



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**“ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A
LOS REARREGLOS DE LOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA
EN CÉLULAS RK13 INFECTADAS CON *Escherichia coli*
ENTEROPATÓGENA PARA CONEJO (REPEC)”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

MISAEEL RUBÉN OLIVER GONZÁLEZ

TUTOR: DR. FERNANDO NAVARRO GARCÍA

**COMITÉ TUTORAL: DRA. Ma. DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA
DR. HIPÓLITO MANJARREZ HERNÁNDEZ**



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.

Este trabajo contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de los proyectos del Dr. Fernando Navarro García (CONACYT 44660 y 60714). Además de los proyectos PAPIIT IN 203106-3 “Estudio Comparativo de los rearrreglos de citoesqueleto en células RK13 y enterocitos de conejo durante la infección de *Escherichia coli* enteropatógeno para conejo (REPEC)” e IN 211008-3 “Evaluación de la actividad antimicótica de compuestos sintéticos y naturales sobre la estructura de las células micóticas” y de la Cátedra GVC-10 “Morfología Veterinaria y Biología Celular”.

Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico mediante una beca para estudios de doctorado del CONACYT No. 144237

DEDICATORIAS

A mi querida esposa Concepción, "mi amorcito" por todo el amor y la felicidad que hemos disfrutado en nuestro matrimonio, fruto del entendimiento, comprensión, identificación y confianza que nos brindamos siempre.

A mis hijos, Misael e Itzel Sarai, porque soy un padre muy afortunado y feliz por ser ustedes como son; excepcionales. ¡Los quiero mucho!

A la memoria de mis padres, Tirso, "El Tio-tir", "Don Tirso" o "el Abuelo" y Estela, "Estelita" "La Madrina Estala" o "la Abuela" que en su espacio geográfico, social y de tiempo fueron dignas de seguir su ejemplo, porque lograron ser personas referentes, personas de bien, que siempre vieron por los demás y con una bondad sin límites. En lo religioso, que Dios los tenga en su Gloria. En lo social, su influencia sigue y seguirá presente en muchos. Como hijo, los sigo queriendo y admirando.

A la memoria de mi hermana Columna, que siempre lo he dicho, fue como una segunda Madre para mi persona en épocas importantes de mi vida.

A mis hermanos, René, Carolina, Pascasio, Eugenio y Jesús, porque además del parentesco hemos sido amigos, colaboradores, compadres y de muchas maneras en las que se dan las relaciones humanas que proporcionan felicidad.

A las esposas de mis hermanos Ruth, María Luisa y Silvia y el esposo de mi hermana Juan "Juanito" por el apoyo que siempre me han dado.

A todos los sobrinos y sobrinas, muchos ya con su familia propia, porque siempre han llenado de amor a la familia Oliver González.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM porque mediante la FESC y otras dependencias me ha brindado el medio adecuado para mi desarrollo profesional y realizarme como persona.

Al CINVESTAV, Institución que me abrió el camino en el inicio de esta gran aventura de los estudios de posgrado.

A mis compañeros de la FESC y en especial los de la sección de Ciencias Morfológicas Agropecuarias, por el apoyo y amistad que he tenido de Ustedes en toda mi trayectoria académica.

Al MIZ Alberto Chávez Enriquez, al Dr. Carlos Gerardo García Tovar, al Dr. Fernando Navarro García y a la Dra. Suemi Rodríguez Romo, porque me apoyaron y creyeron en mi persona desinteresadamente en momentos especiales de mi carrera académica.

A mi comité tutorial Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda y Dr. Hipólito Ángel Manjarréz Hernández, por las atenciones, orientaciones y apoyo que me brindaron durante la realización de mis estudios de Doctorado.

INDICE

| | |
|--|------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | i |
| ABREVIATURAS..... | iii |
| RESUMEN..... | iv |
| SUMMARY..... | v |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Citoesqueleto de actina | 1 |
| Proteínas que regulan la polimerización de actina | 3 |
| Protrusión de la membrana plasmática por la polimerización de actina..... | 7 |
| Microorganismos patógenos manipulan el citoesqueleto para su beneficio..... | 8 |
| <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)..... | 10 |
| Reclutamiento de proteínas al sitio de formación de los pedestales..... | 12 |
| <i>Escherichia coli</i> enteropatógena para conejo (REPEC) | 14 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 15 |
| OBJETIVOS..... | 17 |
| Objetivo general..... | 17 |
| Objetivos particulares..... | 17 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 18 |
| Línea celular y cepa bacteriana utilizada en este estudio..... | 18 |
| Reactivos y anticuerpos..... | 18 |
| Infección celular RK13 con REPEC..... | 18 |
| Ensayos de inmunofluorescencia..... | 19 |
| Microscopía confocal..... | 20 |
| Microscopía electrónica de transmisión..... | 20 |
| RESULTADOS..... | 22 |
| Células RK13 infectadas con REPEC denotan sitios ricos en actina en pedestales..... | 22 |
| Uso de microscopía confocal para caracterizar los pedestales de actina y su asociación con la bacteria en células RK13 infectadas con REPEC..... | 23 |
| Interacción de bacterias extracelulares y pedestales ricos en actina intracelulares..... | 24 |
| Detección ultraestructural de los pedestales en células RK13 infectadas con REPEC..... | 26 |
| Cinética de formación de pedestales de actina en células RK13 infectadas con REPEC..... | 27 |
| Los pedestales de actina se mantienen y son alargados en células infectadas después de 4 h..... | 28 |
| Los pedestales desaparecen al ser eliminada la infección y se vuelven a formar durante la reinfección..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| La marca del complejo Arp2/3 colocaliza con la marca de actina en los pedestales a las 3 horas postinfección de células RK13 por REPEC..... | 30 |
| En infecciones mayores a 4 horas el complejo Arp2/3 sigue colocalizando con actina en los pedestales..... | 36 |
| Al desaparecer los pedestales, la marca del complejo Arp2/3 se distribuye por todo el citoplasma de la célula..... | 36 |
| DISCUSIÓN..... | 38 |
| CONCLUSIONES..... | 46 |
| LITERATURA CITADA..... | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Fig. 1. Cristalografía de una molécula de actina-G | 1 |
| Fig. 2. Microscopía electrónica de barrido del citoesqueleto de actina..... | 2 |
| Fig. 3. Representación esquemática de cómo el complejo Arp2/3 inicia la polimerización de actina..... | 4 |
| Fig. 4. Profilina compite con timosina..... | 5 |
| Fig. 5. Gelsolina se une a filamentos de actina, los daña y los corta..... | 6 |
| Fig. 6. Modelo de protrusión de membrana por la fuerza de polimerización de actina..... | 8 |
| Fig. 7. Representación esquemática de varios estados de infección por (a) EPEC, (b) <i>Listeria</i> , (c) <i>Shigella</i> y (d) Virus vaccinia..... | 9 |
| Fig. 8. Inmunofluorescencia de los pedestales..... | 11 |
| Fig. 9. Modelo esquemático del sistema de secreción tipo III..... | 12 |
| Fig. 10. Modelo de un pedestal con proteínas del citoesqueleto reclutadas..... | 13 |
| Fig. 11. Epifluorescencia de células RK13 infectadas por REPEC muestran sitios de mayor marca de actina..... | 22 |
| Fig. 12. Epifluorescencia mostrando prolongaciones celulares con mayor marca de actina..... | 23 |
| Fig. 13. Cortes ópticos y Nomarski de células RK13 infectadas con REPEC por 4 h..... | 25 |
| Fig. 14. Colocalización entre REPEC y los pedestales ricos en actina..... | 26 |
| Fig. 15. Ultraestructura de pedestales formados en células RK13 infectadas con REPEC..... | 27 |
| Fig. 16. Estudio temporal de la formación de los pedestales..... | 28 |
| Fig. 17. Los pedestales persisten más allá de 4 horas de infección..... | 29 |

| | |
|--|----|
| Fig. 18. Los pedestales desaparecen después de ser eliminadas las bacterias y se vuelven a formar con reinfección..... | 31 |
| Fig. 19. El complejo Arp2/3 se observa en los pedestales a las 3.0 h de infección..... | 33 |
| Fig. 20. Gelsolina no colocaliza con la marca de actina de los pedestales..... | 34 |
| Fig. 21. Profilina no colocaliza en los pedestales..... | 35 |
| Fig. 22. El complejo arp2/3 se mantiene en los pedestales a las 5 horas postinfección..... | 36 |
| Fig. 23. Arp2/3 se distribuye en la célula al desaparecer los pedestales..... | 37 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| Actina-G | Actina globular |
| Actina-F | Actina filamentosa |
| kDa | Kilodaltones |
| ATP | Adenosintrifosfato |
| ADP | Adenosindifosfato |
| Mg ⁺ | Magnesio |
| Fig. | Figura |
| ABPs | Proteínas de unión a actina |
| ARPs | Proteínas de relación a actina |
| P _i | Fosforo inorgánico |
| Tir | Receptor de intimina traslocado |
| WASP | Proteínas del síndrome Wiskott-Aldrich |
| WASP/Scar | Proteínas del síndrome Wiskott-Aldrich/Scar |
| PIP | Fosfatidil inositol |
| PIP2 | Fosfatidil inositol bifosfato |
| ADF/cofilin | Factores de despolimerización de actina/cofilina |
| GTPasas | Guanidintrifosfatasas |
| DAPI | Diamidino-2-fenilindol |
| Arp2/3 | Proteína de relación a ctina 2/3 |
| EPEC | <i>Escherichia coli</i> enteropatógena |
| TTSS | Sistema de secreción tipo tres |
| EccP | Proteínas acopladoras a <i>Escherichia coli</i> |
| EspA | Proteína A secretada por <i>Escherichia coli</i> |
| EspB | Proteína B secretada por <i>Escherichia coli</i> |
| EspD | Proteína D secretada por <i>Escherichia coli</i> |
| EspF | Proteína F secretada por <i>Escherichia coli</i> |
| REPEC | <i>Escherichia coli</i> enteropatógena para conejo |
| TRITC | Tetrahidrometil Isotiosanato de Rodamina |
| PBS | Solución Amortiguadora de Fosfatos |
| DMEM | Medio modificado de Dubelccos de Tagle |
| LB | Luria Bertani |
| <i>g</i> | Gravedad |

RESUMEN

El citoesqueleto es una fina malla de filamentos proteicos que le da forma, resistencia y movimiento a la célula, y le permite interactuar con su medio, cambiar de forma y moverse. El citoesqueleto de actina se forma al polimerizarse actina-G (globular) y generar actina-F (filamentosa). El citoesqueleto de actina es muy dinámico por estar en constante polimerización y despolimerización, lo que es regulado por proteínas denominadas de unión y de relación a actina, como el complejo Arp2/3, gelsolina y profilina, entre otras. Varios microorganismos patógenos, como *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), manipulan al citoesqueleto de actina para su beneficio. EPEC, se adhiere a la célula hospedera y mediante un sistema de secreción tipo III le trasloca proteínas efectoras al citoplasma como su propio receptor, la proteína Tir, la que interactúa con el citoesqueleto de actina, provocándole rearrreglos que forman elevaciones de la membrana plasmática, ricas en actina, llamadas pedestales o lesiones A/E (Attaching and effacing). Los mecanismos moleculares de las bacterias para formar pedestales se han estudiado con detalle, pero la dinámica del citoesqueleto durante la formación de pedestales no se ha estudiado con la misma profundidad, ni tampoco se cuenta con modelos efectivos, *in vitro*, para el estudio de la patogenia de EPEC y la dinámica del citoesqueleto. Con este trabajo se caracterizó el modelo de infección de células RK13 con EPEC que afecta a conejos (REPEC) para formar pedestales y se dio inicio al estudio de la dinámica del citoesqueleto de actina durante la formación de pedestales. Por epifluorescencia, al marcar actina con faloidina rodaminada, se mostraron puntos y prolongaciones celulares con mayos marca de actina parecidos a pedestales en infecciones por 4 h. El análisis por microscopio confocal mostró que estas prolongaciones, ricas en actina, son pedestales ya que, al empalmar el canal rojo con Nomarski coinciden las prolongaciones celulares relacionadas con bacterias. Además, en ensayos de inmunofluorescencia con doble marcaje, se ve la colocación de la marca de la bacteria con la marca de actina en los pedestales. Para el estudio ultraestructural de los pedestales, en este modelo, se prepararon muestras para microscopía electrónica de transmisión de infecciones de 4 h, en donde se mostraron los pedestales interactuando con la bacteria. Para el análisis de la plasticidad del citoesqueleto de actina, se infectaron células RK13 con REPEC, se tomaron muestras cada 30 min hasta 4 h, se marcó actina con faloidina rodaminada y analizaron por epifluorescencia, en donde se encontraron pedestales a partir de las 2 h de infección, al llevar más allá de 4 h la infección se ve que los pedestales se conservan e incluso van aumentando en longitud. Al eliminar la infección con antibiótico por 1 h, después de 4 h de infección, los pedestales tienden a desaparecer y al reinfectar las células por 2.5 h, se vuelven a formar los pedestales. Luego de caracterizar el modelo de infección RK13/REPEC para la formación de pedestales y tener evidencias de la plasticidad del citoesqueleto de actina, se continuó el estudio de la dinámica del citoesqueleto con la identificación subcelular del complejo Arp2/3, gelsolina y profilina, tomando muestras cada 30 min hasta 4 h de infección, se marcó actina con faloidina rodaminada y a las proteínas en estudio con anticuerpos policlonales. Al análisis con el canal rojo y verde simultáneamente de la microscopía confocal, se identificó colocación de la marca del complejo Arp2/3 con la marca de actina en los pedestales a partir de las 2.5 horas de infección. Desafortunadamente, en cambio, la marca de gelsolina y profilina no colocó con marca de actina a 4 h de infección. Este modelo puede ser muy útil para el estudio de la dinámica de las proteínas relacionadas con los rearrreglos del citoesqueleto de actina para la formación de pedestales y la patogenia de esta familia de bacterias que forman las lesiones A/E.

SUMMARY

The cytoskeleton is a network of protein filaments that give shape, resistance and movement to the cell. Then, allowing interaction with the medium and changing of forms and motility. Actin cytoskeleton is composed of F-actin; it is the result of assembly of G-actin. The actin cytoskeleton is dynamic since the filaments are assembling and disassembling on cell demands. These processes are regulated for ARPs and ABPs, such as Arp2/3 complex, gelsolin and profilin. Several pathogens have evolved the capacity to exploit the host cells' actin cytoskeleton for their survival, e.g., enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) that attach to intestinal epithelial cells, while remaining extracellular secrete and inject virulence factors into the host cells, via the type III secretion system. One of these proteins delivered into the host cells is Tir, which serves as the receptor for bacterial attachment onto host cells and to induce actin cytoskeletal rearrangement to form a pedestal-like structure, known as the attaching and effacement (A/E) lesions. The molecular mechanisms for pedestal formation by EPEC have been deeply studied but actin cytoskeleton dynamics have not been studied, neither any models of natural host have been developed to study EPEC pathogenesis and dynamics of the actin cytoskeleton. There are EPEC strains that infect rabbits (REPEC) and are genetically and pathologically similar to EPEC and can be considered one of the most relevant models for the study of the pathogenesis of EPEC. The aim of this work was to analyze the infection models RK13/REPEC by pedestal formation (A/E lesions) and to initiate the study of actin cytoskeleton dynamics into pedestal formation. RK13 cells infected with REPEC for 4 h were stained with TRITC labeled phalloidin and analyzed in epifluorescence and confocal microscopy - the infected cells showed actin condensation at several points at the cytoplasm. The actin condensations were confirmed by Nomarski images showing cell prolongations and interaction between bacteria and cell. When REPEC was marked with polyclonal antibodies, colocalization of the marked bacteria with actin staining in pedestals was found. These results suggest that REPEC induce pedestals formation in RK13 cells. In addition, a transmission electron microscopy study of RK13 cells infected for 4 h with REPEC showed the extracellular interaction of the bacteria on pedestals. Kinetics of infection every half an hour for 4 h, and stain actin with TRITC labeled phalloidin, epifluorescence microscopy study showed that after two hours pedestal structures had formed. In infections for more than 4 h, pedestal lengthening was observed and if the infection was eliminated with antibiotics, the pedestals disappeared. With re-infections of RK13 cells by REPEC for 2.5 h pedestals turned on, after which they disappeared. After characterizing the model RK13/REPEC by pedestal formation, we proceeded to the subcellular identification of Arp2/3 complex, galsolin and profilin by means of an immunofluorescence assay with the aim of initiating the actin cytoskeleton dynamics study. For 4 h, every 30 min after infection the cells were prepared and actin was stained with TRITC labeled phalloidin and the proteins in question were marked with polyclonal antibodies. Confocal microscopy analysis of all preparations of each of the proteins showed that the Arp2/3 complex colocalization with actin in pedestals was found 2.5 h after infection. Gelsolin and profilin were not found in pedestals. These results suggest that the Arp2/3 complex remains in pedestals for actin assembly to maintain pedestals. All these results, demonstrate that the dynamics of actin cytoskeleton are manifested in this infection model. This model will be of great utility to study the dynamics of actin cytoskeleton, and can also be used as an animal model in rabbits infected in natural hosts by REPEC.

