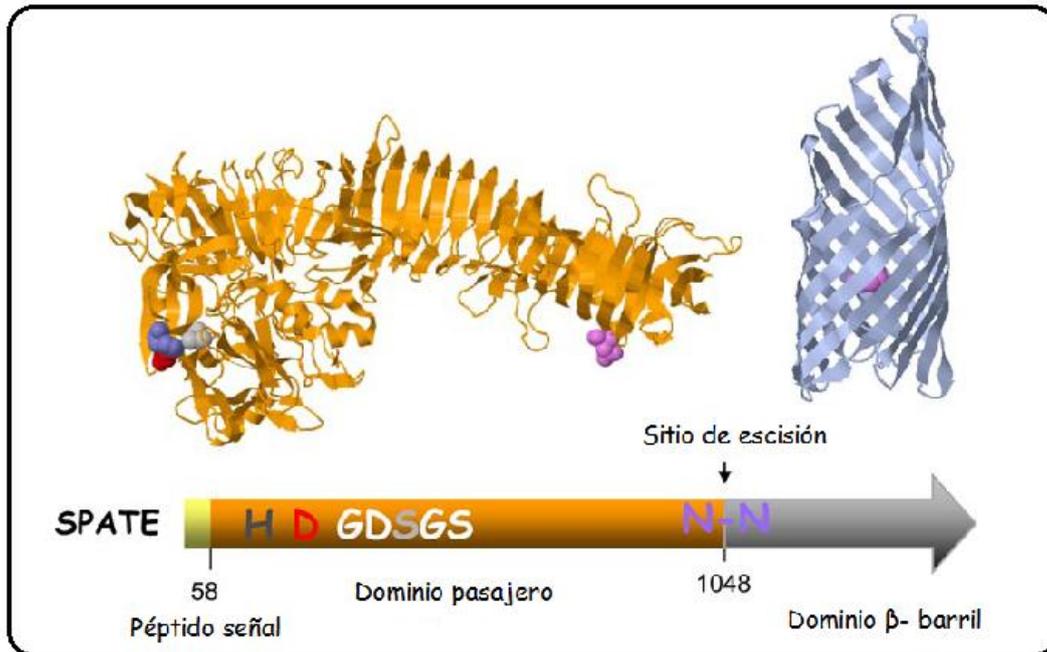


Figura 2. Modelo de una Serina Proteasa Autotransportada de la familia Enterobacteriaceae (SPATE). En este se muestra que en el dominio pasajero se encuentra el sitio catalítico GDSGS y la triada catalítica formada por una histidina, ácido aspártico y serina. Además se observa que en el sitio de ruptura se encuentran dos asparaginas juntas N-N. En la parte superior se encuentra la estructura tridimensional de las SPATE's. (Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence Ruiz-Perez F, Nataro JP. 2013).

Después de la translocación, el péptido señal es anclado y la proteína madura es transportada al espacio periplásmico, donde el dominio pasajero se encuentra en una conformación parcialmente plegada antes de ser secretada a través de la membrana externa (Figura 3). La región carboxilo terminal es plegada en el espacio periplásmico y embebida en la membrana externa para obtener una conformación de β -barril y así permitir que la toxina sea liberada (Riuz-Pérez y Nataro 2013).

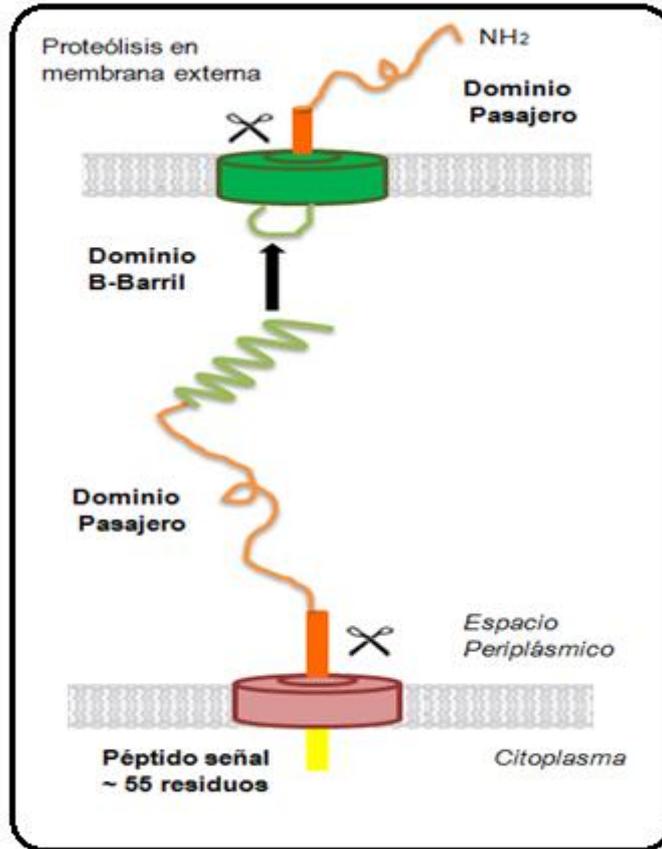


Figura 3. Modelo del Sistema de secreción Tipo V. El Dominio Pasajero es transportado al espacio periplásmico después del reconocimiento del péptido señal (color amarillo) por el aparato de secreción Sec (color rojo), posteriormente con ayuda de Chaperonas se lleva a cabo el ensamblaje del β -Barril (color verde) en la membrana externa, permitiendo la liberación de la Toxina (Dominio Pasajero en color naranja) al medio.

Pet (Plasmid-encoded toxin)

Pet, es una proteína de alto peso molecular (104 kD) caracterizada por Eslava y cols. (1998), a partir del sobrenadante del cultivo de la cepa EAEC O42, aislada de un niño con diarrea de Perú. La proteína Pet purificada, tiene efecto citotóxico y citopático sobre células en cultivo (Eslava y cols. 1998). Estos

efectos se observan después de dos horas de exposición y el daño celular es irreversible (Navarro-García y cols. 2001).

El efecto observado es asociado a la ruptura de espectrina o fodrina, esta degradación se confiere al motivo de serina proteasa (GDSGS) de la toxina Pet (Villaseca y cols. 2000). Éste motivo está involucrado en la inducción de daño al citoesqueleto, sin embargo, el motivo de serina proteasa no es necesario para la secreción de Pet ni para su internalización en la célula hospedera.

La internalización de Pet es necesaria para la inducción de efectos citopáticos (Navarro-García y cols. 2001). Pet se internaliza vía endocitosis mediada por clatrina, aunque, no es una toxina de tipo AB estudios realizados al respecto con la toxina, sugieren que puede seguir el mismo camino que una toxina AB. Se ha identificado que pasa de la superficie celular al aparato de Golgi, posteriormente, al retículo endoplásmico y por último al citosol.

Navarro-García y cols. (2007) describen una serie de pasos en los cuales se lleva a cabo la internalización de Pet; primero se da la unión a la superficie celular para después internalizarse a la célula por medio de un mecanismo de endocitosis dependiente de clatrina; se ha demostrado que la endocitosis mediada por clatrina es el mecanismo esencial por el cual Pet es internalizada. La mayoría de las toxinas bacterianas son endocitadas por vesículas cubiertas de clatrina (Navarro-García et al. 2007). Luego, estos endosomas tempranos son transportados al aparato de Golgi y finalmente mediante un transporte retrógrado Pet es llevada del aparato de Golgi al retículo endoplásmico (Figura 4). En este sitio antes de moverse al citosol como una proteína de 104 kD, se asocia con el translocón Sec61 (Navarro-García y cols 2007).

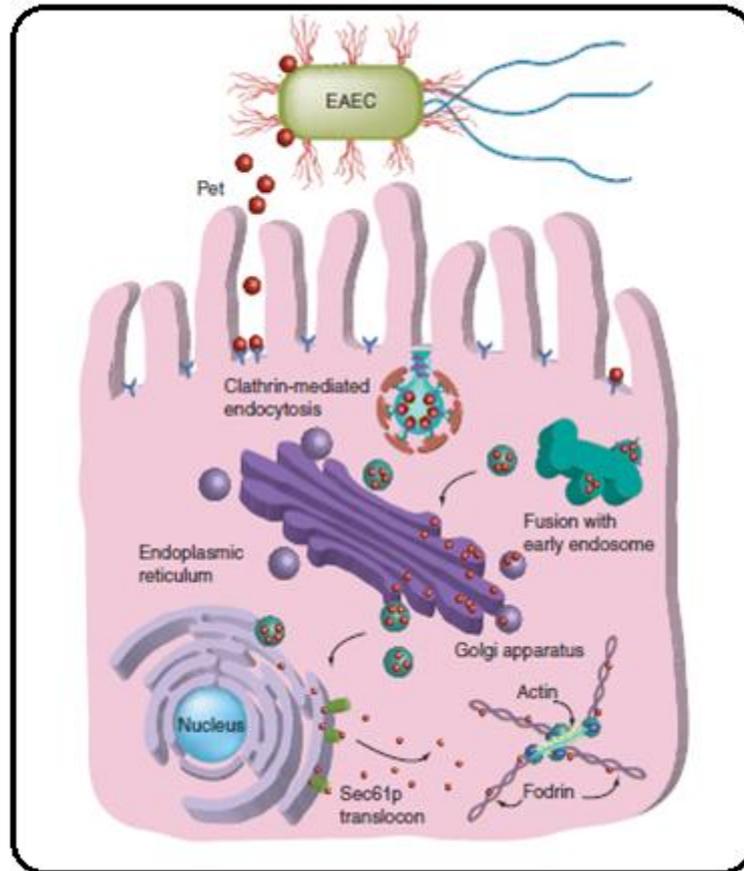


Figura 4. Internalización de Pet a las células epiteliales. Este se lleva a cabo a través de un transporte retrógrado, primero la toxina es internalizada por medio de endocitosis mediada por clatrina, posteriormente el endosoma viaja hacia el Aparato de Golgi y al Retículo Endoplásmico donde se asocia con el translocon Sec61p para finalmente ser liberada al citosol y así llegar a su sustrato. (**Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli***. Navarro-García F, Elias WP. Gut Microbes. 2011).

Un hecho importante es que Pet debe interactuar con la superficie celular antes de ser endocitada, lo anterior sugiere que existe un receptor específico reconocido por Pet (Navarro-García et al. 2007). Se han reportado diversos métodos para la identificación de receptores celulares, uno de ellos es el llamado Phage Display ampliamente utilizado para la identificación de epítomos inmunodominantes (Hartley 2002).

