



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

“Estudio del papel de la proteína Orf15 codificada
en la isla de patogenicidad LEE de *Escherichia coli*
enteropatógena”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ORIENTACIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA

BIÓL. MARIANA ROMO CASTILLO

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BERTHA MA. JOSEFINA
GONZÁLEZ PEDRAJO**

**COMITÉ TUTOR: DR. GEORGES DREYFUS CORTÉS
DR. H. ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ**

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/043/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

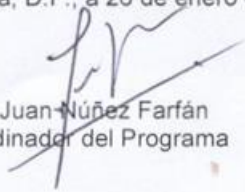
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 09 de noviembre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **ROMO CASTILLO MARIANA** con número de cuenta **508011779** con la tesis titulada "**Estudio del papel de la proteína Orf15 codificada en la isla de patogenicidad LEE de *Escherichia coli* enteropatógena**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. BERTHA MARIA JOSEFINA GONZALEZ PEDRAJO**:

Presidente: DR. GEORGES DREYFUS CORTES
Vocal: DRA. IRMA ROMERO ALVAREZ
Secretario: DRA. BERTHA MARIA JOSEFINA GONZALEZ PEDRAJO
Suplente: DRA. MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE
Suplente: DR. HIPOLITO ANGEL MANJARREZ HERNANDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de enero de 2010.


Dr. Juan-Núñez Farfán
Coordinador del Programa

JNF/DCRV/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Por la oportunidad de seguir desarrollándome profesionalmente, así como por el apoyo otorgado para la impresión de tesis, para la asistencia al XXVII Congreso Nacional de Bioquímica y al XVI Congreso de Bioenergética y Biomembranas.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 325 del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Bertha González Pedrajo, con el apoyo de los donativos 81847 de CONACyT y el IN224708 de la DGAPA, UNAM, así como un apoyo complementario de la Fundación Miguel Alemán.

Para la realización de este trabajo conté con una beca de CONACyT (registro 225666)

Este trabajo contó con la asesoría del Comité Tutoral conformado por la Dra. Bertha González Pedrajo, el Dr. Georges Dreyfus Cortés y el Dr. Ángel H. Manjarréz Hernández; a quienes agradezco por cada consejo, regaño, observación y experiencia que me brindaron para lograr crecer en la investigación.

De igual forma quiero agradecer a los miembros del Jurado, la Dra. Irma Romero Álvarez y la Dra. Carmen Wachter Rodarte, por ayudarme a mejorar y concluir esta etapa del proyecto

A la Dra. Norma Espinosa Sánchez por el excelente apoyo técnico y la colaboración que brindó a este trabajo, así como por sus consejos y disponibilidad.

A la Dra. Laura Ongay Larios y sus colaboradoras, la Biól. Minerva Mora y la Biól. Guadalupe Códiz, de la Unidad de Biología Molecular del IFC; al Ing. Juan Barbosa, Ivette Rosas y a toda la Unidad de Cómputo por su apoyo técnico; así como al Ing. Aurey Galván y al Ing. Manuel Ortíz del taller de mantenimiento.

BIÓL. MARIANA ROMO CASTILLO

*Quien no haya experimentado la irresistible atracción
de la ciencia, no podrá comprender su tiranía.*

Mary Shelley

Quiero agradecer de forma especial a cada una de las personas que me han dado lo que he necesitado para llegar hasta aquí el día de hoy...

A mis papás, por darme alas tan grandes y enseñarme que los únicos límites que hay son los que uno mismo se pone. Gracias por sus consejos, paciencia, apoyo... por todo lo que me han dado y que nunca tendré forma de pagárselos.

Al amor de mi vida, porque no sólo me ha dado apoyo, sino también energía para seguir. Por enseñarme que por difícil que sea una situación, siempre hay una solución y que lo importante es poner uno mismo la fuerza y voluntad para salir adelante. Gracias por todo tu amor, tu cariño y por ser parte de mi vida.

A mis hermanos, que me han ayudado a crecer, sin perder el "Peter Pan" que todos llevamos dentro. Gracias por apoyarme y acompañarme en cada etapa de mi vida.

A mis niñitos; por darme muchos minutos de alegría y juego que dan sabor a mi vida. Gracias por hacerme alguien importante en sus vidas y dejarme enseñarles un poco de lo que he aprendido.