INTRODUCCIÓN

Citoesqueleto de actina

El citoesqueleto es una fina malla de filamentos proteicos que le da forma, resistencia y movimiento a la célula, le permite interactuar con su medio, cambiar de forma y moverse, así como, realizar rearrreglos internos para crecer o dividirse. El citoesqueleto se constituye de microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina (Alberts et al., 2002; Pollard and Borisy, 2003). El citoesqueleto de actina se forma por la proteína más abundante de la célula, la actina, la cual se encuentra como actina-G o globular y actina-F o filamentosa (Welch and Mullis, 2002). La actina-G es una proteína monomérica polar de 43 kDa, formada por 4 subunidades y una hendidura que en el fondo presenta el sitio de unión a ATP y Mg^{+} (Fig. 1). La actina-G presenta mayor velocidad para polimerizar en el extremo más (+) que en el extremo menos (-) (Alberts et al., 2002; Darnell et al., 2005)

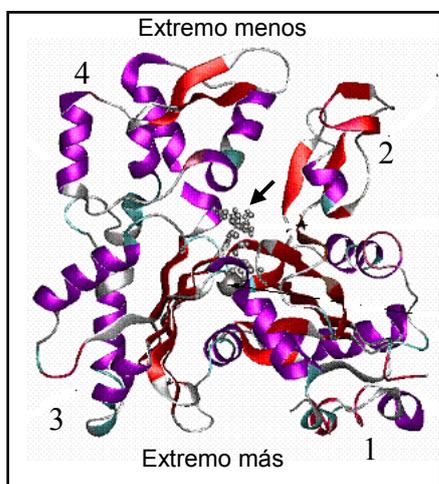


Fig. 1. Cristalografía de una molécula de actina-G. Consta de 4 subunidades, las subunidades 2 y 4 están separadas por una hendidura que en el fondo presenta el sitio de unión a ATP y Mg^{+} (flecha). La molécula de actina presenta polaridad, el polo más polimeriza con mayor rapidéz y el polo menos polimeriza con menor velocidad (Modificado de DosRemedios, 2003).

LA actina-G se encuentra unida a ATP o ADP (denominadas como actina T o actina D respectivamente), para poder polimerizar actina debe estar unida a ATP, al polimerizarse se hidroliza el ATP y se libera fósforo inorgánico (P_i), quedando como actina D en un estado inestable con tendencia a despolimerizar. Una vez que la actina-D

se libera, recambia ADP por ATP y queda nuevamente activa para su polimerización (Pollard and Borisy, 2003).

Los filamentos de actina se forman por dos protofilamentos dispuestos en forma de hélice que se entrecruzan para formar retículos o se unen paralelamente para formar haces (Pollard and Borisy 2003). La forma reticular es tridimensional en el citoplasma y plana en la corteza celular, esta última puede elevar la membrana plasmática para formar prolongaciones dinámicas como lamelipodios ó filopodios durante el movimiento celular, así como prolongaciones estáticas en las microvellosidades (Fig. 2A y B) (Svitkina and Borisy, 1999; Svitkina et al., 2003; Darnell et al., 2005).

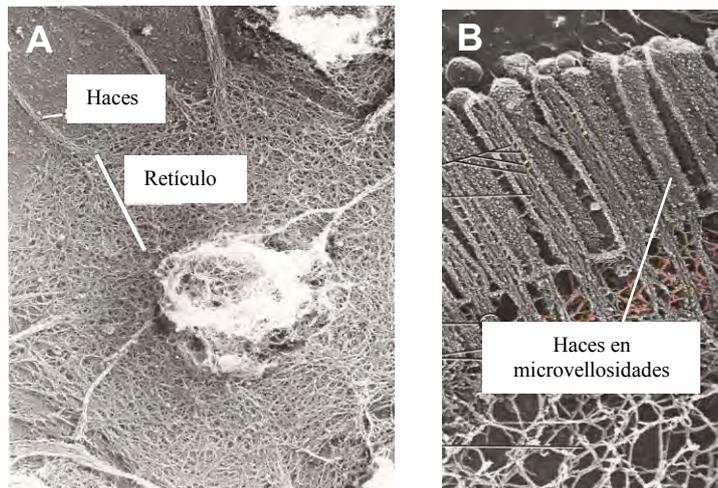


Fig. 2. Microscopía electrónica de barrido del citoesqueleto de actina. Panel A) Muestra la forma reticular del citoesqueleto de de actina dispuesto en el citoplasma y en la corteza celular. También muestra como se extienden los filamentos en forma de haces en las prolongaciones celulares. Panel B) Muestra una amplificación de haces de filamentos de actina en microvellosidades (Darnell et al., 2005).

La polimerización de actina consta de 3 fases: 1) fase de nucleación, consiste en la asociación de 3 ó 4 monómeros de actina para formar a un oligómero; 2) fase de elongación, es la agregación de actina-G en el extremo (+) del oligómero para formar un protofilamento; y 3) fase estacionaria, se refiere al estado de equilibrio entre la polimerización y despolimerización de actina en el filamento (Alberts et al., 2002). El

proceso de polimerización y despolimerización de actina es regulado por proteínas de unión y aquellas relacionadas a actina (ABPs y ARPs, respectivamente) como gelsolina, profilina y el complejo Arp2/3, entre otras (Welch and Mullins, 2002; Pollard and Borisy, 2003; Dos Remedios et al., 2003).

Proteínas que regulan la polimerización de actina

El complejo Arp2/3 es un conjunto de 7 proteínas, dos de las cuales son ARP, (Arp2 y Arp3), las otras 5 son pequeñas subunidades, llamadas p41, p34, p21, p20 y p16. Al unirse Arp2 y Arp3 forman el complejo Arp2/3 que al estar activado es capaz de inducir la nucleación de actina monomérica para iniciar su polimerización. El complejo Arp2/3 se encuentra inactivo en la célula y es activado por factores que promueven la polimerización de actina como la proteína WASP (del inglés Wiskott-Aldrich syndrome protein), estos factores al interactuar con el complejo Arp2/3 le provocan cambios conformacionales, lo que le permite unirse a monómeros de actina para su nucleación e iniciar la formación de un nuevo filamento de actina (Machesky et al., 1999; Weaver et al., 2003; Dayel and Mullins, 2004; Rodal et al., 2005) (Fig. 3A). Recientemente se ha visto que Arp2 hidroliza ATP, de manera similar a como lo hace actina para polimerizar, pero aún no se sabe si es determinante esta hidrólisis para unirse la actina y formar un sitio de nucleación (Kovar, 2006; Martin et al., 2006). El complejo Arp2/3 activo tiene la capacidad de unirse a los lados de filamentos preexistentes para formar ramificaciones con un ángulo de 70° (Fig. 3B y C). De esta manera se va formando un retículo de filamentos de actina que al extenderse, protruye a la membrana para formar prolongaciones como lamelipodios o filopodios en el borde líder de la célula durante su locomoción (Borisy and Svitkina, 2000; Pantaloni et al., 2000; Pollard and Borisy, 2003).

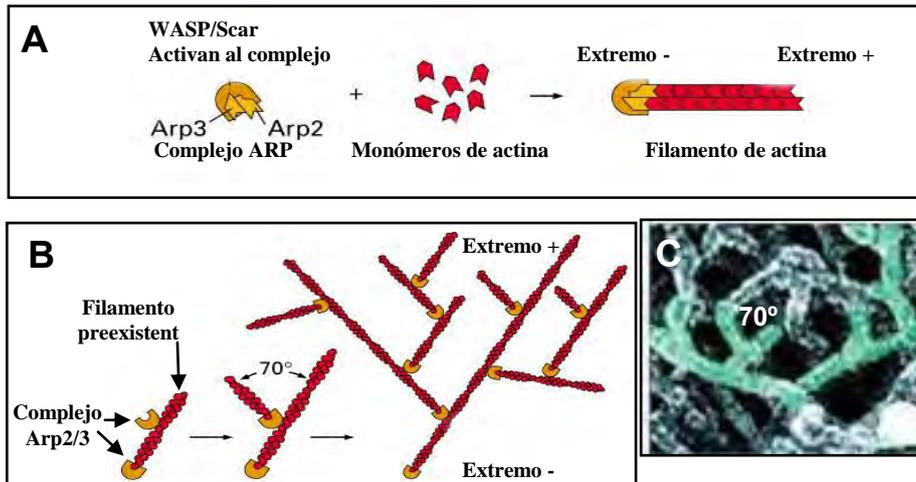


Fig. 3. Representación esquemática de cómo el complejo Arp2/3 inicia la polimerización de actina. A) El complejo Arp2/3 es activado por las proteínas WASP/Scar y nuclea monómeros de actina para iniciar la polimerización. B) El Complejo Arp2/3 tiene la capacidad de unirse a los lados de filamentos preexistentes e iniciar la polimerización de un nuevo filamento formando un ángulo de 70°. C) Micrografía electrónica de transmisión mostrando ramificaciones de filamentos de actina. Los filamentos se entrecruzan para formar una red que protruye la membrana plasmática para formar lamelipodios u otras prolongaciones celulares. (Tomado de Alberts et al., 2002)

Profilina es una pequeña proteína citosólica de 15 kDa que se encuentra esencialmente unida a monómeros de actina-G en una relación de 1:1 (Gutsche-Perelroizen et al., 1999). La profilina contribuye en el intercambio de ATP por ADP durante el ensamblaje de los monómeros de actina, para esto, se une en el lado opuesto de la hendidura de unión para ATP en los monómeros de actina permitiendo que las moléculas liberadas de los filamentos de actina puedan captar nuevamente ATP y reponer la concentración de actina-G. Otra función de profilina es liberar monómeros de actina-G compitiendo con timosina (una pequeña proteína “secuestradora” de actina) (Ballweber et al., 1998) para transportarlos al sitio de la célula donde la actina esté polimerizando, promoviendo su ensamblaje (Fig. 4). Profilina termina disociándose de actina por la interacción con PIP y PIP2 que le impiden mantenerse unida a actina. Dado que este fosfolípido es de membrana, al unirse con este elemento. Profilina también

participa en la transmisión de señales entre la membrana plasmática y el citoesqueleto (Dos Remedios et al., 2003; Darnell et al., 2005).

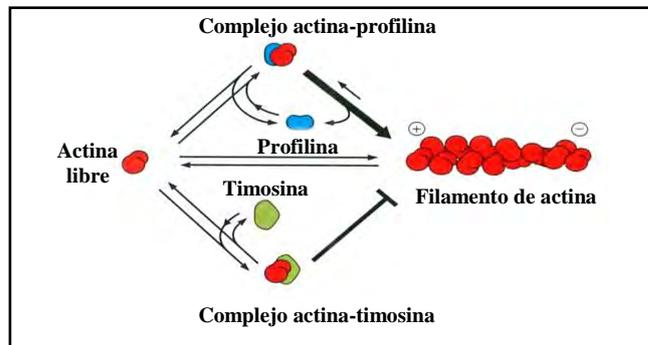


Fig. 4. Profilina compite con timosina. Actina es secuestrada por timosina y le evita que polimerice. Profilina se une al complejo actina-timosina, libera a monómeros de actina y los lleva al extremo más de filamentos de actina para su polimerización. De esta forma se mantiene el equilibrio entre monómeros secuestrados y libres (Tomado de Alberts et al., 2002)

Gelsolina es una proteína de 80 kDa que pertenece a la familia de las ABPs, se expresa en todas las células eucariotas y tiene una gran afinidad por los filamentos de actina. Gelsolina corta filamentos de actina al unirse a ellos, les provoca cambios conformacionales y afecta la tensión en las subunidades dando como resultado su separación (Fig. 5) (Renault et al., 2001; DosRemedios et al., 2003; McGough et al., 2003). Gelsolina además cubre el extremo (+) de los fragmentos de actina resultantes del corte, evitando así que se unan y polimericen, esta acción de gelsolina es regulada por calcio (Robinson et al., 1999; Choe et al., 2002). Al disminuir el calcio, se desactiva gelsolina y se desprende del extremo de filamento de actina que está cubriendo, este mecanismo proporciona un gran número de extremos que se pueden unir entre ellos generando una rápida extensión de filamentos que pueden redireccionar el movimiento celular (Southwick et al., 2000; DosRemedios et al., 2003). Por esta particularidad, gelsolina es esencial en movimientos rápidos de las células (Renault et al., 2001; McGough et al., 2003). Gelsolina también es regulada con la unión a PIP₂, el cual evita

que se una a actina. Así, la hidrólisis del PIP_2 libera a gelsolina que induce inmediatamente el corte de filamentos de actina (DosRemedios et al., 2003; Darnell et al., 2005).

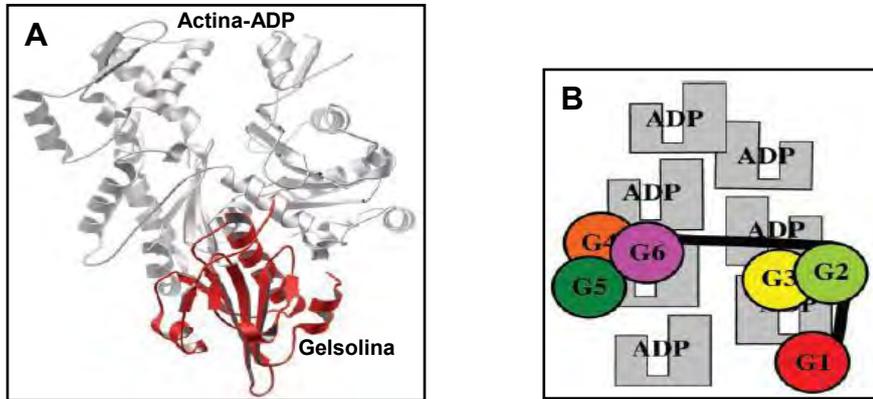


Fig. 5. **Gelsolina se une a filamentos de actina, los daña y los corta.** A) Gelsolina (rojo) unida a actina-ADP (gris) en su extremo (+). B) Esquema que muestra cómo las 6 unidades de gelsolina se unen a 3 monómeros de actina-ADP para provocarles cambios conformacionales y separarlas para producir el corte de los filamentos de actina. Con esto gelsolina colabora en la despolimerización de actina o en el redireccionamiento del ensamble de los filamentos (DosRemedios et al., 2003).

Existen otras proteínas que regulan la polimerización y despolimerización de actina como **cofilinas y timosina**. Las cofilinas son una familia de proteínas pequeñas de 15 a 19 kDa y se conocen como factores de despolimerización (ADF/cofilin). Estas proteínas se expresan en todas las células eucariotas y se distribuyen por todo el citoplasma de las células en reposo, en células en movimiento se reclutan a la zona cortical, en donde el citoesqueleto de actina es muy dinámico. Cofilina se une a los filamentos de actina, los despolimeriza y proporciona la rápida disposición de los monómeros de actina libres para unirse a ATP y polimerizar nuevamente en la formación de prolongaciones celulares como “ruffles” y lamelipodios, necesarios en el desplazamiento celular (Fig. 6). Las funciones celulares de cofilina son: 1) mantener la concentración de monómeros de actina para ser reciclados; 2) promover la despolimerización de filamentos de actina cuando ya no son necesarios o se encuentren

bloqueados en el extremo (+) por proteínas de recubrimiento (“camping”) como capZ; 3) nuclea fragmentos de filamentos de actina, principalmente los fragmentos bloqueados por CapZ; 4) Se une a actina D para bloquear el intercambio de nucleótidos e inhibir el ensamble de actina; y 5) daña filamentos de actina cortando grandes fragmentos (Alberts et al., 2002; DosRemedios et al., 2003; Darnell et al., 2005).

Timosina, es una proteína muy pequeña de aproximadamente 5 kDa, se encuentra distribuida en todas las células y su nivel de concentración varía entre tejidos, es muy alto en tejido nervioso y células circulantes como plaquetas, leucocitos y macrófagos. Su función es secuestrar monómeros de actina uniéndose a ellos en una relación de 1:1 para evitar que polimericen (Alberts et al., 2002).

Protrusión de la membrana plasmática por la polimerización de actina

Receptores de membrana captan señales extracelulares que activan a las pequeñas proteínas GTPasas de la familia Rho y a PIP₂, éstos a su vez, activan a factores de polimerización de actina como las proteínas WASP/Scar, las que al interactuar con el complejo Arp2/3 causan cambios conformacionales que le permiten unirse a dos monómeros de actina e iniciar la formación de un nuevo filamento. Como se mencionó antes, el complejo Arp2/3 se une a un lado de filamentos preexistentes en ángulo de 70° formando así, una malla de filamentos de actina que al ir creciendo protruye la membrana plasmática para formar extensiones celulares como lamelipodios (Fig. 6). La elongación de los filamentos de actina que protruyen la membrana plasmática, se controla con las proteínas de recubrimiento (proteínas “capping”) como CapZ. Estas proteínas cubren el extremo (+) de los filamentos y previenen el alargamiento excesivo de los filamentos de actina. Para la regresión de la protrusión membranal, las cofilinas y gelsolina cortan los filamentos de actina para liberar

monómeros de actina D. Los monómeros liberados son captados por profilina para catalizar el intercambio de ADP por ATP y proporcionar actina T para iniciar un nuevo ciclo de polimerización (Fig. 6) (Machesky et al., 1999; Golberg, 2001; Dos Remedios et al., 2003; Pollard and Borisy, 2003; Biyasheva et al., 2003; Millard et al., 2004; Martin et al., 2006).