Phage Display

Phage Display, es la presentación de polipéptidos desplegados en la superficie de bacteriófagos filamentosos (M13) que provienen de bibliotecas de proteínas de unión “sintéticas” (Sidhu y Koide 2007).

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

Bacteriofago M13

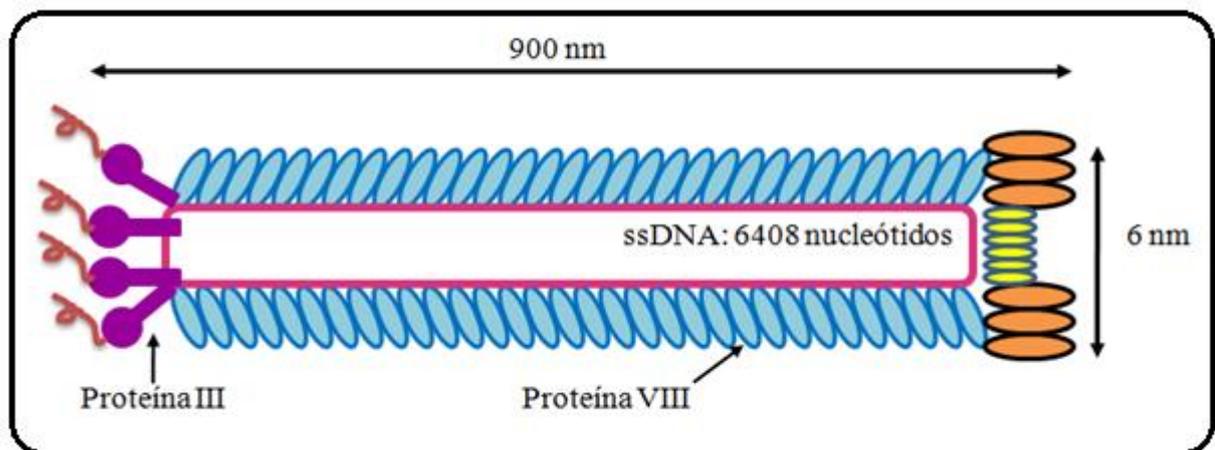


Figura 5. Modelo del Bacteriófago M13, en el cual se observan sus proteínas principales: la proteína VIII que se encuentra empaquetando el DNA y la proteína III a la que se unen aminoácidos que generarán péptidos.

El bacteriófago M13 es el comúnmente usado para la técnica de Phage Display. Pertenece al género Inovirus, mide aproximadamente 6.5 nm de diámetro y 930 nm de longitud, ésta constituido en un 87% de proteína. Su genoma está constituido por una molécula de ADN de cadena sencilla (ssDNA), cerrado covalentemente, conformado por 6400 nucleótidos. El ADN del fago se encuentra empaquetado por la proteína VIII (Fig.5), la principal proteína de la envoltura del fago (Santamaría 2003).

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

Biblioteca de Péptidos al Azar (RPLs)

La mayoría de las bibliotecas que existen en el mercado son de naturaleza universal, éstas pueden ser utilizadas para el mapeo de epítomos con los que se pueden seleccionar sitios inmunodominantes de proteínas, carbohidratos e incluso lípidos, por lo que su aplicación es muy amplia (Wang y Yu 2004). Estas librerías además se pueden utilizar para la selección de agonistas y antagonistas, para identificar sustratos o inhibidores de enzimas, para el análisis de interacción proteína-proteína, así como en el diseño de anticuerpos catalíticos e incluso el desarrollo de vacunas (Bradkovic y cols. 2010). El tipo más común de bibliotecas utilizadas para Phage Display son las RPLs (Random Peptide Libraries) en las que el número de aminoácidos de los

péptidos fusionados al fago son variables (de 6 hasta 43 aa) y esto depende del número de oligonucleótidos constituidos por residuos al azar (X) codificado por un codón degenerado NNK o NNS (N=A, C, G o T; K= G o T; S= G o C), esto es para reducir la formación del codón de paro. En una biblioteca de seis aminoácidos (X^6) son 64 millones de secuencias peptídicas diferentes codificadas por 1 billón de secuencias específicas NNK (Wang y Yu 2004). La complejidad de la biblioteca está restringida a aproximadamente de 10^9 a 10^{10} aminoácidos, principalmente por la limitada capacidad de transformación en *E. coli*. Los RPLs de péptidos largos en general son utilizados para el mimetismo de epítomos estructurales y los más cortos para formas no estructurales. En el caso de los péptidos cortos se han introducido modificaciones como es el añadir cisteínas en los extremos, esto con el propósito de que se forme un asa (loop) que permite mimetizar epítomos estructurales (Hansson *et al.* 1999).

Bioselección.

El proceso de bioselección consiste en recubrir la superficie de una fase sólida con la molécula blanco, que es posteriormente incubada con los fagos de la biblioteca, lo que permite la unión de los péptidos con mayor afinidad. Para remover los fagos que no se unieron se requiere un lavado en el cual la astringencia puede ser controlada. Finalmente se lleva a cabo un paso de elución, ya sea por digestión enzimática o por variación de pH. Los fagos eluidos son amplificados por infección de *Escherichia coli*, y son usados en una ronda subsecuente, usualmente, se realizan de 4 a 6 rondas de selección (Fig 6).

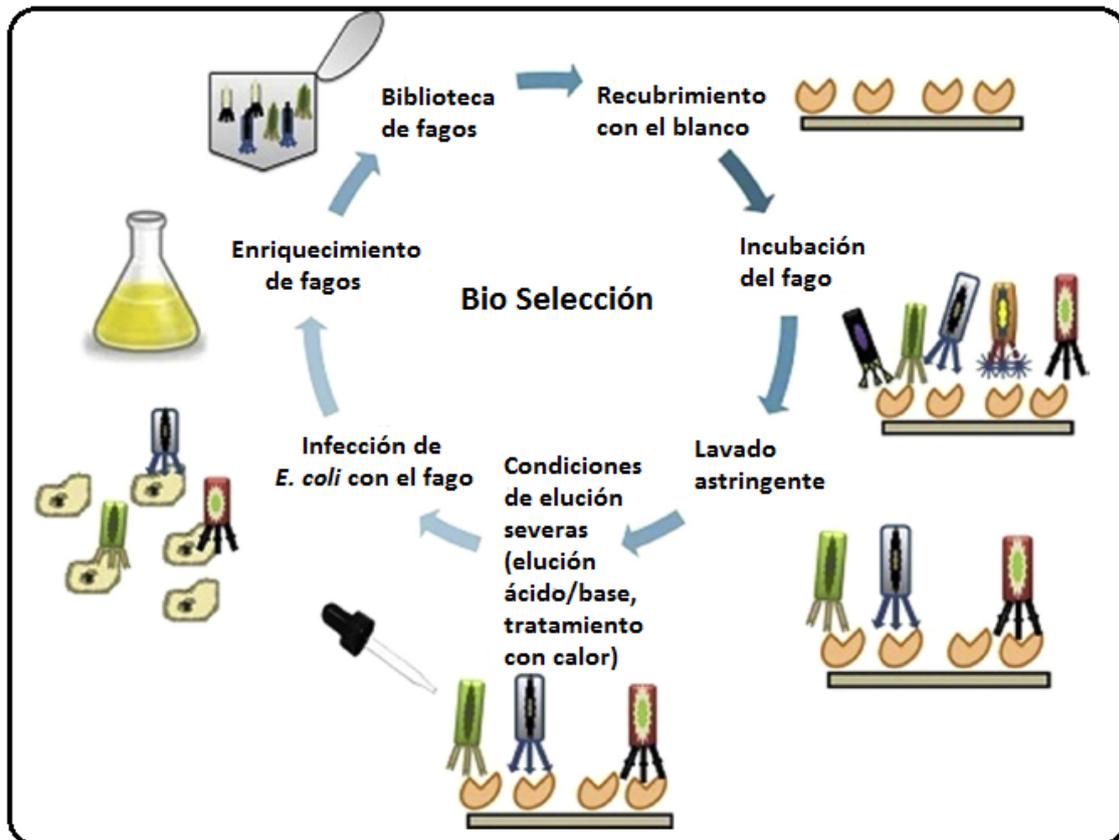


Figura 6. Proceso de bioselección realizado con el método de Phage Display (Phage display antibodies for diagnostic application, Hairul Bahara *et al.* 2013).

Phage Display en la búsqueda de receptores

La tecnología de Phage Display presenta medios rápidos por los cuales proteínas y péptidos que se unen específicamente a blancos moleculares predefinidos, pueden ser aislados de bibliotecas realmente complejas. Esta técnica puede ser aplicada para la identificación y caracterización de receptores cuya expresión es específica, ya sea de una línea celular o de un tejido. También es posible aplicar Phage Display para presentar ligandos huérfanos con sus receptores, así como para identificar proteínas y péptidos que modulan la actividad de receptores (Hartley 2002).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Escherichia coli Enteroagregativa (EAEC), es un importante patógeno entérico en países desarrollados y no desarrollados, uno de sus factores de virulencia es la liberación de toxinas entre las que se encuentra Pet. Es bien conocido que ésta proteína es internalizada por medio de endocitosis mediada por clatrina, transportada por una vía retrógrada y finalmente liberada al citosol para llegar a su sustrato, la fodrina. Es bien sabido que el mecanismo de endocitosis mediada por clatrina está mediada por un receptor, la interacción ligando-receptor es un requisito para la formación de las vesículas recubiertas de clatrina. Lo antes expuesto sugiere que debe existir un receptor específico reconocido por Pet, para que posteriormente se realicen los eventos de endocitosis y transporte de la proteína.

Por tal motivo, se vuelve relevante buscar e identificar el receptor de Pet y en particular el motivo asociado a la interacción proteína-proteína, para plantear el desarrollo de estrategias que faciliten su neutralización y así evitar que la toxina sea internalizada y pueda causar los efectos citopáticos y citotóxicos sobre células epiteliales del intestino.