A mi familia "muégano"... que por suerte sigue creciendo y me sigue llenando de apapachos, alegrías y buena vibra. Y también gracias a esas personitas que amo y extraño, sé que son mi luz desde el cielo.

A mis amigos de toda la vida y a los que se han agregado a lo largo del camino... ¡Gracias por todo!

A toda la gente del laboratorio, que me ha enseñado y ha compartido conmigo esta etapa en las "ciencias ocultas". Gracias por el apoyo en los malos momentos y las risas en los buenos ratos.

Gracias a cada una de las personas que han tocado mi vida, que no me han permitido perder los pies del suelo, que me han dado ojos para ver lo invisible y predecir lo impredecible. ¡Gracias!

CONTENIDO

RESUMEN	13
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	18
□ <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	18
□ Sistema de secreción tipo III	23
□ Jerarquía de ensamblaje del SST3 y regulación del orden de secreción ..	27
□ Locus de esfacelamiento enterocítico	30
□ Orf15	33
□ Dominio <i>coiled-coil</i>	34
ANTECEDENTES	37
□ FliJ (Sistema flagelar)	37
□ YscO (<i>Yersinia</i> spp)	39
□ Spa13 (<i>Shigella</i> spp)	41
□ InvI/SpaM (<i>Salmonella</i> spp)	42
□ Orf15 (<i>Citrobacter</i> spp)	43
□ Cpn0706 (<i>Chlamydophila</i> spp)	43
□ HrpO (<i>Pseudomonas syringae</i> pv phaseolica)	44
OBJETIVO GENERAL	46
OBJETIVOS PARTICULARES	46
MATERIAL Y MÉTODO	47
□ Cepas utilizadas, plásmidos y construcciones	47

□ Medios de cultivo y antibióticos.....	49
□ Generación de construcciones.....	49
□ Producción, purificación y cuantificación de proteínas recombinantes..	51
□ Producción de anticuerpos policlonales.....	53
□ Inmunodetección de proteínas tipo Western blot.....	53
□ Ensayo de secreción de proteínas <i>in vitro</i>	54
□ Generación de una mutante nula en el gen <i>orf15</i>	55
RESULTADOS.....	58
□ Orf15 comparte las mismas características que las proteínas codificadas por los genes sinténicos.....	58
□ Construcciones con el gen <i>orf15</i> silvestre y versiones trucas.....	60
□ Producción de la proteína recombinante His-Orf15.....	65
□ Purificación de la proteína His-Orf15 en condiciones nativas.....	66
□ Obtención de anticuerpos anti-Orf15.....	68
□ His- <i>orf15</i> presenta formas oligoméricas resistentes a SDS.....	69
□ Orf15 posee un efecto multicopia que bloquea la secreción de proteínas.....	70
□ Orf15 es un componente esencial del SST3 de EPEC.....	72
□ La región C-terminal de Orf15 es indispensable para su función.....	76
□ La sobreproducción de la ATPasa EscN restaura parcialmente la secreción en la cepa Δ <i>orf15</i>	77
DISCUSIÓN.....	80
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	84
BIBLIOGRAFÍA.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del pedestal que se forma como resultado de la lesión A/E.....	23
Figura 2. Estructura del SST3.....	25
Figura 3. Jerarquía de secreción de sustratos del SST3 durante la biogénesis del injectisoma de EPEC.....	29
Figura 4. Composición de la isla LEE.....	31
Figura 5. Genes sinténicos a <i>orf15</i> en diferentes SST3.....	33
Figura 6. Esquema de una estructura dimérica tipo <i>coiled-coil</i>	36
Figura 7. Representación espacial de las interacciones entre los componentes del cuerpo basal y el aparato de exportación con FliJ.....	38
Figura 8. Perfil de secreción de la cepa Δ <i>yscO</i> en <i>Yersinia</i>	40
Figura 9. Fenotipo de la mutante Δ <i>spa13</i> y transcripción de <i>spa13</i>	42
Figura 10. Producción y secreción de proteínas en la cepa Δ <i>orf15</i>	43
Figura 11. Interacción de Cpn0706 con la ATPasa y oligomerización.....	44
Figura 12. Estrategia experimental para la elaboración de construcciones en plásmidos de expresión.....	50
Figura 13. Esquema de inmunización.....	53
Figura 14. Predicción de la estructura secundaria de Orf15.....	59
Figura 15. Similitud de Orf15 con las proteínas codificadas por genes sinténicos.....	60
Figura 16. Amplificación por PCR del gen <i>orf15</i> y las versiones truncas <i>orf15</i> ₍₁₋₆₀₎ , <i>orf15</i> ₍₆₀₋₁₂₅₎	62
Figura 17. Análisis de restricción de las construcciones obtenidas de pGEM T-Easy y las diferentes versiones de <i>orf15</i> con la enzima EcoRI.....	63
Figura 18. Alineamiento de las secuencias de las construcciones obtenidas en pGEM T-Easy con la secuencia reportada del gen <i>orf15</i>	64
Figura 19. Construcciones de las versiones de <i>orf15</i> en los vectores de expresión pET19b y pTrc99A_FF4.....	65
Figura 20. Producción de la proteína His-Orf15.....	66
Figura 21. Purificación de His-Orf15.....	67
Figura 22. Inmunodetección tipo Western blot utilizando los anticuerpos policlonales anti-Orf15.....	69
Figura 23. Formas oligoméricas de His-Orf15 resistentes a SDS.....	70
Figura 24. Efecto multicopia de Orf15.....	72
Figura 25. Esquema del gen <i>orf15</i> silvestre (WT) y el gen mutado con el casete de Kanamicina (Δ <i>orf15</i>).....	73