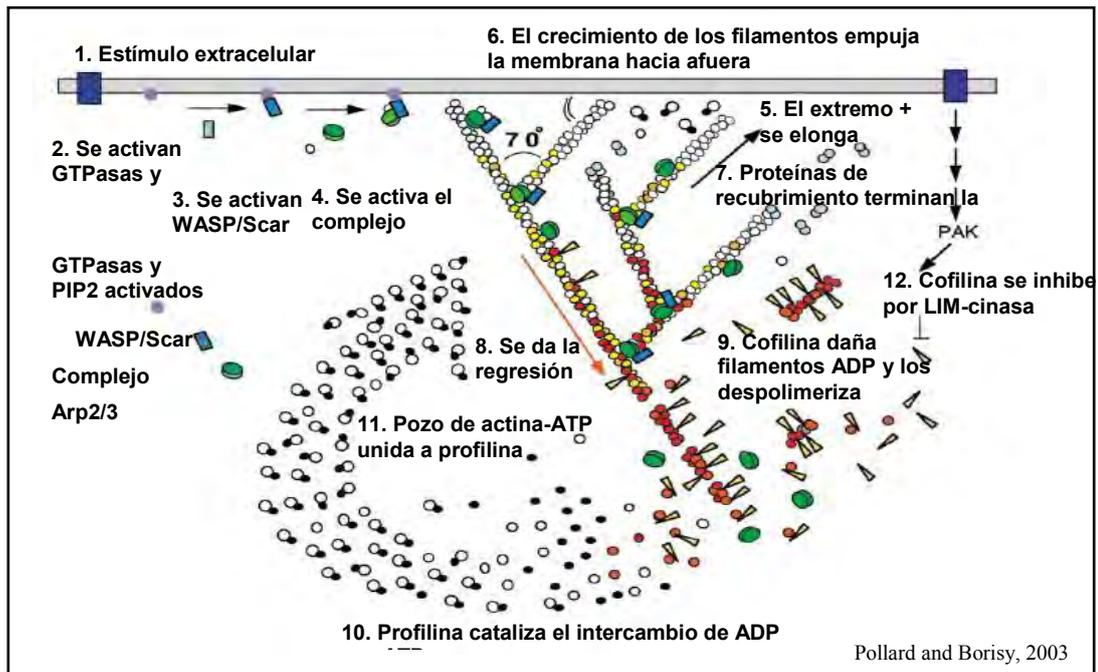


Fig. 6. Modelo de protrusión de membrana por la fuerza de polimerización de actina. Estímulos extracelulares activan a las GTPasas y PIP2, éstos activan a WASP/Scar que, a su vez, activan al complejo Arp2/3 que inicia la formación de un nuevo filamento formando un ángulo de 70° con otro preexistente, los filamentos que se van formando tienen su extremo (+) hacia la membrana que la protruyen al extenderse. La extensión de los filamentos la detienen las proteínas de recubrimiento, mientras que la protrusión membranaral se retrae al ser dañados los filamentos por cofilina y despolimerizarse liberando actina unida a ADP. Profilina cataliza el intercambio de ADP por ATP en actina despolimerizada y la lleva a polimerizar nuevamente (Pollard y Borisy, 2003; Millard et al., 2004)

Microorganismos patógenos manipulan el citoesqueleto para su beneficio

Los microorganismos patógenos a través de su evolución han adquirido mecanismos moleculares para manipular diferentes sistemas de las células hospederas para su beneficio. Ante esto, en las tres últimas décadas ha resurgido un gran interés en estudiar los mecanismos celulares y moleculares en la patogenia microbiana (Vallance

and Finlay, 2000; Gruengeid and Finlay, 2003). Muchos trabajos se han enfocado a estudiar los mecanismos empleados por diversas bacterias para explotar los componentes celulares como la membrana plasmática, vías de transducción de señal y el citoesqueleto para colonizar e internalizarse a la célula hospedera para replicarse, desplazarse dentro de ella y salir para alcanzar a otra célula vecina (Fig. 7) (Suzuki and Sasakawua, 2001; Gouin et al., 2005). Existen patógenos extracelulares que también aprovechan sistemas celulares como el citoesqueleto de actina, ya que cuentan con procesos moleculares para unirse a la célula hospedera y por complicados mecanismos traslocan proteínas efectoras que manipulan vías de transducción de señal y producen rearrreglos del citoesqueleto para su beneficio (Vallance and Finlay, 2000; Gruenhaid and Finlay, 2003; Gouin et al., 2005).

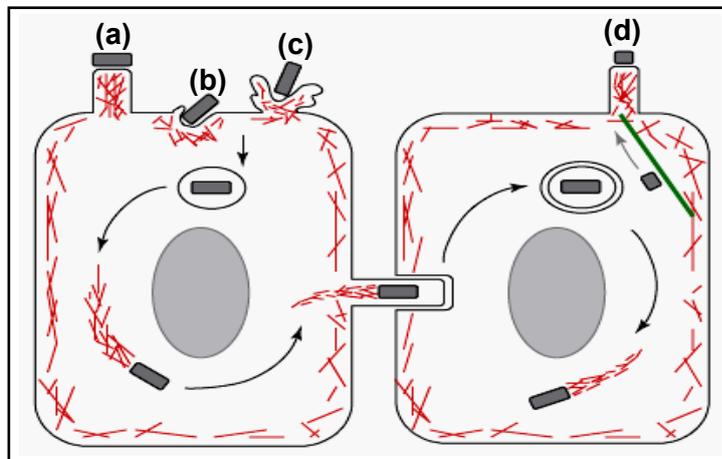


Fig. 7. Representación esquemática de varios estados de infección por (a) EPEC, (b) *Listeria*, (c) *Shigella* y (d) Virus vaccinia. EPEC se une a la membrana de la célula hospedera y le inyecta proteínas efectoras para generar rearrreglos del citoesqueleto y formar pedestales. *Listeria* entra a la célula no fagocítica por el mecanismo de cremallera y se desplaza mediante la polimerización de actina. *Shigella* se internaliza por el mecanismo de disparo y también se desplaza por polimerización de actina. El virus vaccinia se desplaza por microtúbulos y es expulsado por filamentos de actina formando un pedestal (Gouin et al., 2005).

Listeria monocitogenes, *Shigella flexneri* y *Rickettsia spp*, son ejemplos de patógenos intracelulares que explotan el citoesqueleto de actina de la célula hospedera, para esto cuentan con factores que activan al complejo Arp2/3 similar a como lo hacen los factores de las células eucariotas que activan al complejo. Así, estos patógenos aprovechan la fuerza de propulsión de polimerización de actina para moverse dentro de la célula y salir para alcanzar otra célula vecina e invadirla (Goldberg et al., 2001; Lee and De Camilla, 2002; Gouin et al., 2005).

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es una de las bacterias extracelulares que manipulan el citoesqueleto de actina para su beneficio, se adhiere a la superficie externa de los enterocitos e inyecta sus proteínas efectoras para afectar la célula huésped (Gruenheid and Finlay, 2003; Gouin et al., 2005; Marjomäki and Schaible, 2005).

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**

EPEC es una bacteria Gram negativa que causa diarrea aguda y persistente en niños, además de una alta mortalidad y morbilidad en países en desarrollo (Cantey and Blake, 1997; Nataro and Kaper, 1998). EPEC afecta humanos y animales como el conejo, ratón, perro, porcino, ovino y bovino (Moon et al., 1983; Knutton et al., 1987; Kenny and Finlay, 1997; Sekiya et al., 2001; Gruenheid and Finlay, 2003). En su patogenia EPEC coloniza la mucosa intestinal, destruye las microvellosidades y produce las lesiones A/E (del Inglés “attaching and effacing”) que se manifiestan con la formación de elevaciones de la membrana plasmática ricas en actina de la célula huésped, denominadas pedestales (Moon et al., 1983; Knutton et al., 1987; Kenny and Finlay, 1997; Freeman et al 2000; Sekiya et al., 2001) (Fig. 8).

Los mecanismos moleculares para la formación de las lesiones A/E empieza con la adhesión inicial de EPEC a la célula huésped mediante el pilus BFP, luego hay

destrucción de microvellosidades. Posteriormente, mediante un sistema de secreción tipo III (TTSS) (Fig. 9A), EPEC trasloca proteínas efectoras desde su interior hasta el citoplasma de la célula huésped incluyendo a su propio receptor, Tir (del inglés “translocated intimin receptor”) (Kenny et al., 1997). Tir se inserta en la membrana plasmática adquiriendo la forma de un asa con cinco dominios, siendo el dominio central el que queda expuesto, dos dominios son transmembranales y dos dominios intracitoplasmáticos (Kenny, 1999). Tir interactúa con el dominio expuesto, con una proteína de superficie bacteriana, denominada intimina (Fig. 9B) (Bachelor et al., 2000) mientras que con los dominios intracitoplasmáticos interactúa con el citoesqueleto de actina provocando el reclutamiento de proteína de unión y de relación a actina por debajo del sitio de unión de la bacteria. Este proceso desencadena rearrreglos del citoesqueleto de actina para la formación de los pedestales (Fig. 9B) (Cantarelli et al. 2001; Gruenheid et al., 2001; Gosney et al. 2001; Campellone et al., 2002; Huang et al., 2002; Tampakaki et al., 2004).

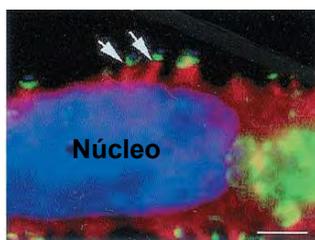


Fig. 8. **Inmunofluorescencia de los pedestales.** Células HeLa infectadas con EPEC mostrando elevaciones de la membrana ricas en actina que forman los pedestales (flechas). El núcleo de la célula hospedera se marcó con DAPI. La barra indica 5 μm . (Tomado de Goosney et al., 2001)

La capacidad de EPEC para formar las lesiones A/E depende del TTSS, el cual está constituido por proteínas codificadas en varios genes bacterianos que se ubican en la isla de patogenicidad llamada LEE (del inglés “Locus of Enterocyte Effacement”) (McDaniel and Kaper, 1997; Abe et al., 1998; Elliott et al., 1998). Las proteínas expresadas por los genes de LEE incluyen las que forman el TTSS, más las proteínas efectoras que son translocadas al citoplasma de la célula huésped a través del TTSS

(Germandia et al., 2005 and Chen et al., 2005). Para inducir la formación de pedestales por EPEC, es necesario que Tir sea fosforilado en sus dominios intracitoplasmáticos (DeVinney et al., 2001; Frankel et al., 2001; Campellone and Long, 2005; Chen and Frankel, 2005). Tir interactúa con actina y otras proteínas del citoesqueleto, altera vías de señalización activando WASP mediante la proteína adaptadora Nck para que, a su vez, active al complejo Arp2/3 e inicie la polimerización de actina para formar los pedestales (Carlier et al., 2001; Gruenheid et al., 2001; Campellone et al., 2002; Campellone et al., 2004).

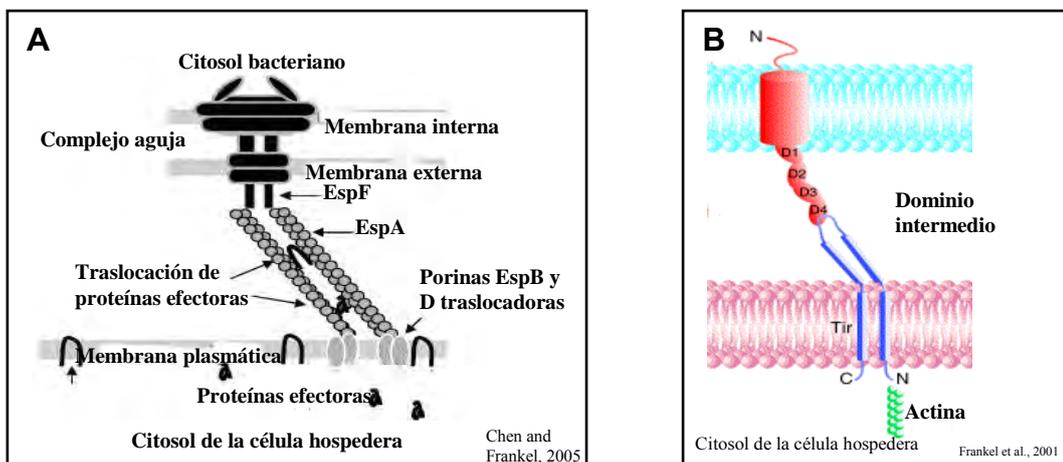


Fig. 9. Modelo esquemático del sistema de secreción tipo III. (Panel A) Una serie de anillos se ensamblan en las membranas interna y externa de la bacteria para soportar el complejo aguja. EspA polimeriza para extender el filamento y alcanzar la célula huésped. EspB y D son traslocadas a la membrana de la célula hospedera para formar poros. A través de todo el aparato que forma el TTSS, se traslocan proteínas efectoras hasta el citoplasma de la célula huésped como Tir. (Panel B) Tir se fosforila, interactúa con el citoesqueleto de actina y se ancla a la membrana de la célula hospedera quedando un dominio intermedio expuesto para interactuar con intimina y con los dominios C y N-terminal provoca rearrreglos del citoesqueleto para formar los pedestales.

Reclutamiento de proteínas al sitio de formación de los pedestales

Se han identificado proteínas ABPs y ARPs entre las reclutadas a los sitios de unión bacteriana y en los pedestales. Freeman et al., (2000) reportaron proteínas ubicadas en toda la extensión del pedestal como α -actinina, el complejo Arp2/3, VASP,

WASP, ERM, talina, villina y vinculina, y en la base de los pedestales a miosina y tropomiosina (Fig. 10). Goosney et al. (2001), estudiaron 25 proteínas para saber cuáles

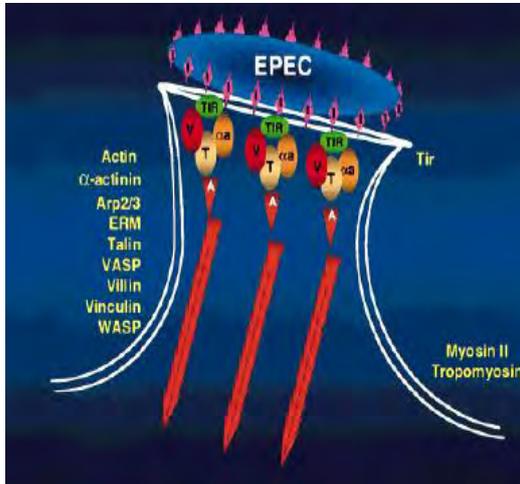


Fig. 10. Modelo de un pedestal con proteínas del citoesqueleto reclutadas. Este modelo muestra la ubicación de las proteínas que se unen a Tir en los pedestales y su posición con respecto a los filamentos de actina. Las proteínas enlistadas en el lado izquierdo se han encontrado distribuidas en toda la extensión de los pedestales y las del lado derecho en la base de los mismos. (Tomado de Freeman et al., 2000).

se reclutaban a los pedestales formados por EPEC en células HeLa encontrando, además de las proteínas reportadas por Freeman et al. (2000) a calpactina, cofilina, gelsolina, zixina, cortactina, ezrina y paxilina, la proteína de membrana CD40 y proteínas adaptadoras Grb2, CrkII y Shc. Zobiak et al. (2001) identificaron reclutada en los pedestales a la anexina 2, mientras que Batchelor et al. (2004) encontraron que una proteína de filamentos intermedios, la citoqueratina 18 interactúa con Tir. Otros estudios han reportado que varias de estas proteínas son indispensables para la formación de los pedestales, como talina y cortactina (Cantarelli et al., 2001; 2002; 2006), la proteína adaptadora Nck que es necesaria para reclutar a WASP y activar al complejo Arp2/3, por lo que es esencial para la formación de pedestales (Gruenheid et al., 2001; Campellone et al., 2002). Lommel et al. (2004) demostraron que N-WASP también es necesaria para formar los pedestales al activar al complejo Arp2/3, aunque los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos aún no se conocen (Unsworth et al., 2006). Estudios recientes in vivo, siguen investigando la importancia

de la interacción Tir-intimina para la colonización de diferentes hospederos y viendo la función de proteínas acopladoras (EccP) como EspF en la formación de pedestales de actina (Vlisidou et al., 2006).

***Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC)**

Escherichia coli enteropatógena para conejo (REPEC) forma pedestales en los enterocitos de conejo (Robins-Browne et al., 1994), de manera similar a como lo hace EPEC en los enterocitos de humano (Zhu et al., 2001), de ahí que la infección de la mucosa intestinal de conejo por REPEC se considere un modelo animal muy importante para las investigaciones sobre la patogenia de EPEC en un huésped natural (Milon et al., 1999). Otro modelo animal considerado importante para el estudio de infecciones de EPEC y EHEC es *Citrobacter rodentium* que afecta a ratones. *C. rodentium* coloniza el intestino grueso del ratón, trasloca a Tir a la célula hospedera para formar pedestales en una forma similar a EPEC y produce hiperplasia de colon (Deng et al., 2003). Este modelo tiene limitantes, una importante es que *C. rodentium* no es del mismo género de *E. coli* y otras son que produce hiperplasia sin aparente inflamación, infecta al colon y no al intestino delgado y no provoca diarrea a los ratones. Por otro lado, también se han usado líneas celulares (HeLa, PtK2, Caco-2) como modelos para estudiar los mecanismos moleculares y los rearrreglos del citoesqueleto en infecciones de EPEC (Sanger et al., 1996; Goosney et al., 2001; Freeman et al., 2000; Shaner et al., 2005). En este sentido, también es posible utilizar REPEC para infectar la línea celular RK13 (células epiteliales de riñón de conejo) para después llevarlo al hospedero natural, el conejo (Milon et al., 1999). Hasta ahora, únicamente Marchés et al., (2000), ha utilizado este modelo para conocer el papel de Tir e intimina como factores de virulencia en la infección con REPEC, usando la cepa O103 silvestre y mutantes en intimina y Tir.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El citoesqueleto de actina es un sistema importante y dinámico de la célula por estar en constante polimerización y despolimerización para responder a movimientos que necesiten las células. A través de la evolución los microorganismos patógenos han adquirido mecanismos para manipular sistemas de la célula hospedera para su beneficio, como EPEC que trasloca proteínas efectoras al citoplasma de la célula hospedera, mediante un sistema de secreción tipo III, causando daño al citoesqueleto de actina. Una de las proteínas efectoras que trasloca EPEC es su propio receptor, la proteína Tir, que se ancla a la membrana plasmática para actuar como receptor de la proteína se superficie bacteriana, llamada intimina (Keny et al., 1997). Con sus dominios intracitoplasmáticos, Tir interactúa con proteínas del citoesqueleto de actina para provocarle rearrreglos y formar elevaciones de la membrana plasmática, ricas en actina, conocidas como pedestales por debajo del sitio de unión de la bacteria (Nataro and Kaper, 1998). En los pedestales, además de la acumulación de filamentos de actina, se han identificado reclutadas varias proteínas del citoesqueleto como WASP, el complejo Arp2/3, gelsolina, profilina, α -actinina, talina, villina y vinculina entre otras (Sanger et al., 1996; Freeman et al., 2000; Goosney et al., 2001). Los mecanismos moleculares bacterianos para la formación de pedestales se han estudiado con detalle, pero la dinámica de las moléculas del citoesqueleto de actina no se ha realizado con la misma amplitud.