3. HIPÓTESIS

- Utilizando el método de Phage Display, será posible identificar una secuencia consenso que forma parte del receptor celular de la proteína Pet integrante de la familia de las SPATE's

4. OBJETIVO GENERAL

- Obtener péptidos mediante el método de Phage Display que mimeticen posibles receptores celulares de la toxina Pet.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener y purificar la proteína Pet a partir de la clona S2601
- Realizar la bioselección de fagos con afinidad a la proteína Pet.
- Obtener anticuerpos contra fagos previamente seleccionados.
- Extraer proteínas de membrana externa de células HEP-2.
- Evaluar la reactividad de los anticuerpos anti fagos obtenidos con las proteínas de membrana externa de células HEP-2.
-

6. METODOLOGÍA

6.1. Obtención de Proteínas.

Para realizar este estudio se utilizó la clona de *E. coli* CEFN2 (HB101petS260I) la cual está mutada en el sitio catalítico serina 260, se sabe que este sitio catalítico no está involucrado en la internalización de la proteína, por lo que no interfiere con los fines de esta investigación. Ésta clona fue cultivada en una placa de medio Luria (LB) con ampicilina (100 µg/mL), incubada durante 24 hrs a 37°C, una vez obtenido crecimiento en las placas, se transfirió un inóculo a tubos con 3 mL caldo Luria con ampicilina (100 µg/mL), incubando 4hrs a 37°C en agitación continua (200 rpm). Transcurrido este tiempo, se transfirió un inóculo de 1 mL (0.1%) a matraces con 1L de caldo Luria con ampicilina a la misma concentración, incubando 18 hrs a 37°C con agitación continua (200 rpm).

Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 12 000g (Sorvall RC), por 20 min a 4°C, el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 60% (361 g de sal/litro), dejando en reposo la solución a 4 °C toda la noche. Posteriormente la solución se centrifugó a 12 000g (Sorval RC), 20 min, 4°C para obtener las proteínas totales, el precipitado se suspendió en 4 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.02M, pH 8.2, el excedente de sal fue eliminada por diálisis con la misma solución, por 2 días (4 recambios). Las proteínas obtenidas fueron concentradas, con unidades de filtración centrifugables con un punto de corte de 50 kDa (Millipore), utilizando una fuerza centrifuga de 3000 g (Sorvall RC) durante 15 min, 4°C, la muestra retenida por la membrana se transfirió a microtubos manteniendo las muestras a -20°C.

6.2. Purificación de la proteína.

Se realizó la purificación de Pet de acuerdo al protocolo descrito por Villaseca y cols. (2000). Brevemente, las proteínas se pasaron por una columna de intercambio iónico utilizando una resina de Q-sefarosa (Pharmacia), como buffer A se utilizó Tris (0.01M) y EDTA (0.05 M) pH 6.5, y como buffer B se utilizó NaCl 0.5M. El Pico I de la cromatografía en Q-sefarosa se sometió a una separación por cromatografía utilizando una resina con un intercambiador catiónico (Mono S), bajo una presión moderada y un flujo rápido (FPLC), utilizando los mismos buffer A y B antes mencionados. El perfil de cromatografía se determinó por el método de Bradford.

Electroforesis (SDS-PAGE). Para evaluar la presencia de la proteína en el proceso de purificación, se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8%, en condiciones desnaturizantes, con 0.1% (p/v) de dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE), en presencia de β -mercaptoetanol (Leammli, et al 1970). Con medidas de 6.5cm x 8.5 cm y 1mm de grosor, la separación de las proteínas se llevó a cabo con buffer de corrida, aplicando voltaje de 120 V, (voltaje constante). Posteriormente el gel se tiñó con Azul de Comassie Bio-Rad, USA) por 15 min, y fue desteñido con solución de metanol/ácido acético 30%/10%.

El perfil electroforético fue comparado con pesos moleculares de proteínas conocidas. (Page RulerTM Plus prestained protein ladder, Fermentas[®], USA)

6.3. Bioselección.

Para la Bioselección, se empleó una biblioteca de péptidos lineales de 12 aminoácidos (Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit. New England® BioLabs Inc. [Beverly, MA, USA]). Las secuencias de péptidos desplegadas al azar (2.7×10^9 transfectantes), están fusionadas a la proteína PIII del fago filamentoso M13 a través de un espaciador con los aminoácidos Gly-Gly-Gly-Ser.

El procedimiento de bioselección (Fig. 7) se llevó a cabo con base en el método descrito por Smith y Scott (1993): En un pozo de una microplaca de poliestireno (MaxiSoport) de 96 pozos, se colocaron 100 μ L de PetS260I (50 μ g/mL) en 0.1M NaHCO₃ (pH 8.6). La placa se cubrió y se colocó en una cámara húmeda para incubar toda la noche a 4°C con agitación suave. Posteriormente, se realizaron 6 lavados con PBS-T (0.1%, v/v) para eliminar la proteína que no se adhirió al pozo de la placa, se adicionaron 300 μ L de Buffer de Bloqueo (PBS-1% BSA) y se incubó 1h a 4°C sin agitación. Finalmente, la solución de bloqueo se descartó y se realizaron 6 lavados con PBS-Tween 0.1% (V/V).

Para la bioselección, se agregó a un pozo 2×10^{11} unidades formadoras de placa (ufp) en 100 μ L de PBS-T de la biblioteca de fagos Ph- 12, la placa se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Para eliminar los fagos que no se unieron, se realizaron 10 lavados a los pozos con PBS-T (0.1%, v/v).

La elución de los fagos unidos a la proteína se llevó a cabo adicionando 100 μ L de Buffer de Elución (glicina-HCl 0.1N pH 2.2). Los fagos eluidos se transfirieron a un microtubo de 600 μ L, neutralizando la muestra con 15 μ L de 2

M de Tris-base. Para continuar con la segunda ronda, el eluato obtenido se amplificó de acuerdo al Manual Ph.D.-12™ de New England BioLabs; 70 µL del eluato se agregaron a 20 mL del cultivo de *E. coli* ER2738 (en fase log temprana) y se incubaron a 37 °C con agitación vigorosa por 4.5 horas. Después de este tiempo el cultivo se centrifugó 2 veces durante 10 minutos a 6,000 g a 4 °C (Sorvall RC). Todo el sobrenadante se transfirió a un tubo con ¼ de volumen de PEG-NaCl (Polietilenglicol 20 % - NaCl 2.5 M); se agitó y se dejó precipitar a 4 °C durante toda la noche.

El precipitado obtenido se centrifugó durante 10 minutos a 6,000 g, el sobrenadante se eliminó y el botón se resuspendió en 1 ml de PBS para realizar una segunda centrifugación. El nuevo sobrenadante se precipitó nuevamente utilizando ¼ de volumen de PEG-NaCl, después de mezclarlo se dejó precipitar en hielo durante una hora a 4 °C, nuevamente se realizó una centrifugación con las mismas condiciones antes referidas, finalmente se suspendió el botón obtenido en PBS y se almacenó a 4 °C.

Para eliminar las clonas de fagos con afinidad al BSA utilizada en la solución de bloqueo, se decidió realizar una selección negativa antes de realizar la segunda ronda, para lo cual 10^9 - 10^{11} u.f.p de la amplificación de la primera ronda se puso en contacto con 200 µL (5mg/mL) de BSA por 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente los fagos que no se unieron al BSA se transfirieron a otro pozo cubierto con la proteína PetS260I (50µg/mL) y bloqueado con BSA. En la tercera y cuarta ronda se realizó el mismo

procedimiento que en la primera ronda, en éstas dos últimas se incremento la astringencia, realizando los lavados con Tween 20 (5%) en PBS (Fig. 7).

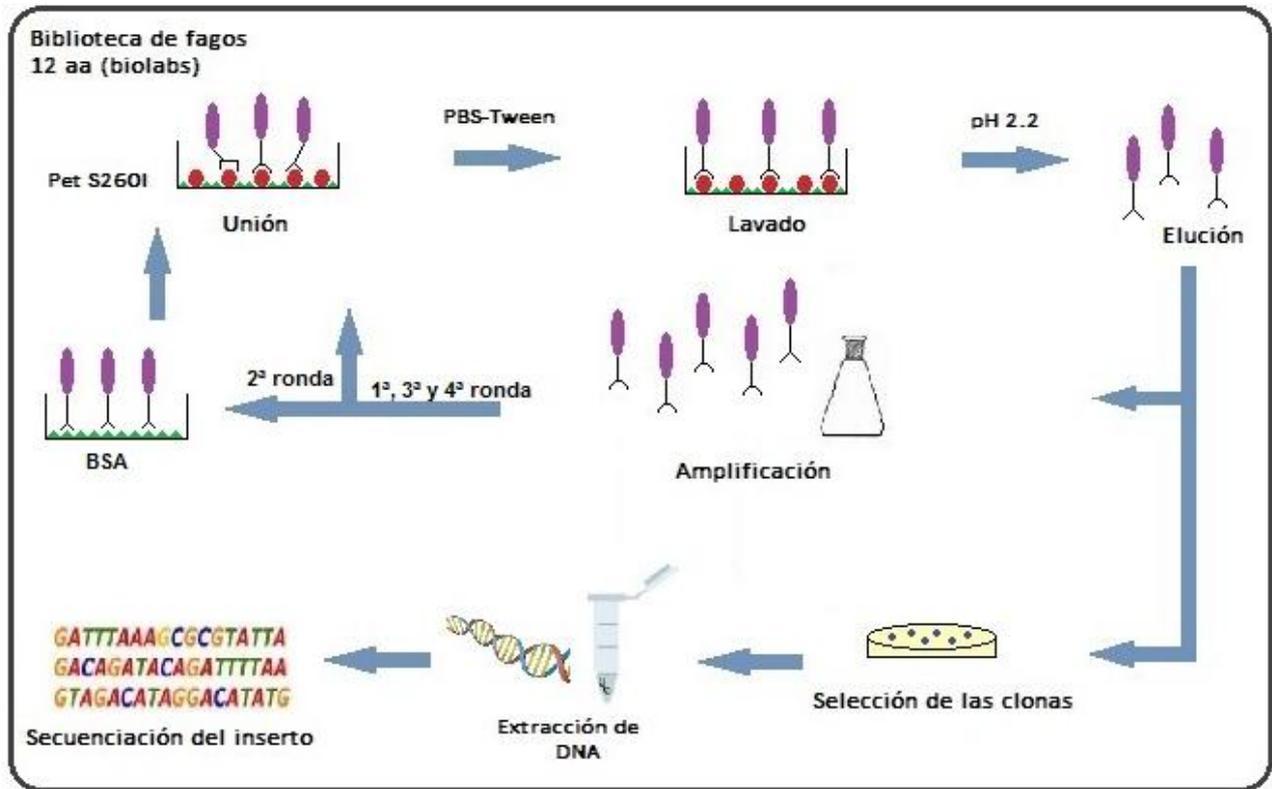


Figura 7 Biopanning en Phage Display. Esquema que ejemplifica la bioselección, en la cual la toxina Pet es inmovilizada en una superficie, después de la adición e interacción con la Librería de Péptidos se realizan lavados para remover los fagos que no se unieron a la IgG, seguido de la elución de los fagos que expresan una secuencia inmunodominante y su amplificación. Este procedimiento se realiza 3 o 4 veces (rondas) para aumentar la especificidad de las clonas, posteriormente se seleccionan clonas individuales, para conocer su secuencia de aminoácidos a través de la secuencia de ssDNA del fago.