Figura 26. Productos de PCR obtenidos durante el análisis de la mutante.....	73
Figura 27. Fenotipo de secreción de la mutante $\Delta orf15$	74
Figura 28. Complementación de $\Delta orf15$	75
Figura 29. Complementación de $\Delta orf15$ con versiones de Orf15 con etiquetas en el C-terminal.....	77
Figura 30. Sobreproducción de EscN en $\Delta orf15$	79

BIÓL. MARIANA ROMO CASTILLO

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas codificadas en el LEE y sus homólogos en otros sistemas de secreción tipo III.....	31
Tabla 2. Cepas utilizadas.....	47
Tabla 3. Vectores utilizados.....	48
Tabla 4. Construcciones.....	48
Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación de <i>orf15</i>	50
Tabla 6. Cebadores diseñados para la generación de la mutante Δ <i>orf15</i>	57

BIÓL. MARIANA ROMO CASTILLO

ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
A/E	Adherencia y esfacelamiento
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BFP	<i>Bundle forming pilus</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactopiranosido
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LEE	Locus de esfacelamiento enterocítico
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Ni-NTA	Níquel-ácido nitrilotriacético
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina amortiguadora con fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SST3	Sistema de secreción tipo III
UFC	Unidades formadoras de colonias
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) coloniza el intestino humano y es uno de los patógenos más importantes que infecta a niños menores de 2 años de edad en países en vías de desarrollo. La principal característica de esta infección es la producción de diarrea de tipo acuoso generada como consecuencia de una serie de proteínas de virulencia que inyecta la bacteria a la célula hospedera a través de un sistema de secreción tipo III (SST3).

En EPEC todos los genes necesarios para la biogénesis del SST3 se encuentran en una isla de patogenicidad cromosomal denominada Locus de esfacelamiento enterocítico (LEE), la cual está conformada por 41 genes. A pesar de que varias de las proteínas codificadas en LEE se han caracterizado, aún existen algunas cuya función se desconoce, entre las que se encuentra la proteína codificada por el gen *orf15*. Orf15 tiene una masa molecular predicha de 15.46 kDa, un punto isoeléctrico básico (9.6) y una estructura secundaria principalmente α -helicoidal, con alta probabilidad de formar estructuras tipo *coiled coil* (hélices super-enrolladas), características que comparte con las proteínas codificadas por los genes sinténicos de otros SST3: *FliJ* (flagelo), *Spa13* (*Shigella*), *SpaM/InvI* (*Salmonella*), *YscO* (*Yersinia*), *Cpn0706* (*Chlamydomphila*) y *HrpO* (*Pseudomonas*). Todas estas proteínas se requieren en sus respectivos sistemas para que se pueda llevar a cabo la secreción.