Debido a que el hospedero natural de EPEC es el humano, se han tenido limitaciones para estudiar con detalle los mecanismos moleculares de su patogenicidad, por eso se han utilizado modelos, *in vitro*, en líneas celulares que en su mayoría han sido de origen humano. *in vivo*, se ha trabajado en animales pero se han utilizado muy poco como el conejo con REPEC y en ratón con *C. rodentium*. Con el propósito de contar

con un modelo celular que se pueda controlar a nivel laboratorio y poder seguir estudiando los mecanismos moleculares de las infecciones de EPEC y otras bacteria formadoras de las lesiones A/E y determinar la dinámica de las proteínas del citoesqueleto de actina durante la formación de pedestales, se analizó un modelo de infección en una línea celular que sea del hospedero natural como las células RK13 infectadas con REPEC y así realizar el estudio molecular detallado para contestar preguntas como las siguientes: ¿en qué tiempo y orden se dan los eventos moleculares desde el inicio de la infección?, ¿en dónde se ubican las diferentes moléculas durante el reacomodo del citoesqueleto de actina?, ¿qué moléculas son activadas y desactivadas? y ¿cómo y quién regula la polimerización y despolimerización de actina en la formación de pedestales?, entre otras.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar el modelo de infección REPEC/RK13 para la formación de pedestales *in vitro* y dar inicio al estudio de la dinámica del citoesqueleto de actina y de proteínas de unión a actina durante los rearrreglos del citoesqueleto que se dan en la formación de los pedestales a diferentes tiempos de infección.

Objetivos particulares

1. Analizar la formación de pedestales por epifluorescencia, microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión en el modelo de infección RK13/REPEC.
2. Determinar por inmunofluorescencia, el tiempo de infección en el que se presentan los pedestales en células RK13 infectadas con REPEC.
3. Realizar el estudio temporal de los pedestales formados en células RK13 infectadas con REPEC durante 4 h de infección.
4. Analizar el comportamiento de los pedestales después de 4 h de infección de células RK13 por REPEC.
5. Determinar el comportamiento de los pedestales al eliminar la infección y durante la reinfección.
6. Conocer la localización subcelular, cada 30 minutos del complejo Arp2/3, gelsolina y profilina en células RK13 infectadas por REPEC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Línea celular y cepa bacteriana utilizados en este estudio

Para este trabajo se utilizó la línea celular RK13 (células epiteliales derivadas de riñón de conejo). Las células se cultivaron utilizando medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomicina (5000 UI de penicilina/500 µg de estreptomicina por ml) a 37° C con una atmósfera de 5% de CO₂. La cepa bacteriana utilizada en este trabajo fue E22 serotipo O103 de *Escherichia coli* enteropatógena que afecta al conejo (REPEC). Las bacterias fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) sin antibiótico.

Reactivos y anticuerpos

Para marcar actina-F se usó faloidina rodaminada (TRITC labeled Falloidin, Sigma) a una dilución de 1:100. Para identificar al complejo Arp2/3, gelsolina y profilina se utilizaron anticuerpos policlonales hechos en cabra (Goat polyclonal IgG, Santa Cruz) para cada proteína, a una dilución 1:20 en PBS. La bacteria REPEC se marcó con un anticuerpo policlonal que reconoce proteínas de superficie bacteriana con el que se cuenta en nuestro laboratorio (Suero Polivalente anti E2348/69), también se usó a una dilución 1:20.

Infección de células RK13 con REPEC

Las células RK13 fueron crecidas hasta 70 a 80% de confluencia, en cajas de cultivo a las que se le depositaron cubreobjetos de vidrio estériles con el fin que las células crecieran adheridas a éstos. Para la infección de los cultivos celulares, se tomó con asa estéril una colonia de REPEC y se inoculó en 5 ml de medio de cultivo LB. El cultivo se incubó toda la noche a 37° C con agitación constante (200 rpm). Al siguiente

día se adicionó 2 ml de DMEM al cultivo bacteriano y se incubó por 2 h más bajo las mismas condiciones, después se centrifugó a $2500 \times g$ durante 3 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 ml de DMEM. Los cultivos celulares se lavaron tres veces con DMEM no suplementado, sin antibiótico y se dejaron con 2 ml de DMEM sin antibiótico, se adicionaron 50 μ l de la resuspensión del cultivo bacteriano y se mantuvo el cultivo celular con las bacterias en incubación a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante el tiempo requerido para los diferentes experimentos.

Ensayos de inmunofluorescencia (IF)

Para estos ensayos nos basamos en lo reportado por Goosney et al., 2001, modificando lo necesario para adaptarlo nuestra línea celular. Las células RK13 crecidas en cubreobjetos fueron infectadas con REPEC durante el tiempo requerido para cada experimento (4 a 7 horas). Para los ensayos de IF, se tomaron los cubreobjetos con las células infectadas y se lavaron con amortiguador salino de fosfatos (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.2 durante 20 min (todos los pasos se hicieron a temperatura ambiente excepto cuando se indique otra cosa). Las células fijadas se lavaron gentilmente 6 veces con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% durante 15 min, se lavaron nuevamente 6 veces con PBS y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS durante 20 min. Se hicieron tres tipos de marcaje, cultivos en los que únicamente se marcó actina, cultivos en los que se marcó actina y a la bacteria y cultivos en los que se marcó actina y Arp2. Para los primeros cultivos, después de bloquear con BSA se incubaron 20 min con faloidina rodaminada. En el caso de los cultivos de dobles marcajes, se bloquearon con BSA durante 20 min, luego se incubaron por toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario (anti E2348/69 para

proteínas de superficie bacteriana o los anti-Arp2, gelsolina y profilina) y se lavaron con PBS. Después de las dos horas, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína por 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron los cultivos con PBS y finalmente se incubaron con faloidina rodaminada durante 20 min. En todos los casos al final se lavaron los cultivos con PBS y se montaron en portaobjetos con gelvatol (SIGMA) y parafenildiamina al 10% para analizarlos al microscopio de epifluorescencia y confocal.

Microscopía confocal

Las muestras preparadas por inmunofluorescencia, se observaron al microscopio confocal (Leica, SP2), se realizaron cortes ópticos de 0.5 μ a 66 y 100 aumentos, haciendo el análisis de las muestras en secciones, colectas y en “merge” o empalme. Se hicieron tomas de imágenes con óptica de Nomarski para mostrar las células y bacterias, luego se hizo la sobreposición de la imagen marcada para mostrar la colocalización de las proteínas en estudio con los pedestales y su relación con la bacteria.

Microscopía electrónica de transmisión

Los cultivos celulares se crecieron e infectaron por 4 h como se indicó anteriormente y se fijaron con solución de Karnouski (5.6 ml de glutaraldehído al 25%, 11.2 ml de paraformaldehído al 10%, 13.2 de agua desionizada, 26 ml de PBS, pH 7.4) esto dio un volumen total de 56 ml quedando los porcentajes finales de los fijadores como sigue: glutaraldehído 2.5%, paraformaldheido 20%. Posteriormente la monocapa se levantó con gendarme y las células se lavaron tres veces con PBS centrifugando a 1000 \times g por 3 min. Se lavaron 3 veces con agua bidestilada filtrada. Se postfijaron con 0.5 ml de tetraóxido de osmio al 1% en PBS por 1 h, se centrifugaron 1000 \times g por 3

min y lavaron 3 veces con agua bidestilada. Las muestras fueron deshidratadas con alcoholes a concentraciones ascendentes (30, 50 y 70% por 10 min y 100% durante 20 min). Posteriormente las células se incluyeron en resina de Spurr, pasando las muestras sucesivamente en soluciones de resina/alcohol absoluto a diferentes diluciones (1:3, 2:2 y 3:1) durante 2 h en cada una, para posteriormente incluir la muestra en resina pura, en dos incubaciones de 2 h y 1 h, respectivamente, para finalmente polimerizar la resina a 60° C durante 36 h. Una vez incluidas las muestras, se realizaron cortes ultrafinos los cuales fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser analizados al microscopio electrónico de transmisión (Jeol M 900).

RESULTADOS

Células RK13 infectadas con REPEC denotan sitios ricos en actina, los pedestales

Como prueba inicial para caracterizar la formación de pedestales con el modelo de infección RK13/REPEC, se prepararon monocapas de células RK13 y se infectaron con cultivos bacterianos de REPEC O132. A las 4 h post-infección, las células se prepararon para microscopía de fluorescencia, la actina polimerizada fue teñida con faloidina rodaminada tanto en células infectadas como no infectadas. Las preparaciones se observaron al microscopía de epifluorescencia y confocal. Las células no infectadas mostraron la característica disposición del citoesqueleto de actina de células normales, viéndose las fibras de tensión con claridad (Fig. 11A). Mientras que las células RK13 infectadas con REPEC mostraron acúmulos de actina dentro del citoplasma de dichas células (Fig. 11B); estas estructuras ricas en actina son características de los pedestales formados en células humanas infectadas con EPEC aislada de niños.

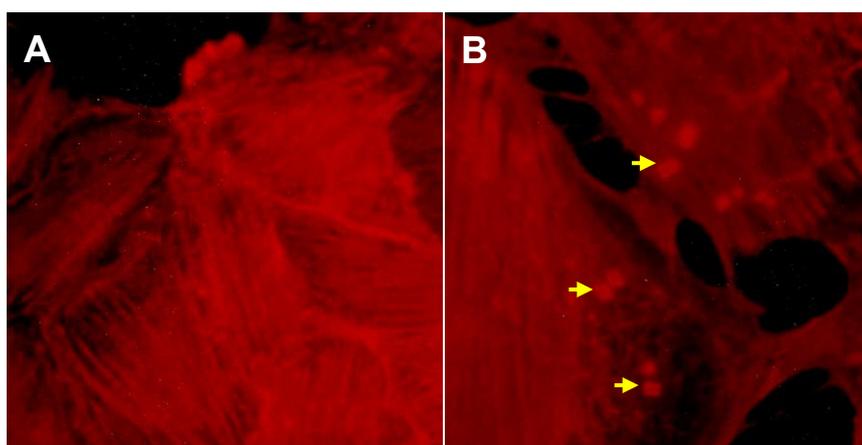


Fig. 11. Epifluorescencia de células RK13 infectadas con REPEC muestran sitios de mayor marca de actina. Células RK13 fueron crecidas, se infectaron con REPEC por 4 h y se marcó actina con faloidina rodaminada. (Panel A) células no infectadas no muestran sitios específicos de marca de actina. (Panel B) células infectadas por 4 h muestran varios puntos específicos de mayor marca de actina (flechas). Esto sugiere la formación de pedestales.

Para identificar inequívocamente que estos acúmulos de actina fueran pedestales ricos en actina, las preparaciones de células infectadas con REPEC fueron analizadas por epifluorescencia a una resolución de 100X. Con esto fue posible identificar varias prolongaciones celulares con mayor marca para F-actina (Fig. 12A), en contraste las células no infectadas estas estructuras estuvieron ausentes (Fig. 12B). Estos resultados mostraron que las bacterias REPEC fueron capaces de formar pedestales en las células epiteliales de riñón de conejo.

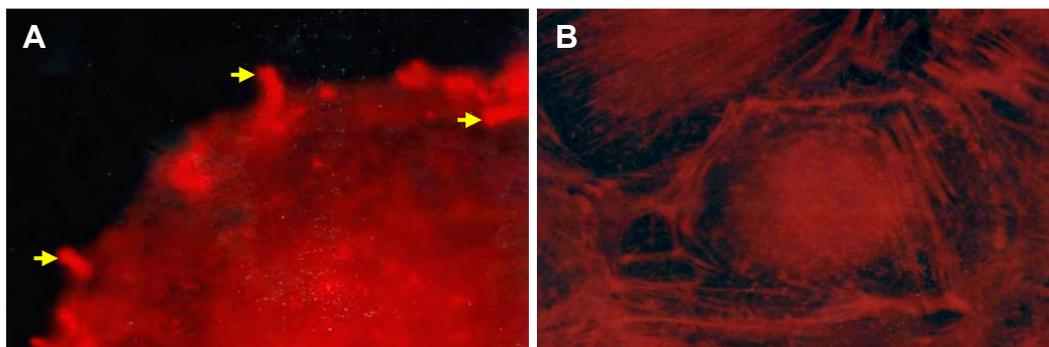


Fig. 12. Epifluorescencia a 100X que muestra prolongaciones celulares ricas en actina en células infectadas. (Panel A) células RK13 fueron infectadas con REPEC por 4 h y se marcó actina con faloidina rodaminada. (Panel B) células RK13 no infectadas que fueron teñidas con faloidina rodaminada. Al análisis con el objetivo de 100X, de microscopía de epifluorescencia, se mostraron prolongaciones celulares con mayor marca de actina en células infectadas (flechas). Estos resultados indican la formación de pedestales.

Uso de microscopia confocal para caracterizar los pedestales de actina y su asociación con la bacteria en células RK13 infectadas con REPEC

Para corroborar si los sitios ricos en F-actina y las prolongaciones celulares vistas en epifluorescencia se relacionaron con la bacteria infectante y las elevaciones de la membrana plasmática, las células RK13 infectadas con REPEC por 4 h se analizaron por microscopía confocal mediante el uso del canal rojo (faloidina rodaminada) y contraste de interferencia de Nomarski. Las imágenes obtenidas por microscopia confocal usando el canal rojo mostraron una mejor definición del citoesqueleto de

actina, en el cual se observaron claramente las fibras de tensión de actina teñidas con faloidina rodaminada y los acúmulos de actina causados por la infección por REPEC (Fig. 13A). Un acercamiento para resolver una de las células que contenía los acúmulos de actina, mediante el microscopio confocal, mostró claramente que estas estructuras eran de hecho pedestales ricos en actina (Fig. 13B). El análisis por Nomarski de este mismo campo de observación mostró que las prolongaciones celulares comprendieron la membrana plasmática y sobre las prolongaciones se encuentran adheridas las bacterias (Fig. 13C). La superposición del canal rojo por microscopía confocal y la óptica de Nomarski, mostró claramente como los pedestales de actina prolongaron la membrana plasmática de la célula epitelial posiblemente debido a la señalización celular causada por la bacteria adherida íntimamente a la membrana plasmática (Fig. 13D). Estos resultados demuestran que el modelo de infección de células RK13 por REPEC reproduce claramente los rearrreglos al citoesqueleto de actina por esta bacteria para producir los pedestales ricos en actina.

Interacción bacterias extracelulares y pedestales ricos en actina intracelulares

Para corroborar la relación de los pedestales con las bacterias, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con doble marcaje. En células infectadas con REPEC por 4 h, se marcó a REPEC con un anticuerpo policlonal que reconoce proteínas de superficie bacteriana, mientras que la actina celular se marcó con faloidina rodaminada. Las muestras se analizaron al microscopio confocal usando simultáneamente el canal verde y el rojo para detectar tanto a la bacteria como al citoesqueleto de actina. El análisis por microscopía confocal mostró que la bacteria, teñida en verde debido al anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína. Dicha marca se encuentra justo por encima de los pedestales ricos en actina marcados en rojo por la decoración con

faloidina rodaminada (Fig. 14). Estos datos claramente muestran la adhesión íntima de las bacterias a las células epiteliales y la inducción de los pedestales ricos en actina por la bacteria adherida.