6.4. Titulación de fagos.

Para conocer el número de fagos de la biblioteca de fagos y de los eluidos en cada ronda de bioselección, se llevó a cabo la infección de la cepa *E. coli* E2738 (200 µL del cultivo) con 10µL del eluato a diferentes diluciones, la mezcla se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. A

continuación se transfirieron las células infectadas a tubos de cultivo con agarosa top a 45°C mezclando por inversión e inmediatamente se vaciaron sobre las placas de LB/IPTG/Xgal (Fig. 8). Solidificada la agarosa Top, se invirtieron las cajas y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente se contó el número de unidades formadoras de placa (ufc), este valor se multiplicó por el factor de dilución.

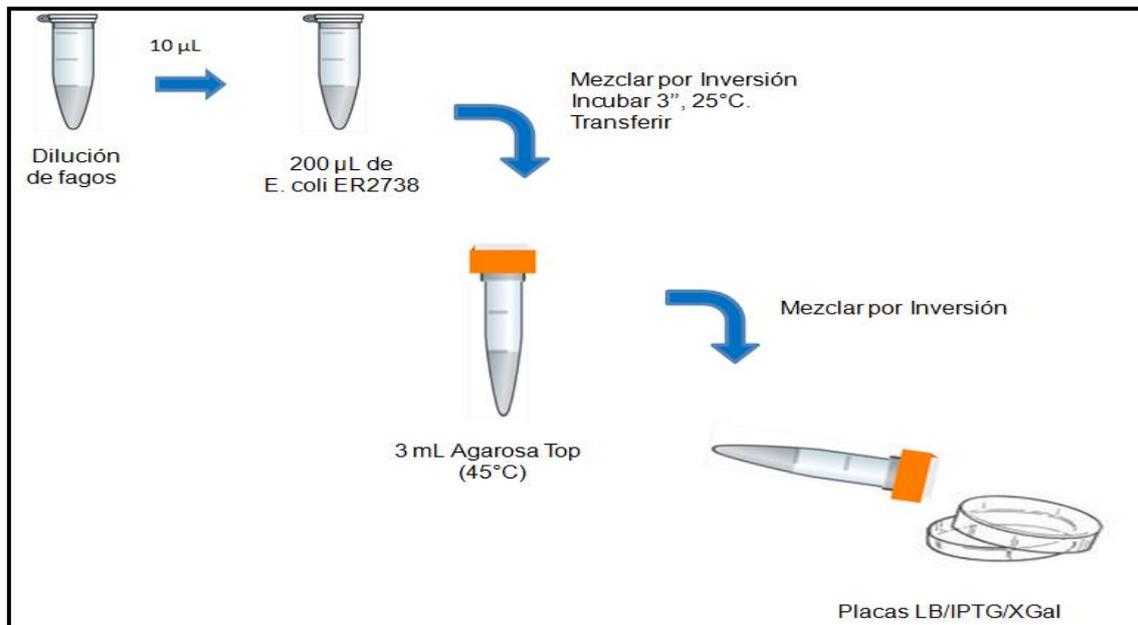


Figura. 8. Titulación de fagos. Los fagos M13 de la biblioteca (New England Bio Labs) se amplificó utilizando la *E. coli* ER2738, y el número de unidades formadoras de placas se pudo visualizar sobre una placa de agarosa Top/LB.

6.5. Selección de las clonas.

Los fagos obtenidos en la cuarta ronda se cuantificaron por titulación. De este cultivo se seleccionaron al azar 18 ufp, con una punta estéril para micropipeta de 200 μ L. Cada placa se colocó en un tubo con 3 mL de medio 2xYT, y 50 μ L de cultivo en fase Log de la cepa *E. coli* 2738. Incubando 4.5 h a 37°C y agitación constante (200 rpm). El cultivo se transfirió a microtubos de 1.6 mL y se centrifugó 30 s a 14 000 g, el sobrenadante obtenido se transfirió a dos

tubos, el primero, se empleó para almacenar los fagos; el segundo para extraer el ssDNA de las clonas seleccionadas.

6.6. Extracción del ssDNA.

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

6.7. Secuenciación de Nucleótidos de las clonas.

El ssDNA de las 18 clonas seleccionadas al azar, se envió al Laboratorio de Análisis y Química del ADN en la Unidad UBIPRO de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México, para el servicio de secuenciación y análisis del ssDNA. De manera general, para la obtención de la secuencia de nucleótidos, a las muestras se les realizó la reacción de secuencia con química BigDye V3.1, la purificación del producto se

llevó a cabo con columnas centri-sep y la lectura de la secuencia se realizó por electroforesis en secuenciador automático de capilares 3100 Genetic Analyzer. Estas secuencias se tradujeron a secuencia de aminoácidos mediante una tabla del código genético.

6.8. Obtención de Anticuerpos.

Antes de iniciar con el esquema de inmunización se tomó una muestra de sangre de 1.5 mL de la vena marginal de la oreja del conejo, para obtener el suero preinmune. Se realizó la inmunización de un conejo Nueva Zelanda (Bioterio CINVESTAV, IPN) de ~2.5 Kg, administrando 4 dosis del inmunógeno (fagos seleccionados que contienen el péptido con la secuencia consenso FTLHDLLPQPAF) según el protocolo descrito por Galfre y cols. (1996) (Tabla 1).

En cada inmunización se utilizó adyuvante incompleto de Freund que ayuda a amplificar considerablemente la respuesta inmune, resultando en mayores títulos en menor tiempo (Galfre 1996). Después de aplicar la última dosis se sangró al conejo por punción cardíaca. Para activar los factores de coagulación, la sangre extraída se incubó 1h a 37°C, el suero fue obtenido mediante centrifugación a 2000g (Sorvall RT 6000D), 15 min a 4 °C, y conservado a -20°C hasta su uso.

Día 0	Obtención de suero pre-inmune y Primera inmunización	10 ¹² ufp en SS + AIF
Día 21	Segunda inmunización	10 ¹³ ufp en SS + AIF
Día 36	Tercera inmunización	10 ¹³ ufp en SS + AIF
Día 47	Sangría de prueba	-----
Día 65	Cuarta inmunización	10 ¹³ ufp en SS + AIF
Día 75	Sangría a blanco del conejo.	-----

Tabla 1. Esquema de inmunización del conejo Nueva Zelanda durante 75 días, los fagos se inocularon en solución salina (SS) con adyuvante incompleto de Freund (AIF).

6.9. Reactividad del Suero de Conejo.

Una vez obtenido el suero del conejo inmunizado, se realizó un ensayo de ELISA en el cual se evaluó la reactividad del suero con una de las clonas que contiene la secuencia consenso a diferentes diluciones, para ello, se fijaron 1 x10¹³ ufp/mL de fagos en una microplaca de poliestireno (MaxiSoport) para ELISA y se bloquearon espacios libres con BSA (albúmina sérica bovina 5mg/mL).

Se utilizó el suero obtenido del conejo inmunizado con fagos y en otra serie, el suero preinmune a diferentes diluciones (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600) como anticuerpo primario y como anticuerpo secundario se utilizó IgG anti-conejo marcada con fosfatasa alcalina. Para revelar, se adicionó como sustrato p-Nitrofenil fosfato (Sigma-aldrich, S0942-100TAB) y se leyó a 405 nm.

6.10. Obtención de proteínas de membrana.

Se obtuvieron proteínas de membrana externa de células HEP-2 utilizando el Kit Pierce ® RIPA Buffer y Halt™ Protease Inhibitor Cocktail de Thermo Scientific.

Para realizar la extracción se siguió el protocolo indicado por el fabricante; las células HEP-2 (proporcionadas por el Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina) se lavaron dos veces con PBS frío y se centrifugaron a 2500 x g (3626 rpm) por 5 minutos, al pellet se le adicionó 1mL de Buffer RIPA por cada 5×10^6 células, además, 10 μ L de EDTA y 10 μ L de inhibidor de proteasas por cada mililitro del amortiguador de lisis y se resuspendió con pipeta. Posteriormente, la mezcla se colocó en hielo y fue agitada gentilmente por 15 minutos, para después centrifugar una vez más a 14000 xg (10000 rpm) y se separó el sobrenadante donde se encuentran las proteínas de membrana.

La concentración de las proteínas de membrana fue determinada por el método de Bradford y finalmente se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 8% para observar la presencia de las proteínas de membrana.

6.11. Ensayo de ELISA.

Para evaluar el reconocimiento de algunas proteínas de membrana por el anticuerpo anti fago se realizó un ensayo de ELISA, en un pozo de una microplaca de poliestireno (MaxiSoport) se colocó 0.8 μ g/mL las proteínas de membrana de células HEP-2 obtenidas anteriormente y se bloquearon espacios libres con BSA (albúmina sérica bovina 5mg/mL). Como anticuerpo primario se

utilizó el suero obtenido del conejo inmunizado con fagos a diferentes diluciones. (1:50, 1:100, 1:200; 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800) y como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo marcada con fosfatasa alcalina. Se adicionó el p-Nitrofenil fosfato como sustrato (Sigma-aldrich, S0942-100TAB) y se leyó a 405 nm. Para comparar la reactividad antes de la inmunización se realizó el mismo procedimiento utilizando como anticuerpo primario el suero preinmune.

7. RESULTADOS

7.1. Obtención y purificación de PetS260I.

La obtención de la proteína PetS260I se realizó por precipitación del sobrenadante del cultivo de la cepa de *E. coli* HB101(pCEF2) con sulfato de amonio al 60%, se purificó utilizando columnas de intercambio iónico: primero con una resina Q-sefarosa para realizar un intercambio aniónico, posteriormente se sometió a FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) con una resina Mono-S para intercambio catiónico. En el perfil de elución de la segunda columna se observan los dos picos, de éstos, en el segundo se obtuvo la proteína purificada, ésta fue eluida entre las fracciones 32-50 (Fig. 9A). El análisis electroforético (SDS-PAGE) de la fracción purificada mostró una banda de aproximadamente 104 kD. En la preparación no se observaron otras bandas por lo que se sugiere que la proteína se encuentra pura (Fig. 9B).