En el presente trabajo se realizó una caracterización parcial de la proteína Orf15, así como de su función en el proceso de secreción de efectores de virulencia en EPEC. Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que Orf15 es un componente esencial del aparato de secreción de EPEC. La proteína recombinante se purificó de forma soluble en condiciones nativas y mostró diferentes estados oligoméricos resistentes a SDS. La proteína His-Orf15 es funcional en ensayos de complementación y su región carboxilo es indispensable para la función. La sobreproducción de Orf15 tiene un efecto negativo sobre la secreción de proteínas del SST3, lo que adicionalmente indica su participación como un componente del aparato secretor. En ausencia de Orf15, la sobreproducción de la ATPasa EscN es capaz de restaurar parcialmente la secreción de proteínas, lo que sugiere que la función de Orf15 se encuentra relacionada con la de dicha enzima.

ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) colonizes the human intestine and is one of the most important bacterial pathogens infecting children younger than 2 years in developing countries. The main characteristic of this infection is the production of diarrhea, generated as a result of a series of virulence proteins that are injected from the bacterium into the host cell through a type III secretion system (T3SS). In EPEC, all the genes necessary for the biogenesis of the T3SS are encoded in a pathogenicity island denominated LEE (locus of enterocyte effacement), which is conformed by 41 genes. Although several of the proteins encoded in the LEE have been characterized, there are still some whose function is not known, among these, the one encoded by the *orf15* gene. Orf15 has a predicted molecular mass of 15.46 kDa, a basic isoelectric point (9.6) and a mainly α -helical secondary structure, with high probability of forming *coiled-coil* structures, characteristics that are shared with proteins encoded by synthetic genes of other T3SS: FliJ (flagellum), Spa13 (*Shigella*), Spam/InvI (*Salmonella*), YscO (*Yersinia*), Cpn0706 (*Chlamydomphila*) and HrpO (*Pseudomonas*). All these proteins are required in their respective systems so that the secretion can be carried out.

In the present work we performed an initial characterization of Orf15 and its function in the protein secretion process in EPEC. Our results demonstrate that Orf15 is an essential component of the secretion apparatus. The recombinant protein was purified under native conditions

and it showed different SDS-resistant oligomeric forms. His-Orf15 is functional in complementation assays and its C-terminal region is essential for function. Overproduction of Orf15 has a negative effect on protein secretion, indicating its participation as a secretion apparatus component. In the absence of Orf15, the overproduction of the ATPase EscN partially restores protein secretion, suggesting that the function of Orf15 is related to that of EscN.

BIÓL. MARIANA ROMO CASTILLO

INTRODUCCIÓN

➤ ***Escherichia coli* enteropatógena**

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia Enterobacteriaceae y es el microorganismo predominante de la microbiota intestinal del humano. Este organismo anaerobio facultativo coloniza el tracto gastrointestinal de los niños, dentro de las primeras horas de vida. A pesar de que se creía que esta bacteria no causaba daños al hombre, se han identificado algunas cepas capaces de provocar enfermedades como diarrea, septicemia, meningitis e infecciones urinarias, entre otras (Nataro & Kaper, 1998).

Dentro de las cepas causantes de diarrea, *E. coli* enteropatógena (EPEC) fue la primera bacteria asociada con casos de diarrea infantil en los años 40s y 50s. Estudios en Brasil (Gomes *et al.*, 1991), México (Vidal *et al.*, 2007) y Bangladesh (Albert *et al.*, 1991) mostraron que del 30 al 40% de la diarrea infantil es provocada por EPEC y se estima que causa la muerte de miles de niños al año. Además, se ha reportado en algunos países latinoamericanos que la infección por EPEC en la población infantil supera a la provocada por *Campylobacter* y por rotavirus (Nataro & Kaper, 1998). Una de las principales características de la infección causada por EPEC es la diarrea de tipo acuoso, que puede ocurrir en diversos grados de intensidad. Además, es común que los niños infectados

presenten vómito y fiebre. El periodo de incubación varía entre 3 y 24 horas después de que un individuo voluntario ingiere en condiciones experimentales un inóculo grande de bacterias (10^9 a 10^{10} UFC); sin embargo, se piensa que el inóculo que infecta de manera natural a los niños es mucho menor (Nataro & Kaper, 1998).