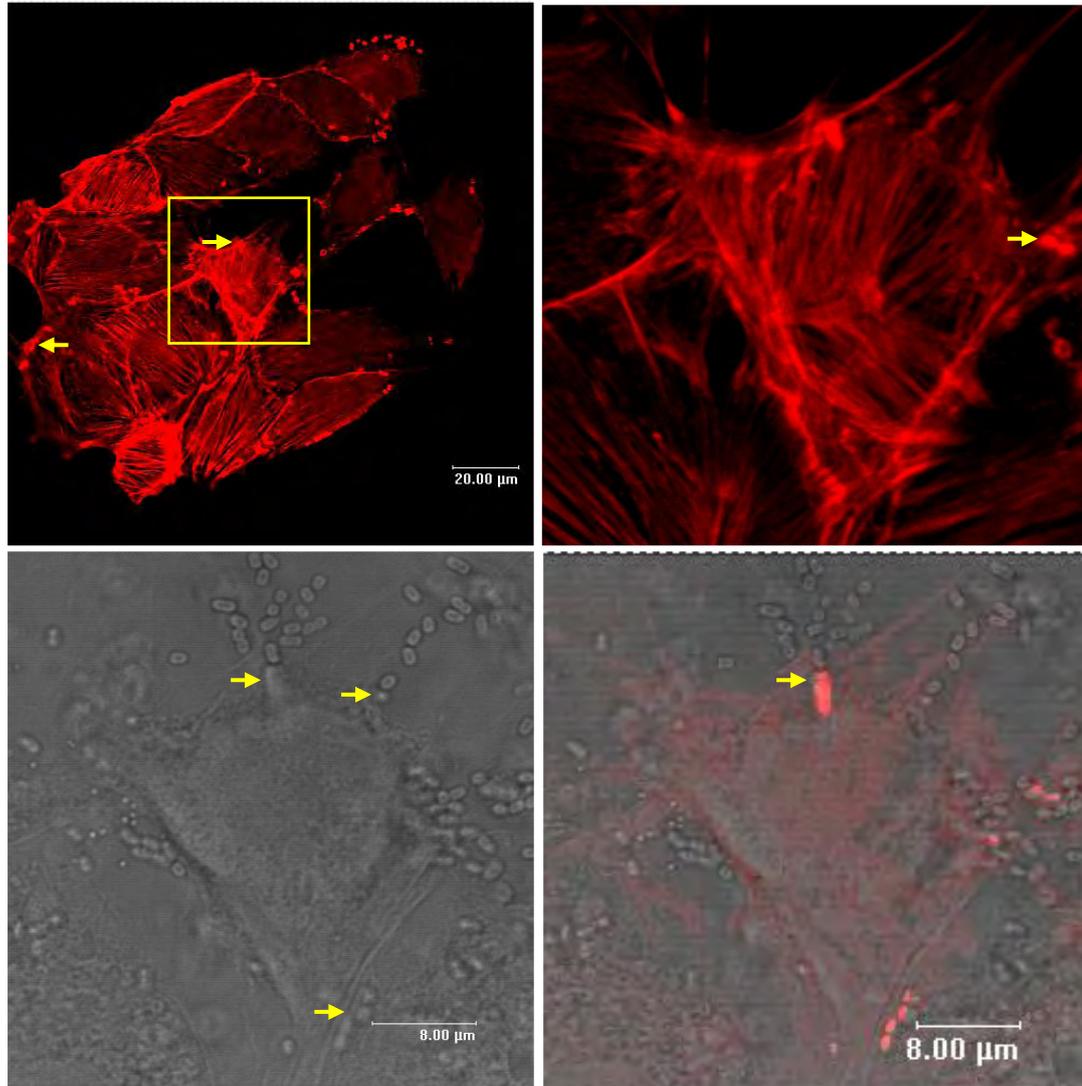


Fig. 13. Cortes ópticos y Nomarski de células RK13 infectadas con REPEC por 4 h. Se prepararon muestras de células RK13 infectadas con REPEC, se marcó actina con faloidina rodaminada y se analizaron con microscopio confocal y Nomarsky. (Panel A) se muestran sitios de mayor marca de actina (flechas). (Panel B) Amplificación del área del cuadro de A que muestra sitios de marca de actina (flechas). (Panel C) Nomarski del recuadro de A donde se muestran varias prolongaciones celulares (flechas) con bacterias adheridas. (Panel D) Sobreposición de la marca de actina (rojo) con las prolongaciones celulares (gris). Estos resultados muestran claramente la formación de pedestales con este modelo de infección.

Detección ultraestructural de los pedestales de células RK13 infectadas con REPEC

Para analizar de manera directa los pedestales inducidos por REPEC en células RK13 infectadas por 4 h y no infectadas con REPEC, se procesaron para microscopía

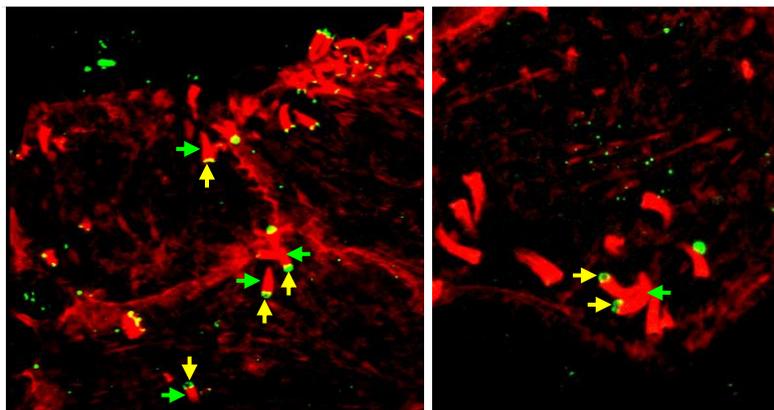


Fig. 14. Colocalización entre REPEC y los pedestales ricos en actina. Células RK13 fueron infectadas con REPEC por 4 h. Se marcó actina con faloidina rodaminada y la bacteria con un anticuerpo policlonal que reconoce proteínas de superficie bacteriana. Al análisis por microscopía confocal se mostraron varios pedestales (flechas verdes) y las bacterias (flechas amarillas) adheridas en el extremo de estas prolongaciones celulares con mayor marca de actina. Estos resultados corroboran la relación íntima de las bacterias con los pedestales.

electrónica de transmisión. Las células no infectadas usadas como control, mostraron una morfología normal y no se detectó la formación de prolongaciones celulares (Fig. 15A). En células infectadas con REPEC, fue posible detectar pedestales sobre los cuales se encontraron las bacterias unidas estrechamente (Fig. 15B). Una magnificación mayor de la zona mostró claramente el pedestal de aproximadamente 2 μm de longitud y sobre este se encontró estrechamente unida la bacteria y el interior electrodens, denotando la presencia de filamentos (F-actina) (Fig. 15C).

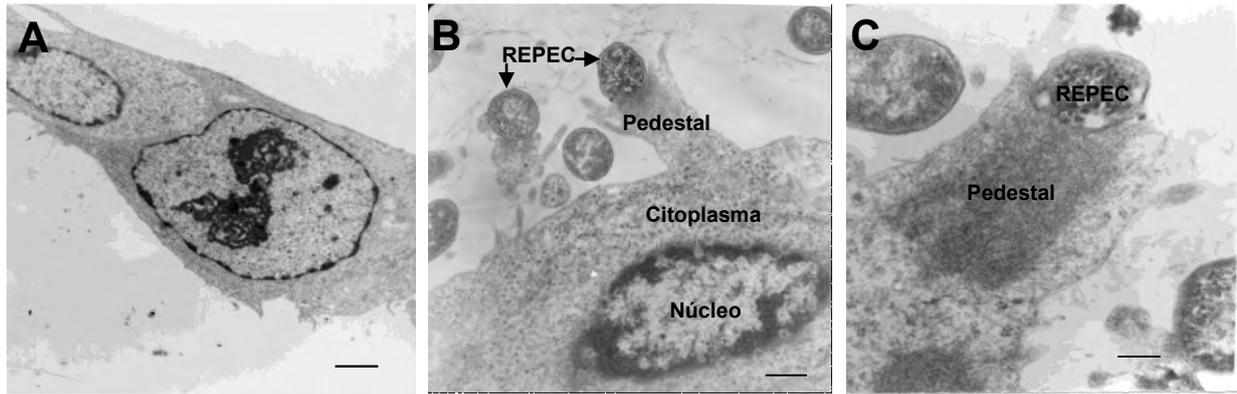


Fig. 15. Ultraestructura de pedestales formados en células RK13 infectadas con REPEC. Se crecieron células RK13 y se infectaron por 4 h con REPEC. Después de la infección las monocapas se fijaron y se prepararon para microscopía electrónica de transmisión. (Panel A) células control (no infectadas), se observaron a 4,400 de magnificación (barra = 1.7 μm). (Panel B) células infectadas observadas a 4,500 de magnificación (barra = 0.6 μm). (Panel C) célula infectada observadas a alta magnificación, 30,000 (barra = 0.25 μm). En cada célula infectada (B y C) se muestra un pedestal con la bacteria adherida.

Cinética de la formación de pedestales de actina en células RK13 infectadas con REPEC

Con el propósito de determinar el tiempo de infección requerido para la formación de los pedestales, células RK13 infectadas fueron tomadas cada 30 min (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 h). Las células infectadas fueron teñidas con faloidina rodaminada y se analizaron al microscopio de epifluorescencia. En las células infectadas durante 0.5, 1 y 1.5 h no se pudo detectar los sitios de formación de pedestales (Fig. 16A, B y C). Sin embargo, 2 h postinfección se observaron pequeños sitios de formación de pedestales (Fig. 16D), los cuales fueron más evidentes 2.5 h postinfección (Fig. 16E) y se mantuvieron evidentes y definidos a las 3, 3.5 y 4 h postinfección (Fig. 16F, G y H).

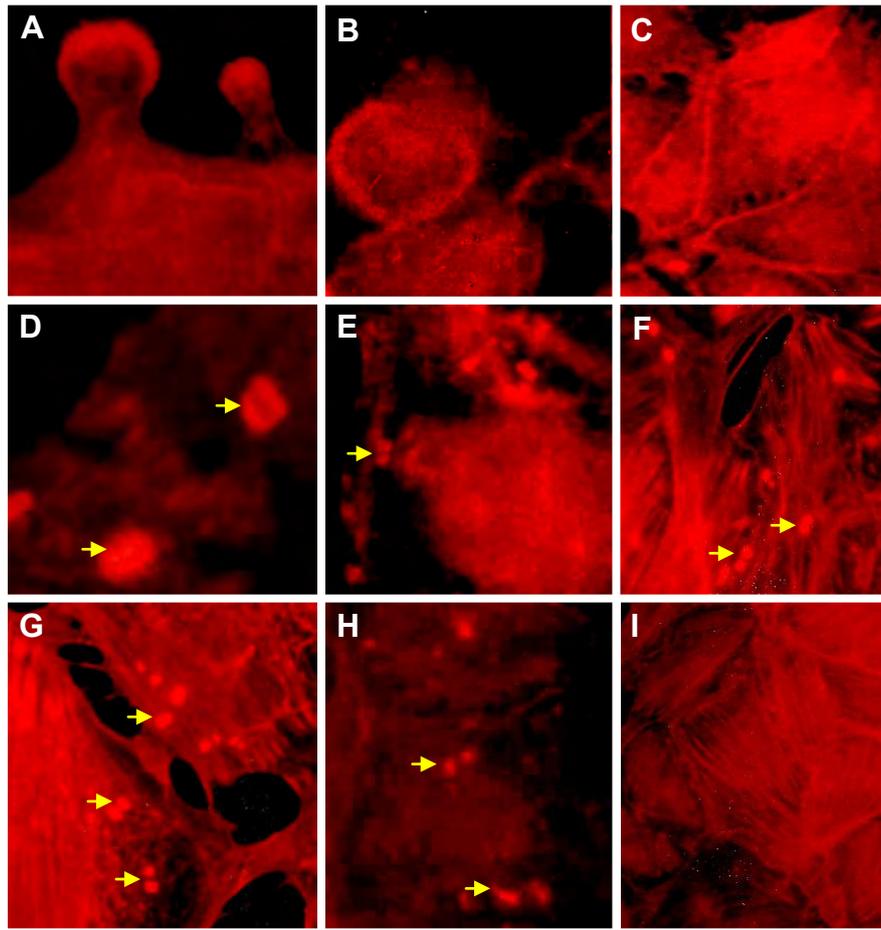


Fig. 16. Estudio temporal de la formación de los pedestales. Células RK13 infectadas con REPEC (A-H) Células RK13 no infectadas (I). Cada 30 min se fijaron muestras para marcar actina con faloidina rodaminada y analizarlas por epifluorescencia. Después de 0.5 (A), 1.0 (B) y 1.5 (C) horas de infección las células no mostraron sitios de mayor marca de actina teniendo una apariencia similar a las no infectadas (I). Después de 2 h de infección, se detectaron pedestales (flechas) (D) y éstos persistieron hasta las 4 h post-infección (E) 2.5 h, (F) 3.0 h, (G) 3.5 h y (H) 4.0 h (flechas).

Los pedestales de actina se mantienen y son alargados en células infectadas después de 4 h

Con el fin de conocer lo que sucede con los pedestales a tiempos de infección mayores a 4 h, células RK13 fueron infectadas con REPEC durante 5, 6 y 7 h. Después de las infecciones, las células fueron teñidas con faloidina rodaminada y analizadas por microscopía confocal. Las células infectadas por 5 h mostraron pedestales (Fig. 17A), los cuales parecen presentarse en mayor número que los detectados en tiempos menores de infección (ver arriba, Fig. 16). Las células infectadas por 6 y 7 h mostraron que estos

pedestales se mantienen e incluso aumentan su longitud que va de aproximadamente 4 μm a las 5 h a 8 μm a las 7 h de infección (Fig. 17B y C).

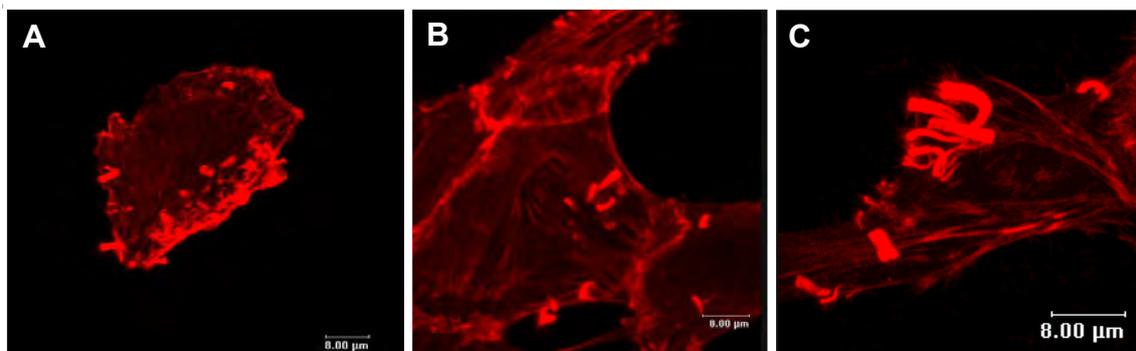


Fig. 17. Los pedestales persisten más allá de 4 h de infección. Células RK13 fueron crecidas e infectadas con REPEC por 4 h, luego se les cambió el medio de cultivo para continuar la infección hasta 5 (A), 6 (B) y 7 (C) h. La actina fue marcada con faloidina rodamina y el análisis de las muestras se hizo al microscopio confocal. Los pedestales estuvieron presentes en todos los tiempos e incluso se incrementa su longitud.

Los pedestales desaparecen al ser eliminada la infección y se vuelven a formar durante la reinfección

Para saber que pasa con los pedestales al ser eliminada la infección y al reinfectar nuevamente las células con REPEC, fueron preparados 3 grupos de células RK13 para ser infectadas con REPEC, 4 h post-infección se tomaron muestras de los tres grupos y fueron fijada, permeabilizadas y bloqueadas, como se indicó en material y métodos, la actina fue marcada con faloidina rodamina para detectar los pedestales formados (Fig. 18A, D y G). El grupo 1 se tomó como control positivo de la infección por lo se continuó la infección hasta 7.5 h sin adicionarle antibiótico, solo se le fue cambiando el medio para mantener las células en buen estado. A las 5 h post-infección se tomó una muestra para teñir actina con faloidina rodamina (Fig. 18B) y a hasta las

7.5 horas fue tomada la otra muestra (Fig. 18C). Después de 4 h de infección, las células de los grupos 2 y 3 fueron lavadas con DMEM dos veces para adicionar el antibiótico (penicilina-estreptomicina). Una hora después de adicionar el antibiótico, se tomaron muestras de los grupos 2 y 3 para también marcar la actina con faloidina rodaminada (Fig. 17-E y H). El grupo 2 se continuó con antibiótico hasta las 7.5 horas, para tomar una muestra a esta hora (Fig. 18F), mientras que a las células del grupo 3 se les eliminó el antibiótico después de 1 h mediante tres lavados con DMEM y fueron re infectadas por 2.5 h más para, llegar a las 7.5 horas como los otros grupos (Fig. 18I). El grupo 1 mostró pedestales en todos los tiempos que se tomaron muestras. El grupo 2, después de una hora en presencia del antibiótico (5 h post-infección), mostró una notoria disminución de pedestales y a las 7.5 horas post-infección (3.5 h con antibiótico) desaparecieron por completo los pedestales. En contraste, el grupo 3, con una hora con antibiótico los pedestales prácticamente desaparecieron y al ser re infectadas con REPEC por 2.5 h, hubo presencia nuevamente de pedestales (Fig. 18I).

La marca del complejo Arp2/3 colocaliza con la marca de actina en los pedestales a las 3 horas postinfección de células RK13 por REPEC

Con las evidencias obtenidas por epifluorescencia (Figs. 11 y 12), microscopía confocal (Figs. 13 y 14) y microscopía electrónica de transmisión (Fig.15), que con el modelo de infección RK13/REPEC se forman pedestales, además, que se conserva la plasticidad del citoesqueleto de actina, al aparecer y extenderse los pedestales a medida que avanza el tiempo de infección (Figs. 16 y 17), a la vez que, los pedestales se retraen al ser eliminada la infección e incluso, vuelven a formarse al ser re infectadas las células (Fig. 18), se procedió a identificar proteínas que regulan la polimerización de actina con el propósito de dar inicio al estudio de la dinámica del citoesqueleto de actina durante

los rearrreglos que se producen durante la formación de pedestales con la identificación subcelular de las proteínas Arp2/3, gelsolina y profilina.