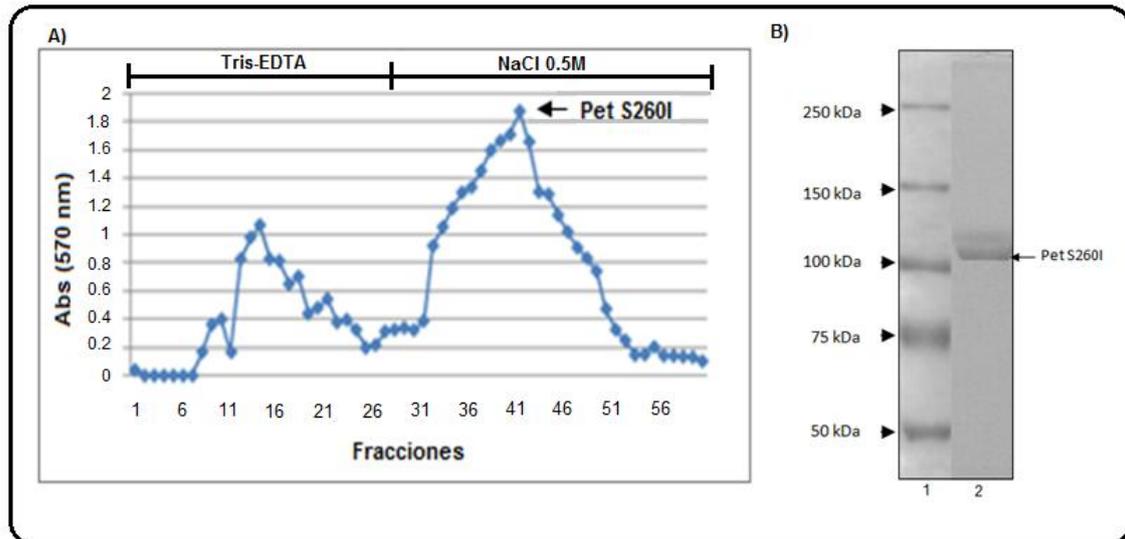


Figura 9. Purificación de Pet S260I. (A) Perfil de elución de FPLC, la proteína fue eluida entre las fracciones 32-50. (B) SDS-PAGE 8%, sobrenadante del cultivo de la cepa *E. coli* HB101(pCEF2) donde se observa la presencia de la proteína PetS260I (104 kDa). En el primer carril se muestra el perfil del marcador de proteínas (Fermentas, USA. No. de cat. SM001).

7.2. Selección de Fagos con Afinidad a Pet.

Se realizaron cuatro rondas de bioselección, en la Tabla 2 se muestra que en la primera ronda el porcentaje de elución es muy bajo (0.00065%). El porcentaje de elución es la relación entre los fagos colocados y los fagos eluidos después de la bioselección, aquellos fagos que expresan péptidos que no son afines con la proteína Pet S260I son retirados durante los lavados, los que tienen más afinidad se unen a la proteína y son eluidos con un pH ácido. En la segunda ronda el porcentaje de elución fue el más alto (2.7%), en la tercera y cuarta ronda los porcentajes de elución fueron 0.4175 y 1.25 respectivamente (Tabla 2).

Al haber una variedad muy grande de péptidos expresados por los fagos sólo se unen a la proteína aquellos que tienen más afinidad, en las siguientes rondas el porcentaje de elución es más alto debido al enriquecimiento de la población de que clonas que tuvieron más afinidad en la ronda anterior.

Rondas	Fagos colocados u.f.p./mL	Fagos eluidos u.f.p./mL	Porcentaje de elución (%)
1 ^a	2×10^{11}	1.3×10^4	0.00065
2 ^a	1×10^9	2.7×10^7	2.7
3 ^a	4×10^{11}	1.7×10^9	0.4175
4 ^a	4×10^{11}	5×10^9	1.25

Tabla 2. Títulos de Fagos presentes en los eluidos de las Rondas de la Bioselección

7.3. ssDNA obtenido de las clonas seleccionadas.

Se utilizó el método de extracción de DNA con yoduro de sodio para obtener el DNA de las 18 clonas seleccionadas al azar. En la figura 10 se muestra el gel de agarosa en el cual se distingue una banda que corresponde al ssDNA de cada clona (carriles 2-19) y en los carriles 1 y 20 se observa el marcador de peso molecular Mw Lambda Hind III (Fermentas).

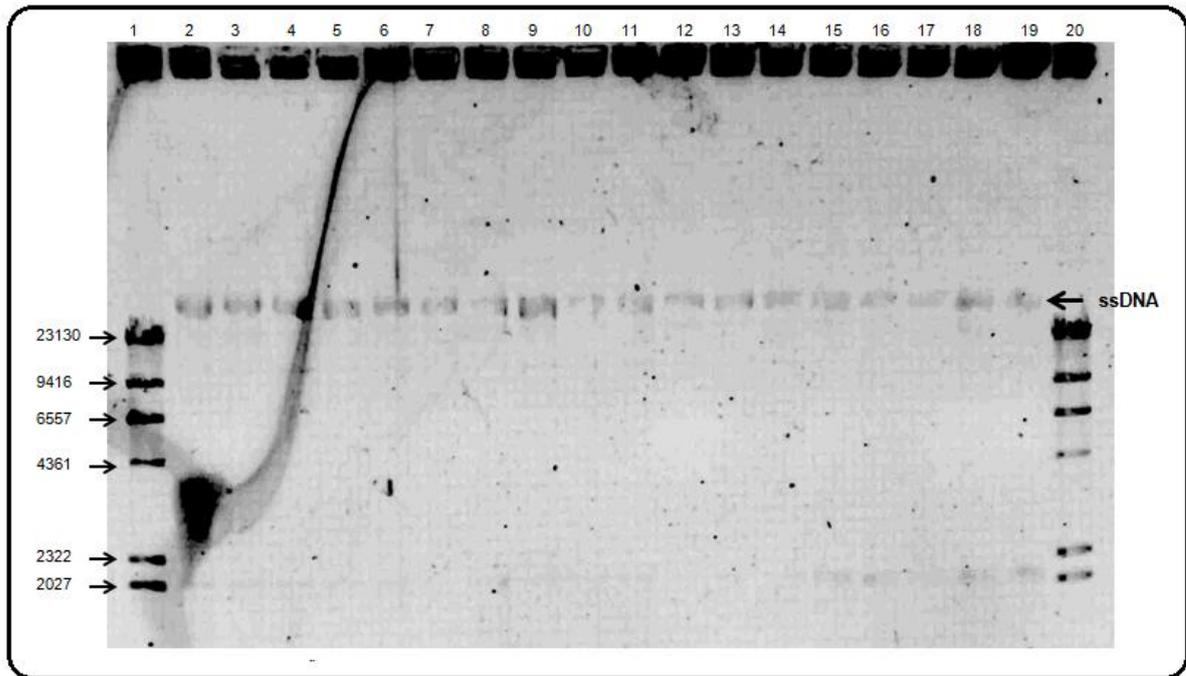


Figura 10. Gel de Agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. En cada pozo se colocaron 3 μ L de muestra + 1 μ L de buffer de carga.

7.4. Obtención y análisis de las secuencias de los péptidos expresados por los fagos seleccionados.

Se envió a secuenciar el DNA de 18 clonas, de éstas muestras sólo fue posible obtener la secuencia de 17 de ellas. De cada secuencia se realizó la traducción a aminoácidos para después localizar la correspondiente del péptido de 12 aminoácidos a partir de la secuencia corta de referencia GGGS, que contienen las bibliotecas de fagos y que está localizada entre la proteína pIII del fago y el péptido expresado. Las secuencias de las 17 clonas que permanecieron unidas a la toxina Pet en los pozos después de los lavados, se muestran en la Tabla 3. Al analizar éstas se pudo identificar que se existen tres tipos de ellas; péptidos de secuencias totalmente idénticas, péptidos con homologías parciales y péptidos únicos.

Clona	Secuencias de aminoácidos													Frecuencia	
Pet-2			F	T	L	H	D	L	L	P	Q	P	A	F	11/17
Pet-3			F	T	L	H	D	L	L	P	Q	P	A	F	
Pet-5			F	T	L	H	D	L	L	P	Q	P	A	F	
Pet-7			F	T	L	H	D	L	L	P	Q	P	A	F	
Pet-8			F	T	L	H	D	L	L	P	Q	P	A	F	
Pet-9			F	T	L	H	D	L	L	P	Q	P	A	F	
Pet-11			F	T	L	H	D	L	L	P	Q	P	A	F	
Pet-13			F	T	L	H	D	L	L	P	Q	P	A	F	
Pet-15			F	T	L	H	D	L	L	P	Q	P	A	F	
Pet-16			F	T	L	H	D	L	L	P	Q	P	A	F	
Pet-18			F	T	L	H	D	L	L	P	Q	P	A	F	
Pet-1	Q	N	R	L	L	H	D	<u>E</u>	L	P	P	A			1/17
Pet-12			L	T	<u>V</u>	H	D	L	L	P	T	T	P	R	1/17
Secuencia consenso	L/V H D L/F L P													13/17 (76.4%)	
Pet-4		H	G	N	L	Y	Q	L	S	P	S	P	S		1/17
Pet-5		Q	L	I	L	A	P	H	T	S	S	T	R		1/17
Pet-10		L	T	R	H	Y	F	P	A	P	P	A	I		1/17
Pet-14		T	M	S	N	P	I	T	S	L	I	S	V		1/17

Tabla 3. Secuencia consenso de 17 de las 18 clonas seleccionadas al azar después de cuatro rondas de bioselección. Péptidos de secuencias idénticas (Pet- 2,3,5,7,8,9,11,13,15,16,18.), péptidos con homologías parciales (Pet- 1,12.) y péptidos únicos (Pet- 4,5,10,14).

De las 17 clonas mostradas, 11 presentan una secuencia idéntica (Clonas Pet-2,3,5,7,8,9,11,13,15,16,18.), dos secuencias tienen homologías parciales (Clonas Pet- 1,12.) y las cuatro restantes son péptidos únicos (Clonas Pet-4,5,10,14).

Los péptidos con secuencias idénticas comparten una región muy similar con las que tienen homologías parciales, ésta región de 6 residuos fue tomada como la secuencia consenso (L/VHDL/FLP).