Como parte de la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo las autoridades de salud en México, se ha reportado que EPEC se presenta en forma endémica hasta en el 6% de la población (Flisser *et al.*, 2002), una cifra muy parecida a la de países industrializados como Alemania y Australia en los que se ha encontrado que 5.9 y 7.6% respectivamente de niños sanos son portadores de cepas de EPEC (Bettelheim *et al.*, 2003). Con los datos epidemiológicos obtenidos recientemente a partir de estudios realizados en varios estados del país, es posible advertir que EPEC es causante del 17 al 19% de los casos de diarrea infantil; lo que indica que en México uno de cada cinco niños que enferman de diarrea puede estar infectado con este patotipo de *E. coli* (Estrada-Garcia *et al.*, 2009).

Recientemente se ha sugerido que la infección por esta bacteria puede promover la formación de adenocarcinomas por defectos exacerbados de rutas oncogénicas en el tejido epitelial del colon humano (Maddocks *et al.*, 2009).

EPEC induce una histopatología distintiva conocida como lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E), la cual se caracteriza por la eliminación de las microvellosidades del epitelio intestinal, la adherencia íntima de la bacteria con la célula hospedera y la formación de una estructura rica en actina, en forma de pedestal, por debajo del sitio de unión de la bacteria (Ochoa *et al.*, 2008).

Se han propuesto 3 etapas durante la infección por EPEC: (i) Adherencia inicial a la célula hospedera, (ii) Producción y translocación de proteínas efectoras de virulencia a través de un sistema de secreción tipo III denominado inyectisoma y (iii) Adherencia íntima entre la bacteria y la célula hospedera lo que conlleva a la formación del pedestal.

En la primera etapa de adherencia inicial, EPEC se adhiere al epitelio a través de una fimbria tipo IV denominada BFP (*bundle forming pilus*). Esta fimbria es la responsable del fenotipo de adherencia localizada, el cual se caracteriza por la formación de microcolonias en la superficie de la célula epitelial del intestino (Ochoa *et al.*, 2008).

Durante la segunda etapa, EPEC utiliza una vía de transporte de proteínas denominada sistema de secreción tipo III (SST3), como una "jeringa molecular" para inyectar a la célula eucarionte proteínas efectoras de virulencia que interfieren con las rutas de señalización celular, causando principalmente alteraciones en el citoesqueleto de la célula hospedera, lo que resulta en la despolimerización de actina y la pérdida de las microvellosidades. Una de las proteínas translocadas, denominada Tir (*translocated intimin receptor*), se inserta en la membrana plasmática de la célula eucarionte en donde funciona como receptor para una adhesina de la membrana externa bacteriana, llamada intimina. La translocación de proteínas interrumpe diversos procesos celulares en el hospedero, provocando principalmente daño a las uniones estrechas lo que modifica la permeabilidad paracelular, de igual modo se afecta la integridad mitocondrial, se altera el flujo iónico y existe un desequilibrio electrolítico lo que finalmente da origen a la muerte celular.

En la tercera etapa, la interacción Tir-intimina produce una adherencia íntima entre la bacteria y el enterocito (Figura 1), se promueve el reclutamiento de proteínas del citoesqueleto y la acumulación de actina por debajo del sitio de adherencia del patógeno. Como producto del reclutamiento y la acumulación masiva de proteínas del citoesqueleto del enterocito se forma el pedestal antes mencionado (Figura 1) (Goosney *et al.*, 2001). A pesar de que se han estudiado con detalle cada una de

las etapas que conllevan a la formación de los pedestales, el mecanismo preciso de producción de la diarrea en los niños infectados con EPEC aún no es claro.

Los diferentes serotipos de EPEC se clasifican con base en la presencia de algunos genes específicos de virulencia como son el gen *eae* (intimina), el gen *bfpA* (fimbria BFP) y el gen *stx* (toxina tipo Shiga); definiéndose como cepas típicas o atípicas. Las cepas de EPEC que son *eae⁺bfpA⁺stx⁻* se clasifican como típicas y su único reservorio es el humano, mientras que las cepas que son *eae⁺bfpA⁻stx⁻* se clasifican como atípicas y pueden adicionalmente ser patógenos de muchas especies animales (conejo, puerco, mono, etc.). La frecuencia de cepas típicas y atípicas, así como su asociación con diarrea aguda o persistente no está aún definida. Las cepas típicas de EPEC fueron consideradas por muchos años la principal causa de diarrea infantil en países en desarrollo, mientras que en países desarrollados, las cepas atípicas eran la causa más importante de diarrea. Sin embargo, datos recientes sugieren que las cepas atípicas de EPEC son más prevalentes que las típicas tanto en países industrializados como en aquellos en desarrollo (Ochoa et al., 2008).