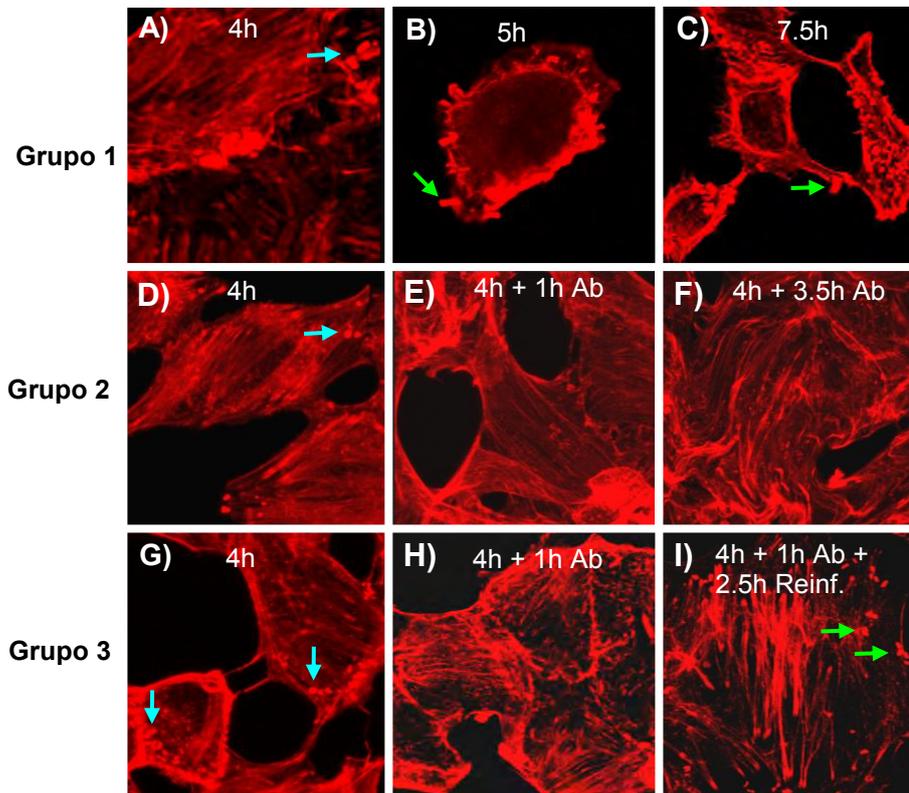


Fig. 18. Los pedestales desaparecen después de ser eliminadas las bacterias y se vuelven a formar con la reinfección. Células RK13 fueron infectadas con REPEC por 4 h y se marcó actina con faloidina rodaminada. Grupo 1, células infectadas por 4 h (A), 5 h (B) y 7.5 h (C). Grupo 2, células infectadas por 4 h (D), células infectadas po 4 h más 1 h con antibiótico (E) y células con antibiótico por 3.5 h después de 4 h de infección (F). Grupo 3, células infectadas por 4 h (G), células con 1 h antibiótico después de 4 h de infección (H) y células con 4 h de infección más 1 h con antibiótico y 2.5 h de reinfección (I). En las células que fueron tratadas con antibiótico (E, F and H) no se observan pedestales, pero las células infectadas (A, B, C, D y G) y reinfectadas (I) si muestran pedestales. Con estos resultados se muestra la plasticidad del citoesqueleto de actina en este modelo de infección in vitro.

Para esto, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con doble marcaje tomando muestras a diferentes tiempos de infección. Células RK13 fueron infectadas con REPEC y cada 30 min (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 h) se tomaron muestras en las que se marcaron el complejo Arp2/3, gelsolina y profilina con anticuerpos policlonales y actina-F con faloidina rodaminada, como se indicó en materiales y métodos. Las muestras se analizaron al microscopio confocal usando simultáneamente el canal verde y el canal rojo para detectar la colocalización de ambas marcas de cada proteína. La marca verde de Arp2, emitida por el anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína, se encontró distribuida por toda la célula hasta las 2 h, pero a las 2.5 h se notaron puntos de concentración de actina en sitios específicos y a las 3.0, 3.5 y 4.0 post-infección, la marca colocaliza con la marca roja de actina en los pedestales (color amarillo) por la sobreposición de ambas marcas (Fig. 19). En cambio en los casos de gelsolina y profilina no se encontró colocalización de la marca de estas proteínas con la marca de actina durante las 4 h de infección, tiempos manejados en este ensayo (Figs. 20 y 21). En el caso de gelsolina se ha reportado que se recluta a los pedestales formados por EPEC en células HeLa (Goosney et al., 2001), para profilina no hay estudios en los que se haya encontrado reclutada en los pedestales. La no colocalización se podría deber, al menos en el caso de gelsolina a problemas técnicos, pensando en esto, en la actualidad estamos haciendo estudios comparativo en el uso de diferentes fijadores como glutaraldehido, paraformaldehido, formaldehido, y Karnousky a diferentes concentraciones y combinados (paf-gluta), ya que en otros trabajos de nuestro laboratorio la marca de los anticuerpos difiere con el fijador.

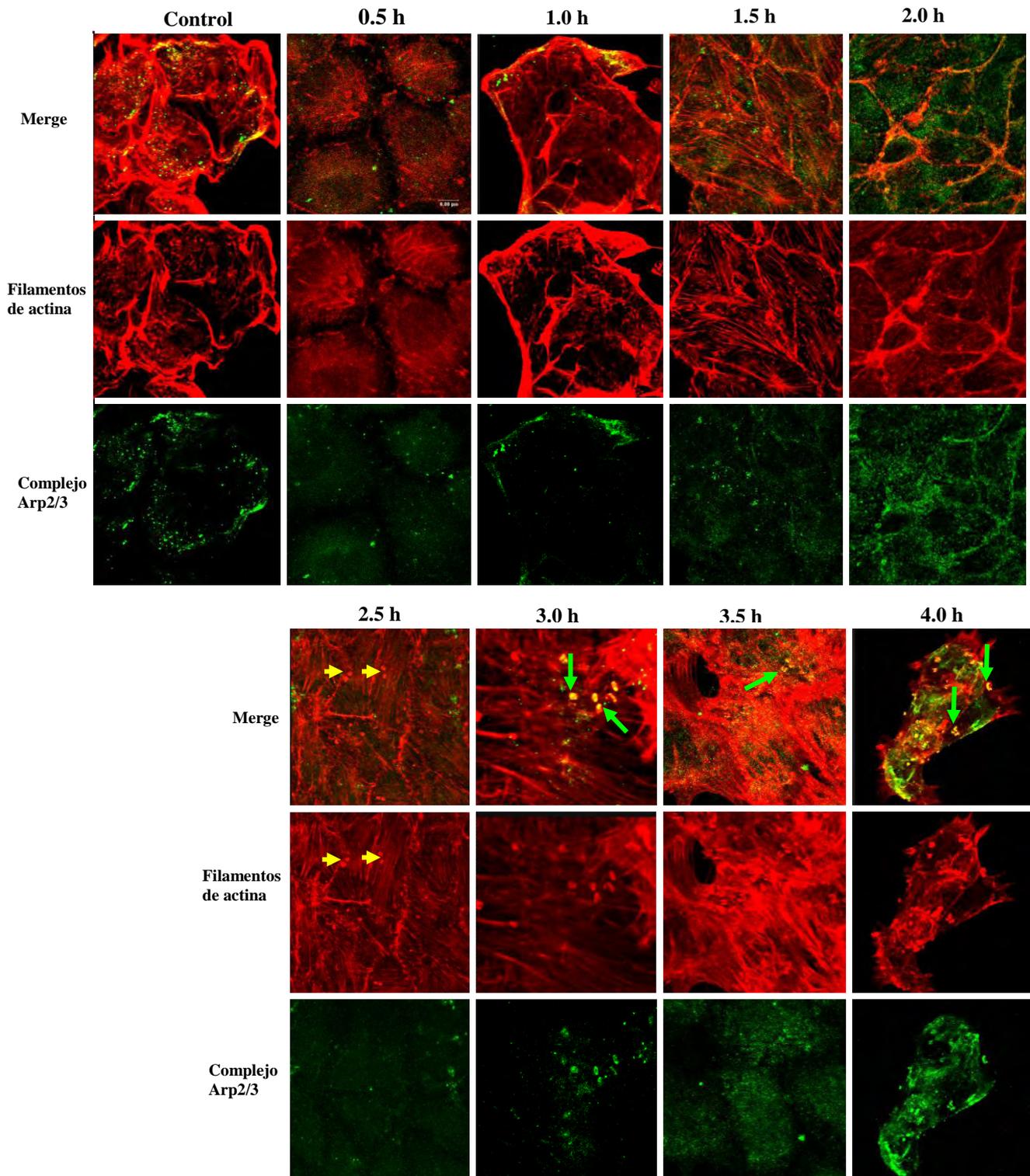


Fig. 19. El complejo Arp2/3 se observa en los pedestales a las 3.0 h de infección. Células RK13 se infectaron con REPEC, cada 30 minutos post-infección se prepararon muestras para inmunofluorescencia marcando actina con faloidina rodaminada y Arp2 con un anticuerpo policlonal. Las preparaciones se analizaron por microscopía confocal. La colocolización de la marca de actina con la marca de Arp2 se observa claramente a partir de las 3.0 h de infección (flechas verdes). Los sitios específicos de mayor marca de actina en donde forman pedestales se observan a partir de las 2.5 h (flechas amarillas).

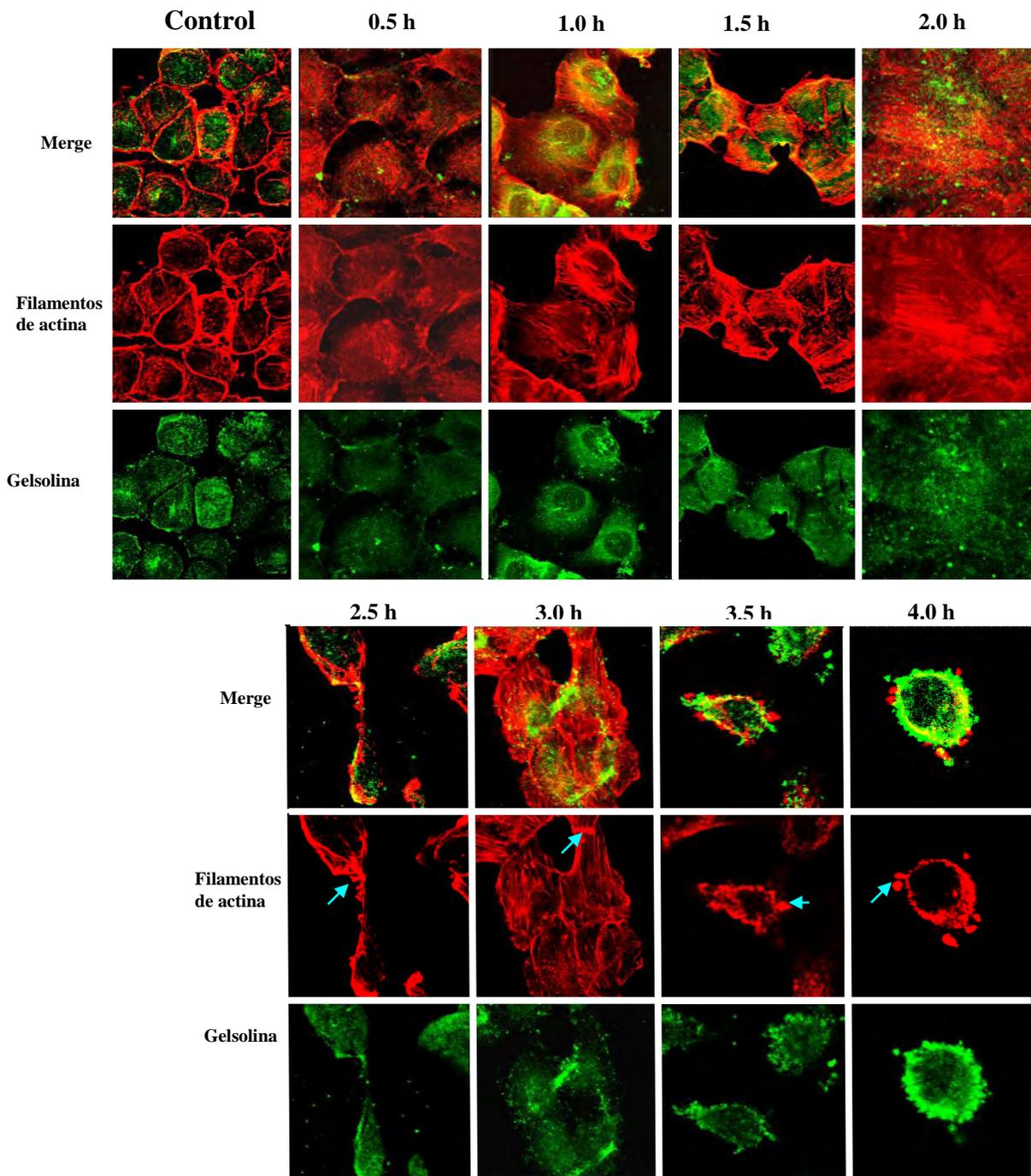


Fig. 20. Gelsolina no colocaliza con la marca de actina de los pedestales. Células RK13 se infectaron con REPEC durante 4 h y cada 30 min y luego se prepararon muestras marcando actina con faloidina rodaminada (rojo) y gelsolina con anticuerpos policlonales (verde). El análisis de la muestras por microscopía confocal muestran pedestales a partir de las 2.5 h de infección (flechas) pero en ninguna preparación colocaliza la marca de gelsolina con la marca de actina en los pedestales.

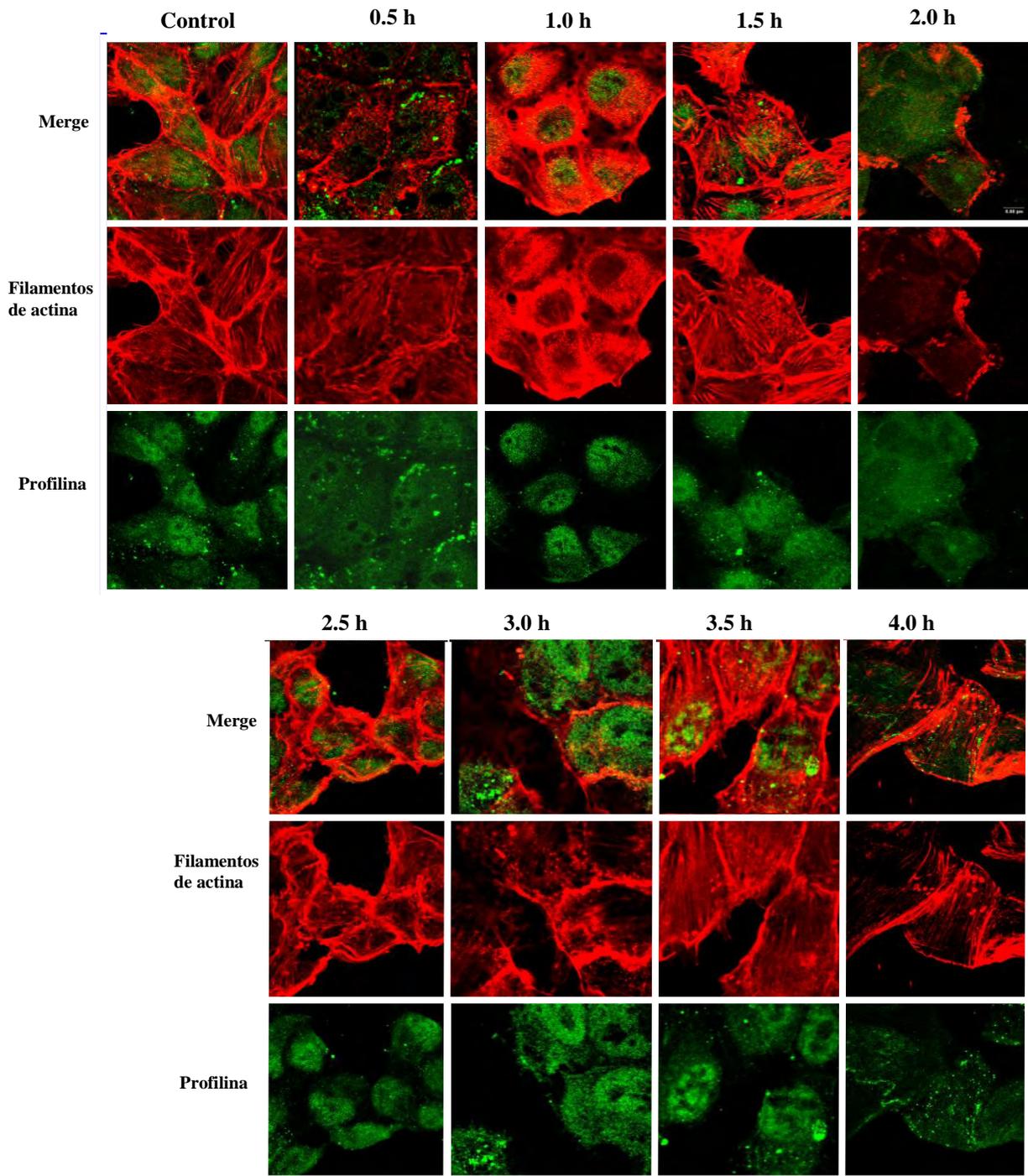


Fig. 21. Profilina no colocaliza en los pedestales. Se crecieron células RK13 y se infectaron con REPEC por 4 h. Cada 30 min se tomaron muestras y para ensayos de inmunofluorescencia se marcó actina con faloidina rodamina (rojo) y profilina con un anticuerpo policlonal (verde). El análisis de las muestras por microscopía confocal mostró que la marca de profilina no colocaliza con la marca de actina en los pedestales.