En las clonas con similitudes parciales se observa que solo difieren en uno de los 6 aminoácidos que presenta la secuencia consenso (LHDLLP), en la clona Pet-1 una Leucina (L) es intercambiada por Fenilalanina (F) (LHDFLP), que, a pesar de ser un aminoácido aromático, también es un aminoácido hidrofóbico, y en la clona Pet-12 una Leucina (L) es sustituida por un aminoácido hidrofóbico y alifático que es la Valina (V) (VLHDLLP). Lo anterior sugiere que las secuencias con homologías parciales son reconocidas por la misma región que aquellas con secuencia idéntica. Lo anterior nos permitió considerar que la secuencia consenso se encuentra en 13 de las 17 clonas seleccionadas al azar, lo que representa un 76.4% de las clonas secuenciadas totales.

Los péptidos únicos presentan algunos aminoácidos en común con las otras secuencias, en particular, la clona Pet-10 comparte una secuencia similar con Pet-12 (LTV/RH), en la cual se sustituye un residuo de Valina (V) por uno de Arginina (R). Una región parecida también puede encontrarse en las secuencias idénticas, pero con Fenilalanina (F) sustituyendo a Leucina (L) en la primera posición, y Leucina en lugar de Valina (V) o Arginina (R) en la tercera posición (FTLH). Las clonas Pet-4, Pet-5 y Pet-14, aunque comparten algunos

aminoácidos, no presentan similitudes en la posición en que se encuentran con respecto al resto de las clonas.

La secuencia consenso L/VHDL/FLP fue introducida en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), sin embargo, al tratarse de una secuencia de sólo 6 aminoácidos, la base de datos nos arrojó demasiadas coincidencias, sin embargo ninguna de ellas presentó una similitud útil con los péptidos analizados. Por lo cual no fue posible asociar la secuencia consenso con alguna familia de proteínas.

7.5. Antigenicidad del motivo L/VHDL/FLP.

En el ensayo de ELISA realizado para observar la reactividad de los anticuerpos con su homólogo, se utilizaron los anticuerpos anti-fago, obtenidos al inmunizar un conejo con el fago que expresa el péptido con el motivo LHDLLP. Los resultados nos indican que existe reactividad con el suero preinmune, y que ésta reactividad disminuye a la vez que las diluciones van aumentando; la reactividad con el suero inmune es alta, siendo que se observa una coloración muy intensa al revelar con el sustrato, no obstante, con el lector de ELISA no se logró obtener una lectura, se repitió el ensayo fijando una menor cantidad de fagos (1×10^{12} , 1×10^{11} , 1×10^{10} , 1×10^9 , 1×10^8) y se obtuvo el mismo resultado.

7.6. Reactividad de los anticuerpos anti fagótopo contra proteínas de membrana.

Las proteínas de membrana obtenidas a partir de células HEp-2 se observaron en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomasie con un perfil de abundantes bandas de diferentes pesos moleculares, posteriormente se realizó una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa y un Western-blot utilizando suero del conejo inmunizado con fagos como primer anticuerpo, e IgG anti-conejo marcada con fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo. Al revelar el Western-blot no se observó reactividad de los con alguna de las proteínas de membrana de células HEp-2.

Como estrategia alterna se realizó un ensayo de ELISA indirecto en el que se fijaron en los pozos las proteínas. En la gráfica, el eje horizontal corresponde a las diluciones seriadas del suero obtenido de los conejos inmunizados y del suero preinmune de 1:50 a 1:12800, en el eje vertical se encuentran los valores de la absorbancia medida a 405 nm de la reactividad del suero con las proteínas de membrana, las barras de color azul corresponden a la respuesta del suero preinmune por cada dilución, mientras que las barras en color rojo se refieren a la respuesta del suero inmune (Fig. 11).

En este ensayo se observó que hay una reactividad del suero preinmune con las proteínas de membrana que va disminuyendo conforme aumentan las diluciones, sin embargo, la reactividad del suero inmune es de aproximadamente el doble que la del suero preinmune en la dilución menor (1:50) al igual que en la dilución 1:100, esta reactividad disminuye según las diluciones aumentan (Figura 11).

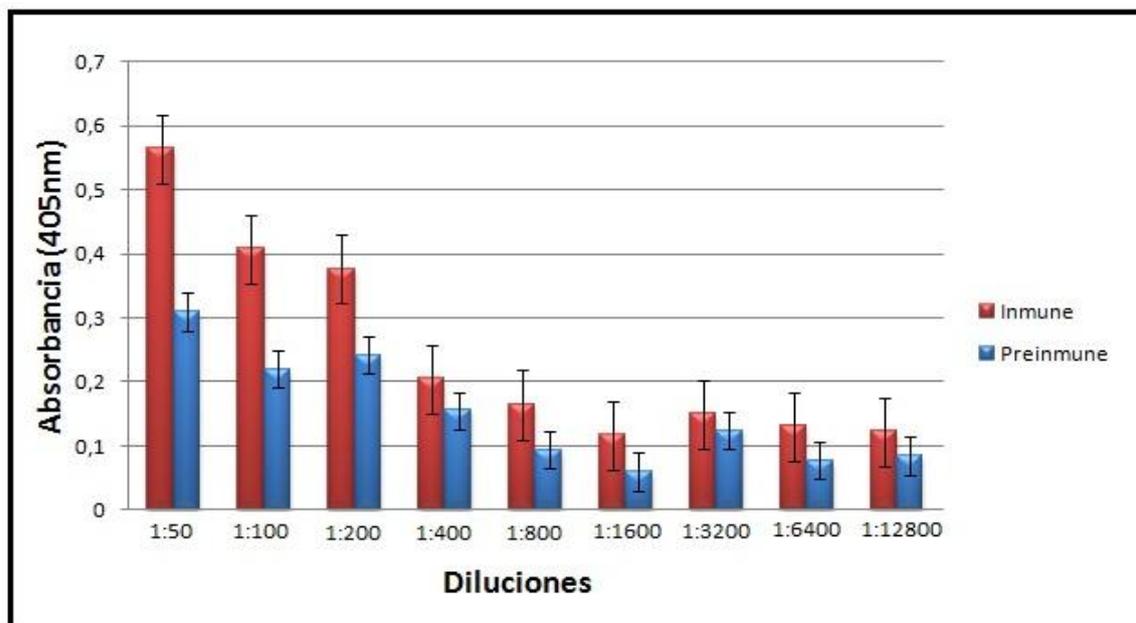


Figura 11. Ensayo de ELISA. Reactividad de suero de conejo anti-fago vs proteínas de membrana. Se utilizaron como antígeno las proteínas de membrana (0.8 µg/mL), como anticuerpo primario suero obtenido del conejo inmunizado con fagos a diferentes diluciones (1:50, 1:100, 1:200; 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800) (rojo) y suero preinmune del conejo en las mismas diluciones (azul). Como anticuerpo secundario se utilizó IgG anti-conejo marcada con fosfatasa alcalina.

7.7. Alineación del motivo conservado de la citoqueratina-8 ⁶⁸NQSLLSPL con la secuencia de clonas obtenidas.

Al inicio de este trabajo, aún no se había reportado el posible receptor para la toxina Pet, sin embargo, en un trabajo publicado recientemente (Nava-Acosta y Navarro-García, Diciembre 2013), se dio a conocer que la citoqueratina 8 (CK8) es uno de los receptores para Pet en células epiteliales.

Para observar si la secuencia consenso obtenida en nuestro estudio tiene similitudes con el receptor de Pet, se tomó la secuencia de la citoqueratina-8 y se alineó con la de los péptidos obtenidos después de la bioselección, el

resultado mostró un alineamiento con el motivo conservado ⁶⁸NQSLLSPL que se ha reportado que es de suma importancia en las queratinas de tipo II.

En la Tabla 4 se observa que la secuencia del motivo conservado de la citoqueratina-8, tiene una identidad de 33.33% con la secuencia encontrada en la mayoría de las clonas seleccionadas por Phage Display (The UniProt Consortium 2014), además, comparte ciertos aminoácidos como la Leucina y la Glutamina (XQXLLXXL). La clona Pet-1 así como la clona Pet-12 comparten dos Leucinas, aunque en diferentes posiciones. Finalmente, la clona Pet-4, que fue clasificada como única ya que no presentó homología con la secuencia consenso de las clonas bioseleccionadas, al parecer, presenta alta homología con el motivo conservado de la citoqueratina-8, ya que coincide en 4 de los 8 aminoácidos del motivo (**NXXXLSPX**).

Secuencia Citoqueratina-8	⁶³ T A V T V N Q S L L S P L V L E V D P ⁸¹
Clona Pet-2,3,5,7,8,9,11,13,15,16,18	F A P Q P L L D H L T F
Clona Pet-1	A P P L F D H L L R N Q
Clona Pet-12	R P T T P L L D H V T L
Clona Pet-4	H H N L Y Q L S P S P S

Tabla 4. Alineación del motivo conservado de la citoqueratina-8 ⁶⁸NQSLLSPL con la secuencia de clonas obtenidas después de la bioselección.

8. DISCUSIÓN

La toxina Pet es una proteasa de serina exportada por el sistema de secreción tipo V, por algunas cepas de *E. coli* enteroagregativa. Después de la exposición de la proteína Pet por una hora a células epiteliales, se observan cambios fenotípicos en la célula y después de 2 horas de contacto se observa un efecto citopático, el daño observado al citoesqueleto de la célula y en específico a la fodrina, se asocia al motivo de serin proteasa (GDSGS). El tiempo transcurrido entre la exposición y el efecto citopático, es indicativo de la internalización de la proteína Pet. Navarro-Garcia y cols. (2001) demuestran que la proteína Pet es endocitada dependiente de clatrina y que lleva una ruta vectorial del endosoma al aparato de Golgi, y del aparato de Golgi al retículo endoplásmico, donde es exportada al citosol para cuasar el daño al citoesqueleto.

En Diciembre de 2013 se conoce que el receptor celular de Pet es la citoqueratina 8, utilizando métodos de cromatografía de afinidad (Nava-Acosta y Navarro García, 2013), este receptor no se conocía al inicio de este trabajo cuyo objetivo era identificar péptidos que mimeticen el receptor de Pet, utilizando el método de Phage Display. En el presente trabajo se utilizó la tecnología de Phage Display para la búsqueda de este receptor, por su característica en la unión proteína-proteína. Originalmente Smith (1985) utilizó este método para la búsqueda de epítopes inmunodominantes, sin embargo, no solo se ha utilizado para la identificación de epítopes inmunodominantes, también para la búsqueda de receptores celulares (Lee *etal.* 2001, Hartley 2002, Greg Husack *etal.*, 2010), para presentar ligandos huérfanos con sus receptores, así como para identificar proteínas y péptidos que modulan su

actividad (Hartley 2002). Un ejemplo de la utilidad de esta herramienta es el aislamiento y caracterización de péptidos que neutralizan la toxina A de *Clostridium difficile* (Greg Husack *et al.* 2010). En otro estudio, a través de rondas secuenciales de selección positiva y negativa, se identificaron dos secuencias peptídicas que se unen específicamente a la transferrina humana y que no compiten con el receptor de unión de transferrina, sin embargo, se plantea que éstas secuencias podrían ser receptores de la superficie celular que llevan a otras proteínas hacia la vía endosomal (Lee *et al.* 2001).