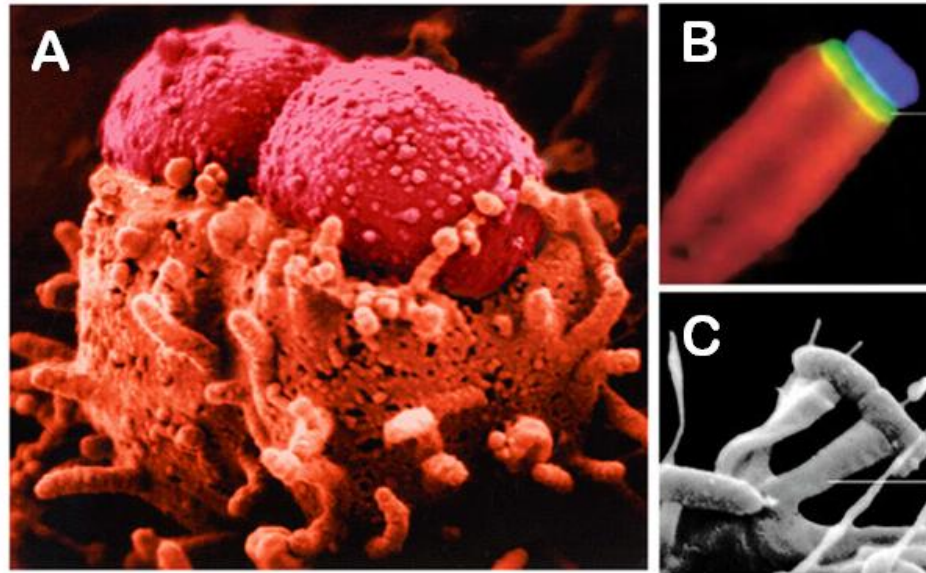


Figura 1. Estructura del pedestal que se forma como resultado de la lesión A/E. A. Fotografía de microscopía electrónica (Kaper *et al.*, 2004) B. Inmunofluorescencia mostrando la adherencia de EPEC (azul), Tir (verde) y la F-actina (rojo) del hospedero (Hayward *et al.*, 2006). C. Fotografía de microscopía electrónica del pedestal (Hayward *et al.*, 2006).

➤ Sistema de secreción tipo III

Diversas bacterias patógenas Gram negativas poseen la habilidad de inyectar proteínas de virulencia directamente a las células hospederas. Estos factores de virulencia, conocidos como proteínas efectoras, alteran los procesos celulares eucariotes y permiten al patógeno modular el ambiente del hospedero haciéndolo más susceptible a la invasión e infección. El componente responsable de mediar la secreción de los efectores de virulencia a la célula hospedera es el sistema de secreción tipo III (SST3), también llamado sistema de secreción de efectores de virulencia o inyectisoma (Morales *et al.*, 2008).

Existen dos tipos generales de SST3: el inyectisoma antes mencionado; y el sistema de secreción de proteínas flagelares (flagelo bacteriano). Debido a la similitud estructural entre ambos (Figura 2A y B); y a que varias de las proteínas de estas maquinarias de secreción están altamente conservadas, se ha propuesto que éstos evolucionaron de forma divergente a partir de un ancestro común (Pallen *et al.*, 2005).

El inyectisoma presenta un canal central que permite el transporte de proteínas parcialmente desplegadas en un solo paso desde el citosol bacteriano hasta el citosol hospedero. Esta estructura macromolecular consiste de un cuerpo basal, compuesto por una serie de anillos en las membranas interna y externa de la bacteria unidos por un eje periplásmico; y una estructura extracelular compuesta por una aguja hueca, una extensión de la aguja que forma un "casquillo" y un poro de translocación que se forma en la membrana de la célula hospedera (Figura 2B) (Morales *et al.*, 2008). A pesar de que los inyectisomas de diferentes microorganismos son similares, en EPEC se ha encontrado una diferencia y es que además de la aguja, presenta un filamento largo conformado por la proteína EspA (Daniell *et al.*, 2003), que funciona como un conducto entre la bacteria y la célula hospedera (Figura 2C) (Ghosh, 2004).