En infecciones mayores a 4 h el complejo Arp2/3 sigue colocalizando con actina en los pedestales.

Para determinar qué pasa con el complejo Arp2/3 en los pedestales en infecciones mayores a 4 horas, fueron preparadas muestras de células RK13 infectadas con REPEC a 4.0, 4.5 y 5.0 h post-infección. Se marcó actina con faloidina rodaminada y la proteína Arp2 con un anticuerpo policlonal anti-Arp2. Las preparaciones se analizaron al microscopio confocal. La proteína Arp2 colocalizó con la marca de actina en los pedestales en todos los tiempos de infección analizados (Fig. 22). Esto indica que el complejo Arp2/3 sigue formando filamentos de actina para mantener la malla que protege la membrana plasmática al formar los pedestales.

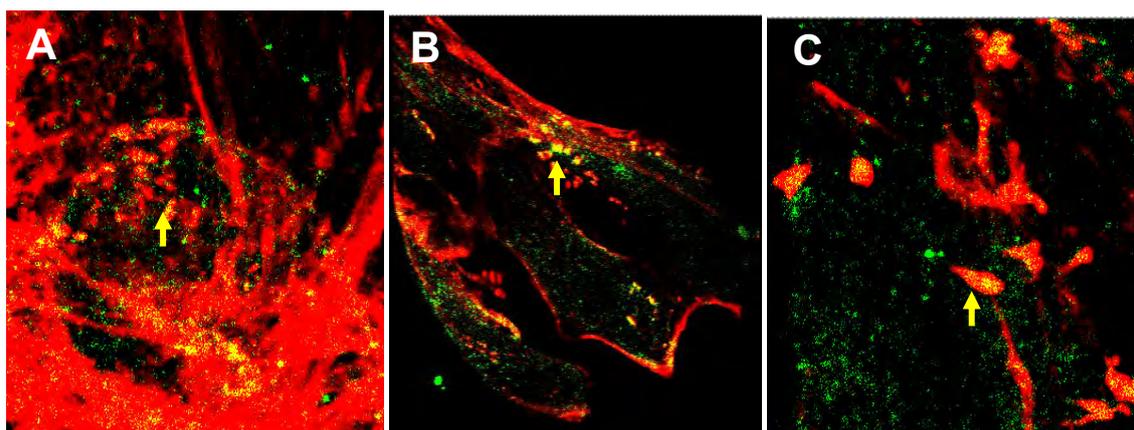


Fig. 22. El complejo Arp2/3 se mantiene en los pedestales a las 5 h postinfección. Células RK13 fueron infectadas con REPEC durante 5 h. Se prepararon muestras a las 4 (A), 4.5 (B) y 5 h (C) post-infección y se marcó actina con faloidina rodaminada y Arp2 con anticuerpos policlonales. La marca de Arp2 colocaliza con la marca de actina en todas las preparaciones (flechas). Esto sugiere que el complejo Arp2/3 participa en la polimerización.

Al desaparecer los pedestales, la marca del complejo Arp2/3 se distribuye en todo el citoplasma de la célula.

Con el fin de conocer qué pasa con el complejo Arp2/3 después de que los pedestales se retraen, se infectaron 3 muestras de células RK13 con REPEC durante 4

horas, se tomó una muestra a este tiempo, como control positivo, para corroborar si se habían formado pedestales (Fig. 23-A), luego se adicionó antibiótico a las muestras restantes, a los 30 min con antibiótico se tomó una segunda muestra (Fig. 23-B) y a 1h con antibiótico se tomó la tercer muestra (Fig. 23-C). En las tres muestras se marcó actina con faloidina rodaminada y Arp2/Arp3 con los anticuerpos policlonales anti-Arp2. Al desaparecer los pedestales con 1 h de acción del antibiótico el complejo Arp2/3 se encontró distribuido en toda la célula. (Fig. 23-C)

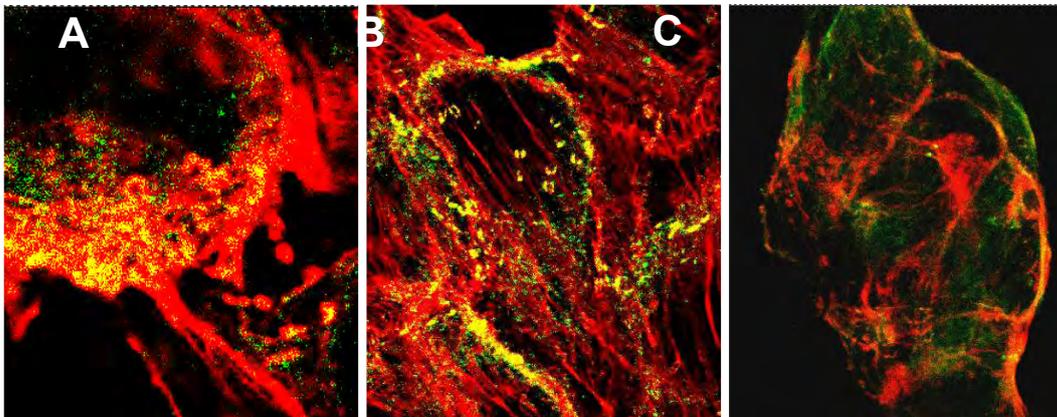


Fig 23. Arp2 se distribuye en la célula al desaparecer los pedestales. Se llevó la infección de RK13/REPEC a 4 h y se tomó una muestra (A), luego se adicionó antibiótico y se tomó una muestra a los 30 min con antibiótico (B), al final se tomó otra muestra a 1 h con antibiótico (C). En todas las muestras se marcó actina con faloidina rodaminada y Arp2 con un anticuerpo policlonal dirigido contra esta proteína. La marca de Arp2 se ve distribuida por toda la célula al desaparecer los pedestales.

DISCUSIÓN

Para el estudio de los mecanismos moleculares que ocurren durante la patogénia de microorganismos a nivel celular, es necesario contar con modelos de infección *in vitro* que se puedan ser controlados experimentalmente y los resultados posteriormente se comprueben en el hospedero natural, en este trabajo se establecieron las condiciones para formar pedestales con infección de células RK13 con REPEC y proponer esto como modelo para el estudio de la dinámica del citoesqueleto de actina, así como, de proteínas que regulan el ensamble y desensamble de los filamentos de actina durante la formación de pedestales, para después llevarlo al hospedero natural, el conejo. En este sentido REPEC es considerada como uno de los modelos más importantes para el estudio de la patogenia de cepas de *E. coli* formadoras de lesiones A/E en un hospedero natural (Milon et al., 1999). Las infecciones de ratón por *Citrobacter rodentium*, también se ha utilizado como un modelo animal para el estudio de infecciones de humanos de EPEC y EHEC (Deng et al., 2003) solo que, como se mencionó la introducción, este modelo tiene serias desventajas, como que *C. rodentium* no es del mismo género de *E. coli*, produce hiperplasia sin aparente inflamación, infecta al colon y no al intestino delgado y no produce diarrea en los ratones (Lupercio and Schauer, 2001).

El análisis del modelo para formar pedestales en células RK13 infectadas por REPEC se llevó a cabo por microscopía de epifluorescencia, microscopía confocal, Nomarski y microscopía electrónica de transmisión. Los diversos puntos y prolongaciones celulares, con mayor intensidad en la marca de actina observadas por epifluorescencia (Figs. 11 y 12) a las 4 h post-infección arrojaron los primeros elementos de formación de pedestales por que coincidían con una de las imágenes de los ensayos de inmunofluorescencia, donde infectaron células RK13 con REPEC durante 4

h para el estudio del papel de Tir e intimina en la patogenia de REPEC (Marchés et al., 2000). Las prolongaciones que mostramos en la figura 12, también son similares a aquellas detectadas con la infección de células HeLa con EPEC (Gosney et al., 2001), pero en ese trabajo solo se marcó actina y no la bacteria. Al realizar cortes ópticos a muestras preparadas a las 4 h de infección de células RK13 con REPEC se pudo ver que, en varias células se formaron muchos puntos de mayor marca de actina (Fig. 13A), las cuales coincidieron con las prolongaciones celulares, las cuales fueron detectada por la marca de actina (fluorescencia) y con las prolongaciones relacionadas con bacterias tomadas por Nomarsky. Esto resultados corroboraron que eran pedestales las prolongaciones con mayor marca de actina que se han estado mostrando en este modelo. Este empalme del canal rojo y el sistema Nomarski prácticamente es único, hay pocos trabajos en los que se hayan analizado pedestales de esta manera. Sanger et al., 1996, Freeman et al., 2000 y Shaner et al., 2005, han analizado por microscopía confocal y contraste de fase los pedestales formados por EPEC en diversas líneas celulares (HeLa, PtK2 y Caco-2). Los pedestales obtenidos con los ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje en donde, además de actina se marcaron las bacterias con un anticuerpo policlonal que reconoce proteínas de superficie bacteriana (Fig. 14), tienen la forma de los pedestales obtenidos por infecciones de EPEC y EHEC por otros autores (Sanger et al., 1996; Freeman et al., 2000; Shaner et al., 2005). Existen más trabajos de EPEC que obtienen pedestales en otras células similares a los que se han formado con el modelo de infección RK13/REPEC de este trabajo tales como los fibroblastos que fueron infectados con EPEC y EHEC de humano para comparar los mecanismos moleculares de inducción de formación de pedestales entre estas dos bacterias (Lommel et al., en el 2004) ó células HeLa infectadas con EPEC para determinar la importancia de cortactina en la formación de pedestales (Cantarelli et al., 2006). Con el estudio por microscopía

electrónica de transmisión, la ultraestructura de los pedestales en el modelo RK13/REPEC, se muestra claramente la interacción de la bacteria con los pedestales (Fig. 15). Un importante hallazgo de este resultado fue que se muestra un pedestal separado de la célula pero con la bacteria adherida, lo que indica que la interacción entre la bacteria y el pedestal es muy fuerte, ya que resistió las agresiones mecánicas naturales durante la preparación de las muestras. La ultraestructura de los pedestales observada en nuestro trabajo, son similares a aquellos reportados en infecciones con EPEC para humano en diferentes hospederos; por ejemplo en la mucosa intestinal de humano (Knutton et al., 1987), cultivos de epitelio intestinal de humano (Frankel et al., 2001) ó células HeLa (Goosney et al., 2001).

Casi todos los trabajos en los que se han identificado proteínas del citoesqueleto reclutadas en el sitio de formación de los pedestales se han realizado a las 3 ó 4 horas post-infección, tiempo en el que los pedestales están formados (Sanger et al., 1996, Freeman et al., 2000; Goosney et al., 2001). En este trabajo, al hacer el estudio temporal de los pedestales tomando muestras cada 30 min hasta las 4 h de infección, se mostró que los pedestales se observan desde las 2 h y al prolongar la infección hasta las 7 horas se detectó que los pedestales se mantienen e incluso se alargan más (Figs. 16 y 17). Interesantemente, al eliminar la infección, los pedestales desaparecen y si las células son reinfectadas, los pedestales se vuelven a formar (Fig. 18), lo que sugiere que la inducción de polimerización de actina es continua, mientras la bacteria esté adherida a la membrana de la célula hospedera. Estos resultados refuerzan el concepto de que los pedestales son estructuras dinámicas como ya ha sido sugerido previamente (Sanger et al., 1996), cuyos autores demuestran que las bacterias unidas a pedestales se mueven sobre la superficie externa de la membrana plasmática a $0.07 \mu\text{m}$ por segundo y este movimiento es dependiente de actina. Por otro lado, se ha mostrado que al adicionar

inhibidores de la despolimerización de actina por 30 min a células PtK2 infectadas con EPEC, los pedestales se alargan (Shaner et al., 2005). Este último resultado, junto con los obtenidos en este trabajo, muestran que la bacteria influye en la longitud del pedestal y entre sus proteínas efectoras hay quienes inducen la polimerización y despolimerización de actina.

Existe un gran número de trabajos sobre EPEC en humano y otros patógenos que inducen la formación de pedestales, en los que se caracterizan con detalle los mecanismos moleculares para colonizar, adherirse estrechamente a la célula hospedera y traslocar sus proteínas efectoras al citoplasma de la célula blanco mediante el TTSS, y finalmente provocar rearrreglos del citoesqueleto de actina para formar los pedestales (Revisión de Kenny, 2002; Campellone and Leong, 2003; Clarke et al., 2003; Garmendia et al., 2005 y Chen and Frankel, 2005). Sin embargo, hay pocos reportes con serotipos de EPEC que afectan a animales, con los que estudien los mecanismos moleculares de la dinámica del citoesqueleto de actina y las proteínas que regulan el ensamble y desensamble de actina en este proceso infeccioso. Por lo que con los resultados obtenidos en la presente investigación, creemos que las células RK13 infectadas con REPEC pueden ser de gran utilidad como modelo de investigación sobre patogenicidad de EPEC y otras bacterias afectan al citoesqueleto de actina y la dinámica de este sistema celular. Este modelo tiene la ventaja de que RK13 son células del hospedero natural, lo que permitiría correlacionar los resultados con aquellos hechos *in vivo*, mediante la infección de conejos, lo que no se puede hacer en humanos.

Otro elemento importante del modelo utilizado en este estudio, es la plasticidad del citoesqueleto de actina que se refleja durante la formación de pedestales, en donde hay un ensamble de actina para protruir la membrana y formar los pedestales, así como, se da la despolimerización de actina durante la regresión de los pedestales al eliminar la

infección ó incluso la nueva formación de pedestales durante la reinfección. Por lo que este modelo es muy apropiado para realizar investigaciones sobre la dinámica de las proteínas de ARPs y ABPs; para evaluar qué moléculas y en qué orden se activan para polimerizar actina, como el complejo Arp2/3 y profilina o las proteínas que dañan a filamentos de actina provocando la despolimerización por gelsolina. También las proteínas que secuestran monómeros de actina para evitar su polimerización como timosina o las proteínas que detienen la polimerización de actina controlando la extensión de los filamentos como las proteínas de recubrimiento (Capping protein) (Pollard an Borisy, 2003; Svitkina et al., 2003; DosRemedios, 2003). El estudio de la interacción de todas estas proteínas nos permitirá tener una mayor claridad sobre los mecanismos moleculares de la patogenia de la infección por EPEC y la dinámica del citoesqueleto. Además, será posible realizar estudios comparativos con infecciones realizadas en cultivos celulares primarios de enterocitos de conejo y, finalmente, comprobarlos en el modelo natural de los conejos infectados experimentalmente con REPEC y de esta forma comprender los mecanismos de patogenicidad de la infección en humanos producido por EPEC.

Una vez establecido el modelo RK13/REPEC para la formación de pedestales y demostrar que se manifiesta la plasticidad característica del citoesqueleto de actina en este modelo de infección, se dio inicio al estudio de la dinámica del citoesqueleto de actina al identificar por inmunofluorescencia de doble marcaje al complejo Arp2/3, gelsolina y profilina que son proteínas que regulan la polimerización de actina en eventos normales de la célula, como la formación de lamelipodios durante los movimientos celulares (Pollar and Borysi, 2003) y que además se han encontrado reclutadas en los pedestales formados por EPEC (Goosney et al., 2001; DosRemedios et al., 2003). Muestras de células RK13 infectadas con REPEC fueron tomadas cada 30

min postinfección hasta 4 h y se prepararon con ensayos de inmunofluorescencia para cada proteína en estudio, en las que se observó que el complejo Arp2/3 colocaliza con la marca de actina a partir de las 3 h (Fig.19) y cuando la infección fue llevada hasta 5 h siguió la colocalización del complejo Arp2/3 con actina (Fig. 22). La colocalización de la marca del complejo Arp2/3 persiste durante la presencia de pedestales, por que al eliminar la infección y desaparecer estos, la marca del complejo se redistribuye por toda la célula sin colocalizar con la marca de actina en algún lugar (Fig. 23). Lo anterior sugiere que las elevaciones de la membrana plasmática ricas en actina, provocadas por la interacción bacteriana con la célula huésped para la formación de pedestales, es generada por una red de filamentos de actina nucleadas por el complejo Arp2/3. Esto es apoyado por reportes que sugieren la formación de una red de filamentos de actina durante el desarrollo de los pedestales (Shaner et al, 2005), similar al modelo propuesto para la formación de lamelipodios (Pollar y Borisy, 2003). En dicho modelo, el complejo Arp2/3, después de ser activado, inicia la formación de nuevos filamentos de actina como ramificaciones de filamentos ya existentes. Tomando en consideración estos dos reportes y nuestros resultados, podemos sugerir que, después que inicia la infección y que la bacteria se adhiere a la célula hospedera, trasloca sus proteínas efectoras las cuales interactúa con proteínas del huésped para activar el complejo Arp2/3; quien ayudara a la nucleación de los filamentos de actina en la formación de los pedestales. En tiempos más prolongados, estos pedestales se mantienen debido a que esta proteína participa activamente en la polimerización de los filamentos de actina para mantener la formación de la red presente en los pedestales.