La metodología de Phage display presenta características ideales para su empleo: sensibilidad, especificidad, sencillez, bajo costo y alcance para la población (Santamaría 2003). Así como es útil para el estudio de receptores, proteínas biológicamente activas y péptidos que pueden ser usados terapéuticamente, o conducir a diseño de nuevos fármacos. Los procesos de identificación de marcadores específicos de enfermedades y de emparejamiento de ligandos huérfanos con sus receptores son integrales para la identificación de nuevos blancos para fármacos. Una vez que estos blancos son identificados, un péptido corto y activo podría ser usado como parte importante del diseño racional de pequeñas moléculas terapéuticas peptídicas orales, que hasta ahora no son disponibles (Harley 2002).

Algunos de los logros más destacados realizados en este respecto son el desarrollo de un péptido de baja potencia nanomolar agonista de eritropoyetina (Wrighton 1996) y trombopoyetina (Cwirla 1997), así como la construcción de

un agonista artificial del receptor para el factor de crecimiento de fibroblasto (Ballinger1999).

Para la bioselección del receptor de Pet por Phage Display, se puso en contacto una biblioteca de péptidos de 12 aminoácidos (BioLabs) con la proteína Pet purificada por métodos de cromatografía de intercambio iónico, al final, obtuvimos una proteína con una pureza mayor al 90% y con un rendimiento del 1%, resultados semejantes han obtenido otros investigadores (Hernández-Chiñas y cols 2009; Benitez y cols 2011) al utilizar este método descrito por Villaseca y cols (2000).

Después de realizar 4 rondas de bioselección con una selección negativa utilizando BSA, para evitar el posible enriquecimiento de fagos no específicos de la biblioteca que no se unen al blanco (Pande y cols. 2010), se seleccionaron fagos que expresan péptidos con la secuencia consenso L/VHDL/FLP en el 76.4% de las clonas de las que se obtuvo su secuencia de ADN.

La secuencia consenso (LHDLLP) obtenida en este trabajo, es una secuencia con un alto contenido en Leucina (LHDLLP). La Leucina es un aminoácido alifático y es también hidrofóbico. En la identificación de receptores, se busca la interacción entre proteínas, en este caso, debido a las características de la Leucina, es posible que la secuencia de aminoácidos encontrada forme parte de proteínas de la bicapa lipídica de la membrana celular, donde los grupos hidrofóbicos de la bicapa están expuestos y los hidrofílicos en el núcleo interno,

como en el caso de un canal iónico en el cual los grupos polares que se encuentran en la superficie interna del canal mimetizan un disolvente polar lo que permite que los iones cargados puedan pasar al otro lado de la bicapa (Von Holde Kensal *et al* 1998).

Por otra parte, existe una superfamilia de proteínas que se caracteriza por tener repeticiones ricas en Leucina (LRR superfamily), se trata de proteínas con alto contenido en Leucina que muestran un patrón periódico en la distribución de leucina y algunos otros residuos, esto puede producir un segmento similar en hidrofobicidad y tamaño a segmentos transmembranales de péptidos y proteínas anfipáticos (Takahashi *et al* 1985). Todas las proteínas que pertenecen a esta familia parecen estar relacionadas con interacciones proteína-proteína; debido a las características de la Leucina pueden proveer de un esqueleto estructural para lograr interacciones moleculares específicas. La especificidad de interacciones proteína-proteína se da probablemente, debido a la composición específica de los residuos no consensuales y pueden ser también influenciados por la longitud y las repeticiones de los dominios que lo rodean (Kobe y Deisenhofer 1994).

Al realizar la búsqueda de la secuencia consenso LHDLLP en el banco de genes (GenBank) por medio de un Blast o alineamiento, nos dio una lista de más de 1000 probables proteínas. Sin embargo, existen antecedentes que demuestran la utilidad de Phage Display en la búsqueda de un receptor (Hartley, 2002; Bradbury, 2001).

Para corroborar si la secuencia consenso LHDLLP forma parte de una proteína de membrana de células eucariotas, se obtuvieron anticuerpos contra este péptido, inmunizando un conejo con el fagótopo que presenta la secuencia consenso (FTLHDLLPQPAF). Se valoró la reactividad de los anticuerpos obtenidos a proteínas de membrana de células HEp-2 por ELISA y Western-blot, se utilizó esta línea celular, porque fue la utilizada para demostrar la internalización de Pet (Navarro-García *et al* 2001). En los ensayos de Western-blot no se observó el reconocimiento de alguna proteína de membrana por el anticuerpo anti-LHDLLP de conejo. Lo anterior sugiere que el reconocimiento de la proteína puede ser conformacional, debido a que en el Western-blot las proteínas se encuentran en forma lineal, además de que la cantidad de proteína encontrada puede ser tan baja que no pueda ser reconocida por este método. En el ensayo de ELISA las proteínas se encuentran en forma nativa además de que es un método mucho más sensible en el cual se pueden reconocer concentraciones de nanogramos e incluso picogramos/mL (Kindt *et al* 2007). Los anticuerpos que se obtuvieron son específicos para el péptido con la secuencia consenso, ya que cuando un bacteriófago híbrido es usado como un sistema de presentación de antígeno, anticuerpos específicos son generados contra el epítipo en la proteína de fusión (Willis *et al.* 1993) ya que éstos péptidos son altamente inmunogénicos. El resultado del ensayo de ELISA muestra una reactividad contra una proteína de la membrana plasmática de células HEp-2, sin embargo no se pudo caracterizar de qué proteína se trata.

Como se mencionó anteriormente, un estudio reciente (Nava-Acosta y Navarro-García, 2013), identifica al receptor de Pet como miembro de la familia de las

citoquerarinas, éstas son proteínas del filamento intermedio del citoesqueleto, sin embargo, también han sido localizadas en la superficie celular (Hembrough *et al.* 1995). En particular, se observó que la citoqueratina 8 (CK8) se requiere para la intoxicación de Pet en el epitelio de la célula. Una función clara para algunas queratinas, es proteger células de daño y mantener su integridad.

Con este antecedente se volvió a buscar la secuencia LHDLLP en la secuencia de aminoácidos de la citoqueratina 8, el análisis mostro un alineamiento con la secuencia ⁶⁸NQSLLSPL, esta secuencia fue reportada por Böttger y Lane (1994) como un sitio inmunodominante de la citoqueratina 8 utilizando el método de Phage display y como receptor un anticuerpo monoclonal llamado LE41, en este estudio se reportó una secuencia consenso (SXLNP, X=L,I,M) que comparte ciertos aminoácidos con un motivo conservado en la familia de las queratinas, que podría ser el epítpe “natural” de la queratina 8 (SLLSP), la diferencia obvia entre la secuencia obtenida por el mapeo y el motivo conservado, es que la Ser (S) en la cuarta posición (SLL**S**P) se encuentra en lugar de la Asp (N) (SLL**N**P); al probar la afinidad de las dos variantes, se observó que ambas secuencias son ligandos afines al anticuerpo monoclonal LE41, sin embargo, hay una mayor afinidad si aparece Asp (N) en la cuarta posición (Böttger y Lane 1994). Por otro lado, la fosforilación de la Serina 73 de la queratina 8 en el motivo conservado (⁶⁸NQSLL**S**P) juega un papel importante en regular la organización de filamentos, se ha observado que posee un “interruptor” de “encendido/apagado” en células cultivadas y en tejidos, manteniendo la fosforilación “encendida” durante estrés de la célula como lo es el calor o exposición a drogas y durante apoptosis. Una red intacta

de filamentos de queratina, es un efector importante para mantener la integridad de las células. (Ku Nam-On, 2001).

Por todo lo anterior, se sugiere que el motivo conservado en la familia de las citoqueratinas (⁶⁸NQSLLSPL) podría estar involucrado en la interacción de la Citoqueratina 8 con la proteína Pet, ya que el motivo comparte aminoácidos importantes como la Leucina, que participa en las interacciones proteína-proteína, con la secuencia obtenida por el método de bioselección.

Sin embargo, es necesario realizar más ensayos para corroborar lo antes mencionado. El siguiente paso de esta investigación sería utilizar los anticuerpos obtenidos de la inmunización del conejo y probar si presentan alguna reactividad con la citoqueratina 8, si es que la presentan, éste anticuerpo puede utilizarse para bloquear el receptor de Pet y así impedir que Pet produzca daño citotóxico.

Sería también de interés sintetizar el péptido y realizar ensayos de competencia entre la citoqueratina 8 y el péptido sintético, observando cuál de ellos presenta mayor afinidad a la toxina.

9. CONCLUSIONES

- Se identificó la secuencia consenso L/VHDL/FLP como parte del posible receptor celular de la proteína Pet mediante la técnica de Phage Display.
- Aunque ya se ha descrito que el receptor celular para Pet es la citoqueratina 8, en este trabajo se encontró un sitio particular (⁶⁸NQSLLSPL) en el cual podría llevarse a cabo el reconocimiento de la proteína.
- La secuencia consenso tiene una similitud de 33.33% con un motivo conservado de la familia de las queratinas tipo II y además, es el epítipo natural para su reconocimiento.

10. APÉNDICES

10.1. Abreviaturas

aa	Aminoácido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
BSA	Albúmina Sérica Bovina
°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Electro Inmuno Ensayo
g	Gramos
h	Horas
kDa	Kilo Daltones
Kg	Kilogramos
LB	Medio Luria Bertroni
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
FPLC	Fast protein liquid chromatography
M	Molaridad
mA	MiliAmperes
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
µL	Microlitros
N	Normalidad
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
Pet	Toxina Codificada en Plásmido
SPATES	Serin Proteasas de la Familia <i>Enterobacteriaceae</i>
TA	Temperatura Ambiente
ufp	Unidades Formadoras de Placa
V	Volumen

10.2. Medios y soluciones

MEDIOS DE CULTIVO:

CALDO LURIA CON AMPICILINA

Por litro:

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

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

MEDIO LURIA CON AMPICILINA

Por litro:

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

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

SOLUCIONES:

AZUL DE COOMASSIE 0.2%

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

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

ALBÚMINA SÉRICA BOVINA 0.1%

- Albúmina Sérica Bovina

Disolver 100 mg en 100 mL de PBS.