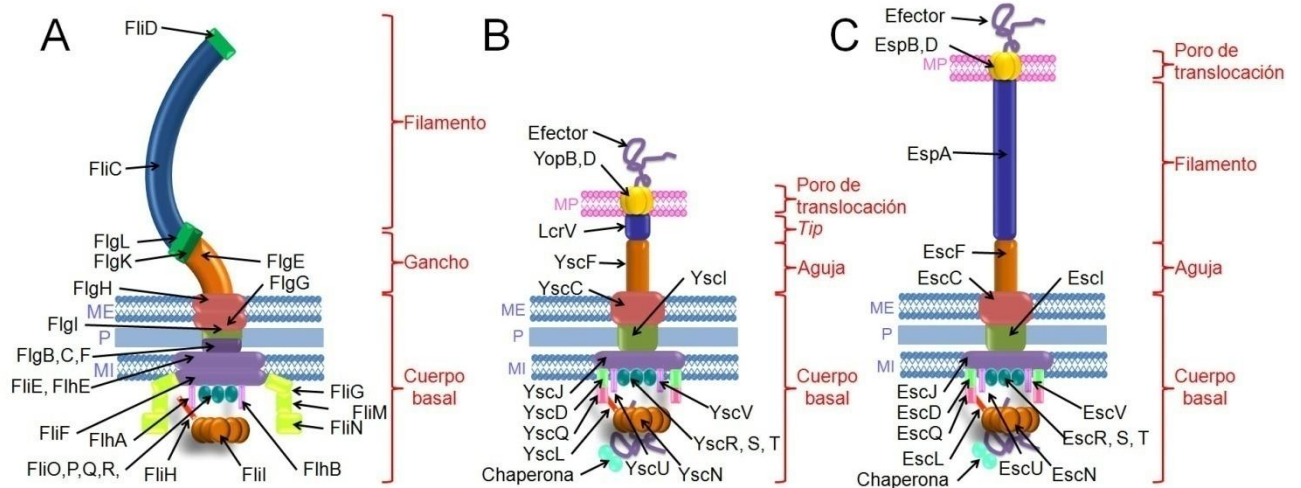


Figura 2. Estructura del SST3. A. Sistema flagelar (*Salmonella* sp.). B. Sistema de virulencia (*Yersinia* sp.) C. Sistema de virulencia de EPEC. MI: membrana interna bacteriana, P: Espacio periplásmico, ME: Membrana externa bacteriana, MP: Membrana plasmática de la célula eucariote.

Las proteínas que se secretan a través de este sistema se pueden clasificar en 2 categorías: translocadoras y efectoras. Las proteínas translocadoras se encargan de formar el poro de translocación en la membrana de la célula hospedera y son indispensables para la inyección de efectores al hospedero. Las proteínas efectoras modulan las funciones celulares, las rutas de transducción de señales y bloquean los mecanismos de defensa del hospedero. Mientras que cada patógeno puede poseer una gama única de efectores para ejercer su propia estrategia de infección en un hospedero específico, los translocadores están generalmente conservados entre los diferentes patógenos. Debido a que los translocadores se requieren para la inyección de efectores en la célula hospedera, se ha propuesto que se han desarrollado mecanismos para asegurar que éstos sean secretados antes que los efectores, de forma que estos últimos puedan ser exportados directamente dentro de la célula hospedera sólo hasta que se ha formado el poro de translocación. Sin

embargo, el control de este proceso ordenado de secreción aún no se comprende completamente (Deng *et al.*, 2005).

Asimismo, en la membrana interna de la bacteria o asociadas a ésta, se localizan una serie de 9 proteínas altamente conservadas en los diferentes SST3, las cuales son indispensables para el ensamblaje del sistema y participan en el reclutamiento, la selección y la jerarquía de secreción de los sustratos; conformando lo que se conoce como "aparato de exportación" (Hueck, 1998, Tampakaki *et al.*, 2004). Entre éstas se encuentra una proteína con función de ATPasa la cual posee similitud con la subunidad β de la F_0F_1 ATPasa y se cree provee la energía necesaria para el proceso de secreción (Dreyfus *et al.*, 1993, Fan & Macnab, 1996).