Con los ensayos de inmunofluorescencia para identificar gelsolina en los mismos tiempos de infección que se manejaron para el complejo Arp2/3, no se observó colocalización de gelsolina con actina en los pedestales (Fig.20), este resultado difiere

de los reportados previamente (Goosney et al., 2001). Estos autores encontraron que gelsolina es reclutada a todo lo largo de los pedestales durante infecciones por EPEC en células HeLa. Tomando en cuenta el modelo propuesto por Shaner et al., (2005) en el que indican que los filamentos de actina, en los pedestales, pueden estar protegidos a la despolimerización por su asociación con la membrana plasmática y por la fuerte unión entre ellos, por lo que la gelsolina sólo podría estar en la base de los pedestales, donde se da la despolimerización según este modelo, esto tiene relación con una de las funciones de gelsolina, cortar filamentos de actina (DosRemedios et al., 2003; McGough et al., 2003). Estamos explorando situaciones técnicas al probar diferentes fijadores (Karnouski, paraformaldehído, formaldehído, glutaldehído, entre otros) para mejorar la difusión de los anticuerpos primarios y secundarios por que puede ser posible que por eso no esté marcando adecuadamente los anticuerpos. También en hacer un análisis por inmunoblot para ver si el anticuerpo (anti-gelsolina) que estamos utilizando está trabajando de forma adecuada.

Al igual que para gelsolina, no se observó que profilina colocalizara con la marca de actina en los pedestales. La marca de profilina se observó difusa por todo el citoplasma pero sin estar en los pedestales en las muestras de todos los tiempos de infección (Fig. 21). Dentro de las proteínas reclutadas a los pedestales formados por EPEC (Freeman et al., 2000; Goosney et al. 2001) no se reporta profilina. Posiblemente en las células infectadas la profilina solo se limite a liberar los monómeros de actina secuestrados en el citoplasma y a catalizar el intercambio de ADP por ATP sin llevarlos a los extremos (+) de los filamentos que están polimerizando, como lo hace en protrusiones celulares como los lamelipodios (Pollard y Borisy, 2003; Dos Remedios et al., 2003).

En resumen, nuestros resultados demostraron que el modelo de infección RK13/REPEC reproduce pedestales bien definidos y manifiesta el dinamismo del citoesqueleto de actina. Las evidencias obtenidas con las preparaciones de muestras de células infectadas por 4 h, en ensayos de inmunofluorescencia y analizadas por epifluorescencia y microscopía confocal soportan que ahora contamos con un modelo in vitro que sirve para el estudio de la dinámica del citoesqueleto de actina en el proceso de infección de la familia de *E coli* que causan lesiones A/E y forman pedestales. El estudio por microscopía electrónica de transmisión mostró la ultraestructura de los pedestales que semejan a estudios in vivo en conejos e intestino de humano. También se mostró la plasticidad del citoesqueleto con los ensayos de cinética de la infección por 4 h, en donde al preparar muestras cada 30 min, se mostró que a las 2 h post-infección se observan los pedestales y con las infecciones llevadas más allá de 4 h de infección se vio que al avanzar la infección los pedestales siguen extendiéndose, si se elimina la infección los pedestales desaparecen y si se reinfectan las células se forman nuevamente los pedestales. Como un tercer elemento que aportó este trabajo es que al identificar a proteínas que regulan polimerización de actina como el complejo Arp2/3, gelsolina y profilina; la única que colocalizó con la marca de actina en los pedestales fue el complejo Arp2/3 a partir de las 2.5 h de infección y que este complejo se mantiene colocalizando todo el tiempo que se presentan pedestales, al desaparecer estos, el complejo se distribuye por todo el citoplasma sin colocalizar con actina. Esto sugiere que el complejo Arp2/3 es requerido para formar y mantener la acumulación de filamentos de actina en los pedestales y que gelsolina y profilina se mantienen fuera de estos, probablemente gelsolina cortando filamentos en la base de los pedestales y profilina llevando monómeros de actina también a la base de los pedestales para que el

complejo Arp2/3 cause nucleación de actina y forme nuevos filamentos para aumentar la protrusión celular y formar pedestales.

CONCLUSIONES

1. De acuerdo a nuestros resultados de epifluorescencia, microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión, se caracterizó el modelo de infección RK13/REPEC para la formación de pedestales en nuestro laboratorio.
2. Se mostró la ultraestructura de la interacción de la bacteria REPEC con las células epiteliales RK13 y con una mayor magnificación se mostró la morfología electrodensa de los filamentos de actina.
3. Con el estudio temporal de pedestales se mostró que la mayor marca de actina en los sitios específicos de formación de pedestales, se observa a partir de las 2 horas post-infección.
4. Se corroboró que el dinamismo que caracteriza al citoesqueleto de actina se manifiesta en el modelo de infección RK13/REPEC, ya que al llevar infecciones más allá de 4 h post-infección, los pedestales se mantienen e incluso se alargan, al eliminar la infección los pedestales sufren regresión y al ser reinfectadas las células, se vuelven a formar los pedestales.
5. Este modelo puede ser muy útil para el estudio de la dinámica de las proteínas relacionadas con los rearrreglos del citoesqueleto de actina para la formación de pedestales y la patogenia de esta familia de bacterias que forman las lesiones A/E.
6. Se observó que el complejo Arp2/3 colocaliza con la marca de actina en los pedestales desde las 3 horas post-infección y que gelsolina y profilina no colocalizan en los pedestales durante las 4 horas de infección.

LITERATURA CITADA

1. Abe A., Heczko U., Hegele RG. And Finlay BB. (1998). Two enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors. *J Exp Med.* 188:1907-16
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2002). Molecular Biology of the Cell. Fourth edition. GS Garland Science Taylor and Francis Group. *Chapter* 16:932-943
3. Ballwever E, Hannappel E, Huff T and Mannherz HG, (1998). Mapping the binding site of thymosin B4 on actin by competition with G-actin binding proteins indicates negative cooperativity between binding sites located on opposite subdomains of actin. *Biochem J.* 327; 787-793
4. Batchelor M, Guignor J, Patel A, Cummings N, Cleary J, Knutton S, Holden DW, Connerton I and Frankel G. (2004) Involvement of the intermediate filament protein cytokeratin-18 in actin pedestal formation during EPEC infection. *EMBO Rep.* 5: 104-110
5. Batchelor M, Prasanna S, Daniel S, Reece S, Connerton I, Bloomberg G, Dougan G, Frankel G and Matthews S. (2000) Structural basis for recognition of the translocated intimin receptor (Tir) by intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO J.* 19: 2452-2464
6. Biyasheva A, Svitkina T, Kunda P, Baum B and Borisy G. (2003). Cascade pathway of filipodia formation downstream of SCAR. *Journal of Cell Science.* 117: 837-848
7. Borisy GG. And Svitkina. (2000). Actin machinery: pushing the envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 104-112
8. Campellone KG., Giese A., Tipper DJ and Leong Jm. (2002). A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol Microbiol.* 43:1227-1241

9. Campellone KG and Laong JM (2003) Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:47. *Current Opinion in Microbiology*. 6: 82-90
10. Campellone KG and Leong JM. (2005) Nck-Independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic *Escherichia coli* Tir. *Mol Microbiol*. 56;416-432
11. Campellone KG., Rankin S., Pawson T., Kirschner MW., Tipper DJ and Leong JM. (2004). Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly. *J Cell Biol* 164 : 407-416
12. Cantarelli VV, Takahashi A, Yanagihara I, Akeda Y, Imura K, Kodana T, Kono G, Sato Y, Iida T and Honda T. (2001) Talin, a host cell protein, interacts directly with the translocated intimin receptor, Tir, of enteropathogenic *Escherichia coli* and is essential for pedestal formation. *Cellular Microbiology*. 3(11); 745-751
13. Cantarelli VV, Takahashi A, Yanagihara I, Akeda Y, Imura K, Kodana T, Kono G, Sato Y, Iida T and Honda T. (2002) Cortactin is necessary for F-actin accumulation in pedestal structures induced by enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infection and Immunity*. 70(4): 2206-2209
14. Cantarelli VV, Kodama T, Nijstad N, Abolghait SK, Iida T and Honda T. (2006) Cortactin is essential for F-actin assembly in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)- and enterohaemorrhagic *E.coli* (EHEC)-induced pedestals and the α -helical region is involved in the localization of cortactin to bacterial attachment sites. *Cellular Microbiology*. 8(5):769-780
15. Cantey JR and Blake RK. (1997) Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J Infect Dis*. 135 :454-62
16. Carlier MF, Le Clainche C, Wiesner S and Pantaloni D. (2003). Actin-based motility: from molecules to movement. *Bio Essays*. 25:336-345

17. Chen HD and Frnakel G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. FEMS Microbiology Reviews 29 : 83-98
18. Choe H, Burtnik LD, Mejillano M, Yin HL, Robinson RC and Choe S. (2002). The calcium activation of gelsolin: Insights from The 3 Å structure of the G4-G6 actin complex. J. Mol. Biol. 324: 691-702
19. Clarke SC, Haigh RD, Freestone PP and Williams PH (2003). Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. Clinical Microbiologic Reviews. 16(3): 365-378
20. Darnell J., Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser CA., Krieger M., Scott MP. And Zipursky SL. (2005) Biología Celular y Molecular. 5a Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires-Argentina.
21. Dayel MJ and Mullis RD, (2004). Activation of Arp2/3 complex: Addition of the first subunit of the new filament by a WASP protein triggers rapid ATP Hydrolysis on Arp2. PLoS Biology 2(4): 0479.
22. DeVinney R, Nisan I, Ruschkowski S, Rosenshine I and Finlay BB. (2001). Tir tyrosine phosphorylation and pedestal formation are delayed in enteropathogenic *Escherichia coli* *sepZ::TnpHoA* mutant 30-5-1(3)
23. DosRemedios CG., Chhabra D., Kekic I., Dedova V. Tsubakihara M., Berry DA. And Nosworthy NJ. (2003). Actin Binding Protein: Regulation of Cytoskeleton Microfilaments. *Physiol Rev.* 83 : 433-473
24. Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Sonnenberg MS and Kaper JB. (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2848/69. Mol Microbiol. 28: 1-4
25. Frankel G, Phillips AD, Trabulsi LR, Knutton S, Dougan G and Matthews S. (2001) Intimin and Host cell- is it bound to end in Tir(s)?. Trends in Microbiology. 9(5): 214-218

26. Freeman NL, Zurawski DV, Chowrashi P, Ayoob JC, Huang L, Mittal B, Sanger JM and Sanger JW (2000) Interaction of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Protein, Translocated Intimin Receptor (Tir), With Focal Adhesion Proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 47:307-318
27. Garmendia J., Frankel G., and Crepin VF. (2005). Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections : translocation, translocation, translocation. *Infect. Immun.* 73 : 2573-2585
28. Goldberg MB. (2001) Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:595-629
29. Goosney DL, DeVinney R, and Finlay BB (2001) Recruitment of Cytoskeletal and Signaling Proteins to Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Pedestals. *Infection and Immunity*. 69(5); 3315-332
30. Gouin E., Welch MD and Cossart P. (2005). Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology*. 8:35-45
31. Gruenheid S., De Vinney R., Blatt F., Goosney D., Gelkop S. and Gish GD. (2001). Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nature Cell Biol.* 3:856-859
32. Gruenheid S. And Finlay BB. (2003). Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*. Vol 422: 775-781
33. Gutsche-Perelroizen I, Lepault J, Ott A and Carlier MF. (1999). Filament assembly from profiling-actin. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(10): 6234-6243
34. Huang L, Mittal B, Sanger JW and Sanger JM (2002) Host Focal Adhesion Protein Domains That Bind to The Translocated Intimin Receptor (Tir) of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 55: 255-265

35. Kenny B. (1999). Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol.* 31:1229-41.
36. Kenny B. and Finlay BB. (1997). Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma. *Infect Immun.* 65:2528-36.
37. Knutton S., Lloyd DR and McNeish AS (1987). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocyte and cultured human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* 55:69-77.
38. Kovar DR. (2006). Arp2/3 ATP hydrolysis: to branch or to debranch?. *Nature Cell Biology.* 8(8): 783
39. Lee E and De Camilli P. (2002) Dynamin at actin tails. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 161-166
40. Lommel S, Benesch S, Rohde M, Wehland J and Rottner K. (2004) Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. *Cell Microbiol* 6: 243-254
41. Machesky LM, Mullis LD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, Hall ME and Pollard TD. (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 3739-3744
42. Mc Daniel TK. And Kaper JB. (1997). A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype of *E. coli* K-12. *Mol Microbiol.* 23:399-407.
43. McGough AM., Staiger CJ., Mina J-K. and Simonetta KD. (2003). The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Lett.* 552 75-81
44. Marchés O, Neugayréde JP, Boullier S, Mainil J, Charlier G, Raymond I, Pohl P, Boury M, De Rycke J, Milon A and Oswald Eric. (2000) Role of Tir and Intimin in the Virulence of Rabbit

- Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotype =103:H2. *Infection and Immunity*. 68(4): 2171-2182
45. Martin AC, Welch MD and Drubin DG (2006). Arp2/3 ATP hydrolysis-catalyzed branch dissociation is critical for endocytic force generation. *Nature Cell Biology* 8(8): 826
46. Marjomäki V and Schaibe UE. (2005). Microbial strategies to exploit host cells. Meeting on Spatial and Temporal Dynamics of the Endomembrane System. *EMBO reports*. Vol 6(59): 408-412
47. Millard TH, Sharp SJ and Machesky LM. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-Family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J*. 380: 1-17
48. Milon A, Oswald E and De Rycke J. (1999). Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 30: 203-219
49. Moon, HW., Whipp SC., Argenzio, RA., Levine, MM. And Gianella, RA. (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbits intestines. *Infect Immun.* 41: 1340-1351
50. Nataro JP, and Kaper JB. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Micro Rev.* 11 :142-201
51. Orth JD, Krueger EW, Cao H, and McNiven MA. (2002) The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proc Natl Acad Sci.* 99: 167-172
52. Pantaloni D, Boujemaa R, Didry D, Gounon P and Carlier MF. (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nature Cell Biol.* 2: 385-391
53. Pollard TD and Borisy GG. (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell.* 112:453-465
54. Renoult C., Blodin L., Fattoum A., Ternent D. and Maciver SK. (2001). Binding of gelsolin domain 1 and from ADF/cofilin. *Eur. J. Biochem.* 268:6165-6175

55. Robinson, R.C., Mejillano, M., Le, V.P., Burtnick, L.D., Yin, H.L. and Choe, S. (1999). Domain movement in gelsolin: a calcium activated switch. *Science* 286, 1939–1942.
56. Robins-Browne RM, Tokhi AM, Adams LM, Bennett-Wood V, Moisesides AV, Krejany EO and O’Gorman . (1994) Adherence characteristic of attaching and effacing of *Escherichia coli* from rabbit. *Infect Immun.* 62:1584-1592
57. Rodal AA, Sokolova O, Robins DB, Daugherty KM, Hippenmeyer Reizman H, Grigoreiff N and Goode BL. (2005). Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nature Structural & Molecular Biology.* 12(1): 26
58. Sanger JM, Chang R, Ashton F, Koper JB and Sanger JW (1996) Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 34:279-287
59. 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11638-11643.
60. Shaner NC, Sanger JW, and Sanger JM (2005) Actin and Alpha-Actin Dynamics in the Adhesion and Motility of EPEC and EHEC on Host Cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 60:104-120
61. Southwick FS. (2000). Gelsolin and ADF/cofilin enhance the actin dynamics of motile cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6936-6938
62. Suzuki T and Sasakawa C (2001) Molecular Basis of the Intracellular Spreading of *Shigella*. *Infection and Immunity.* 69(10): 5959-5966
63. Svitkina TM and Borisy GG (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell. Biol.* 145(5): 1009-1026

64. Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisy GG. (2003) Mechanism of filipodia initiation by reorganization of a dendritic network. *The Journal of Cell Biology*; 160(3): 409-421
65. Tampakaki AP., Fadouloglou VE., Gazi AD., Panopoulos NJ and Kokkinidis M. (2004) Conserved features of type III secretion. *Cellular Microbiology*. 6(9): 805-816
66. Unsworth KE, Mazurkiewicz P, Senf F, Zetti M, McNiven M, Way M and Holden DW (2006) Dynamin is required for F-actin assembly and pedestal forming by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd. *Cellular Microbiology*.
67. Vallance BA and Finlay BB (2000) Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:8799-8806
68. Vlisidou I, Dziva F, La Ragione RM, Best A, Garmendia J, Hawes P, Monaghan P, Cawthraw SA, Frankel G, Woodward MJ and Stevens MP. (2006). Role of intimin-Tir interactions and the Tir-Cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by *Escherichia coli* O157:H7. *Infectium and Immunity*. 74(1): 758-764
69. Weaver AM., Young ME., Lee W. and Cooper JA. (2003). Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr. Op. in Cell Biol*. 15:23-30
70. Welch MD and Mullins RD. (2002). Cellular Control of Actin Nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 18:247-88
71. Zhu C, Agin TC, Elliott ST, Johnson LA, Thate TE, Kaper JB, et al. (2001) Complete nucleotide sequence and analysis of the locus of enterocyte effacement from rabbit diarrheagenic *Escherichia coli* RDEC-1. *Infect Immun*. 69:2105-15
72. Zobiack N, Rescher U, Laarmann S, Michgehl S, Schmidt and Gerke V. (2002) Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic *E. coli* induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2. *Journal of Cell Science*. 115: 91-98