ALBÚMINA SÉRICA BOVINA 1%

- Albúmina Sérica Bovina

Disolver 1000 mg en 100 mL de PBS.

LECHE DESCREMADA 5%

- Leche descremada sin grasa

Disolver 5 g en 100 mL de PBS.

PBS (Phosphate Buffered Saline) 10X

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 14.4 g de Na_2HPO_4
- 2.4 g KH_2PO_4

Disolver y ajustar el pH a 7.4

PBS-TWEEN 0.1% (v/v)

- Tween 20

Adicionar 100 μl a 100 mL de PBS.

PBS-TWEEN 0.5% (v/v)

- Tween 20

Adicionar 500 μ l a 100 mL de PBS.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE CARBONATOS

- NaCO_3 0.2 M

Disolver en agua y ajustar el pH a 9.5.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CORRIDA

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

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ELUCIÓN

- Glicina 0.1 M

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

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATO DE SODIO

- Na_2HPO_4 0.0669 M
- NaH_2PO_4 0.0030 M

Disolver las sales y ajustar el pH a 8.2.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE LEAMMLI (2X)

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

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE TRANSFERENCIA (1X)

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

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE UNIÓN

- Glicina 0.1M

Disolver y ajustar el pH a 9.0.

SOLUCIÓN DE DESTENIDO

- Metanol 30%
- Ácido Acético Glacial 10%

SOLUCIÓN TRISMA BASE

- Trisma-base 2M

Disolver en agua y ajustar el pH a 9.1.

SULFATO DE AMONIO

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% Saturación

MEDIOS Y SOLUCIONES EMPLEADOS PARA LA METODOLOGÍA PHAGE

DISPLAY

:

MEDIO LURIA

Por litro:

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

Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente

PLACAS LB/IPTG/Xgal

- Medio LB
- 15 g/L agar

Esterilizar en autoclave, enfriar a $<70^\circ\text{C}$, adicionar 1 mL IPTG/Xgal y mantener las placas a 4°C en la oscuridad.

Para el IPTG/Xgal: Mezclar 1.25g IPTG (isopropyl β -D-tiogalactosidasa) y 1g Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) en 25 mL de dimetilformamida.

La solución se debe mantener a -20°C en oscuridad.

AGAROSA TOP

Por litro:

- 10 g Bacto-triptona
- 5g de Extracto de levadura
- 5g NaCl
- 1g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 7 g agarosa

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

STOCK DE TETRACICLINA

- 20 mg/mL en etanol

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

PLACAS DE LB-TETRACICLINA

- Medio LB
- 15g/L agar

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

BUFFER DE BLOQUEO

- M NaHCO_3 (pH 8.6)
- 5mg/mL BSA
- 0,02% NaN_3

Esterilizar con filtro, mantener a 4°C

TBS

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

Esterilizar en autoclave, mantener a temperatura ambiente

PEG/NaCl

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

Esterilizar en autoclave, mantener a temperatura ambiente.

BUFFER IODADO

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

Mantener a temperatura ambiente en la oscuridad.

11. REFERENCIAS

1. Benítez-Guzmán Alejandro, Carlos Eslava, Claudia González-Espinosa and M. Eugenia Torres-Márquez :2011: **Pet Induces IL1, TNF α , MIF and IL1Ra Through the IKK $\alpha\beta$ /NF κ B Pathway**. The Open Immunology Journal, 2011, Volumen 4 paginas 16-21.
2. Bernier C, Gounon P, Le Bouguenec C. **Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III- encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF encoding operon family**. Infect Immun. 2002; 70: 4302-4311.
3. Bradbury ARM, Sidhu S, Dübel S, McCafferty J. **Beyond natural antibodies: the power of *in vitro* display technologies**. Nat Biotechnol. 2011; 29(3): 245–254.
4. Böttger V, Lane EB. **A Monoclonal Antibody Epitope on Keratin 8 Identified Using a Phage Peptide Library**. J. Mol. Biol. 1994; 235:61-67.
5. Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH. **Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli***. Infect Immun. 1997; 65: 4135-4145.
6. Eslava C, Navarro-García F, Czeczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. **[Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*](#)**. Infect. Immun. 1998; 66(7):3155-3163.
7. Galfre G, Monaci P, Nicosia A, Luzzago A, Felici F, Cortese R. **Immunization with Phage-displayed Mimotopes**. Methods. Enzymol. 1996; 267:109-115.
8. Hairul NH, Jun G, Choong YS, Beng EB, Ismail A, Soon T. **Phage display antibodies for diagnostic applications**. Elsevier. 2013; 41:209-216.

9. Hartley O. **The use of Phage Display in the study of Receptors and their Ligands.** Journal of Receptors and Signal Transduction. 2002; 22: 373-392.
10. Henderson IR, Nataro JP. **Virulence Functions of Autotransporter Proteins.** Infect Immun. 2001; 69(3): 1231–1243.
11. Henderson IR, Czczulin JR, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. **Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infect Immun. 1999; 67:5587-5596.
12. Hernández-Chiñas U, Gazarian T, Gazarian K, Mendoza HG, Xicohtencatl CJ, Eslava C. **Peptide Sequences Identified by Phage Display are Immunodominant Functional Motifs of Pet and Pic Serine Proteases Secreted by *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*.** Peptides 2009; 30:2127-2135.
13. Hussack G, Arbabi-Ghahroudi M, van Faassen H, Songer G, K.-S. Ng K, Mackenzie R, Tanha J. **Neutralization of *Clostridium difficile* Toxin A with Single-domain Antibodies Targeting the Cell Receptor Binding Domain.** The Journal of Biological Chemistry. 2011; 286(11):8961-8976.
14. Kaur P, Chakraborti A, Asea A. **Enteraggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Food Born Pathogen. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.** Vol.2010. ID 254159.
15. Kobe B, Deisenhofer J. **The leucine-rich repeat: a versatile binding motif.** TBIS. 1994; 19:415-421.
16. Ku N, Azar S, Omary MB. **Keratin 8 Phosphorylation by p38 Kinase Regulates Cellular Keratin Filament Reorganization.** The Journal of Biological Chemistry. 2002; 277(13):10775-10782.
17. Kurcharzik T, Hudson JT, Lugerling A, Abbas JA, Bertini M, Lake JG. **Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury.** Gut 2005; 54:1565-1472.
18. Lee JH, Engler JA, Collawn JF, Moore BA. **Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor.** Eur. J. Biochem. 2001; 268:2004-2012.

19. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AI, Martin WC, Levine MM. **Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes.** Infect Immun. 1992; 60:2297-2304.
20. Nataro JP, Hicks S, Phillips AD, Vial PA, Sears CL. **T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis.** Infect Immun. 1996; 64:4761-4768.
21. Nava-Acosta R, Navarro-García F. **Cytokeratin 8 Is an Epithelial Cell Receptor for Pet, a Cytotoxic Serine Protease Autotransporter of *Enterobacteriaceae*.** mBio 4(6):e00838-13. doi:10.1128/mBio.00838-13.
22. Navarro-García F. **Enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin.** Future Microbiol. 2010; 5(7):1005-1013.
23. Navarro-García F, Canizalez-Roman A, Burlingame KE, Teter K, Vidal JE. **Pet, a Non-AB Toxin, Is Transported and Translocated into Epithelial Cells by a Retrograde Trafficking Pathway.** Infect. Immun. 2007; 75(5):2101-2109.
24. Navarro-García F, Canizalez-Roman A, Luna J, Sears C, Nataro JP. **Plasmid-Encoded Toxin of Enteroaggregative *Escherichia coli* is Internalized by Epithelial Cells.** Infect. Immun. 2001; 69(2):1053-1060.
25. Navarro-García F, Canizalez-Roman A, Vidal JE, Salazar MI. **Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis.** Microbiology. 2007; 153:2828–2838.
26. Navarro-García F, Elias WP. **Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*.** Gut Microbes. 2011; 2(1):13-24.
27. Navarro-García F, Sears C, Eslava C, Cravioto , Nataro J. **Cytoskeletal Effects Induced by Pet, the Serine Protease Enterotoxin of Enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infect. Immun. 1999; 67 (5): 2184–2192.
28. Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. **Phage display: Concept, innovations, application and future.** Elsevier. 2010. 28:849-858.

29. Ruiz-Perez F, Nataro JP. **Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence.** Cell. Mol. Life. Sci. 2013. DOI 10.1007/s00018-013-1355-8.
30. Sansonetti PJ, Arondel J, Huerre M, Haranda A, Matsushima K. **Interleukin-8 controls bacterial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis.** Infect Immun. 1999; 67:1471-1480.
31. Santamaría H. **Phage Display y su Aplicación en el Diagnóstico Clínico.** Revista Investig Clinica 2003; 55:711-718.
32. Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin BM, Levine MM, Guandalini S. **Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable toxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat stable toxin.** Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:3093-3097.
33. Sidhu SS, Koide S. **Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces.** Elsevier. 2007;17:481-487.
34. Smith GP, Scott JK. [Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage.](#) Methods Enzymol. 1993; 217:228-257.
35. Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), **"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"**, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
36. Suzart S, Guth BF, Pedroso MZ, Okafor UM, Gomes TA. **Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence.** FEMS Microbiol Lett 2001; 201:163-168.
37. Takahashi N, Takahashi Y, Putnam FK. **Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich α 2-glycoprotein of human serum.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985; 85:1906-1910.
38. The UniProt Consortium. **Activities at the Universal Protein Resource.** Nucleic Acids Res. 2014; 42: D191-D198.

39. Villaseca JM, Navarro-García F, Mendoza-Hernández G, Nataro JP, Cravioto A, Eslava C. **Pet Toxin from Enteroaggregative *Escherichia coli* Produces Cellular Damage Associated with Fodrin Disruption.** Infect. Immun.2000; 68(10):5920-5927.
40. Von Holde Kensal etal. **Principles of physical Biochemistry.** Prentice Hall. USA1998.
41. Wang LF, Yu M. Epitope **Identification and Discovery Using Phage Display Libraries:Applications in Vaccine Development and Diagnostics.** Current Drug Targets. 2004;5(1):1-15.
42. Willis AE, Perham RN, Wraith D. **Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage.** Elsevier.1993;128:79-83.