Otras proteínas que participan de forma importante en el proceso de secreción a través del inyectisoma son las proteínas chaperonas, las cuales se requieren para la estabilización del sustrato (efector o translocador), así como para la prevención de interacciones prematuras en el citosol, entre otras funciones (Parsot *et al.*, 2003).

En el 2004, Lee y Galán demostraron que las chaperonas son las encargadas de brindar especificidad a sus sustratos para la secreción. Gracias al dominio de unión a chaperona que poseen los efectores en los primeros ~140 aminoácidos de la región N-terminal, éstos son capaces de

interactuar con sus chaperonas correspondientes y llegar al aparato secretor para ser transportados a través de éste (Aldridge & Hughes, 2001). Al eliminar dicho dominio en los efectores, éstos son secretados a través de otro sistema como es el sistema flagelar; demostrando no sólo que las chaperonas tienen una función esencial en la secreción de los efectores, sino que en ausencia de éstas, los sustratos pueden ser reconocidos y secretados por el sistema flagelar (Lee & Galan, 2004).

➤ **Jerarquía de ensamblaje del SST3 y regulación del orden de secreción**

Las bacterias patógenas pueden responder adecuadamente al medio para coordinar la expresión de genes de virulencia y sobrevivir dentro de un nicho específico. Estudios *in vitro* de la lesión A/E han demostrado que este complejo fenotipo está finamente regulado en respuesta a la temperatura y la fase de crecimiento. La pre-incubación de EPEC a 37°C desencadena la formación de la lesión A/E al infectar células *in vitro*. La lesión no se forma con bacterias pre-incubadas a 28°C antes de infectar a las células y se forma fácilmente en cultivos celulares incubados con bacterias que se encuentran en la fase de crecimiento exponencial temprana. Consistente con la regulación de la temperatura en la formación de la lesión A/E, la secreción de proteínas vía SST3 ocurre preferentemente a la temperatura del cuerpo del hospedero, en medio de cultivo de tejidos como el medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) a pH 7 y a una osmolaridad fisiológica (Kenny et al., 1997). La secreción de las proteínas también se estimula en presencia de

bicarbonato de sodio o por omisión de calcio en el medio de cultivo, mientras que se inhibe por cloruro de amonio (Ide et al., 2003).

La biosíntesis del flagelo y del inyectisoma es un proceso altamente regulado. A través de la vía general de secreción Sec se ensamblan los anillos del cuerpo basal y el aparato de exportación. Posteriormente, el ensamblaje de la parte distal ocurre a través de la secreción secuencial de los diferentes componentes que son reconocidos por el aparato de secreción tipo III. En el flagelo, las subunidades constituyentes del gancho y el filamento se secretan a través de un canal central en la estructura y se ensamblan por polimerización en el extremo distal (Yonekura et al., 2000). Considerando las similitudes en las secuencias, la función y la estructura de algunos componentes del flagelo y el inyectisoma, se puede especular que el ensamblaje de la aguja puede ocurrir de la misma manera (Journet et al., 2005). Para el filamento EspA de EPEC se ha demostrado que la adición y polimerización de las subunidades ocurre en el extremo distal del filamento en crecimiento (Crepin et al., 2005).

Un modelo de la jerarquía de secreción de proteínas en el SST3 de EPEC se representa en la Figura 3. Primero, los componentes de la membrana externa e interna, así como los que forman el aparato de exportación se ensamblan por medio de la vía Sec. Posteriormente, se forma el eje periplásmico a través de la secreción de subunidades de la proteína EscI

vía SST3 y de la misma forma se lleva a cabo el ensamblaje de las subunidades EscF de la aguja. Una vez que se ha formado la aguja, comienza la secreción vía SST3 de las proteínas translocadoras EspA, EspB y EspD. Finalmente, después de que se ha formado el poro de translocación en la membrana plasmática de la célula hospedera, hay un cambio en la especificidad de sustratos y comienza la secreción y translocación de las proteínas efectoras a la célula hospedera (Thomas et al., 2007).

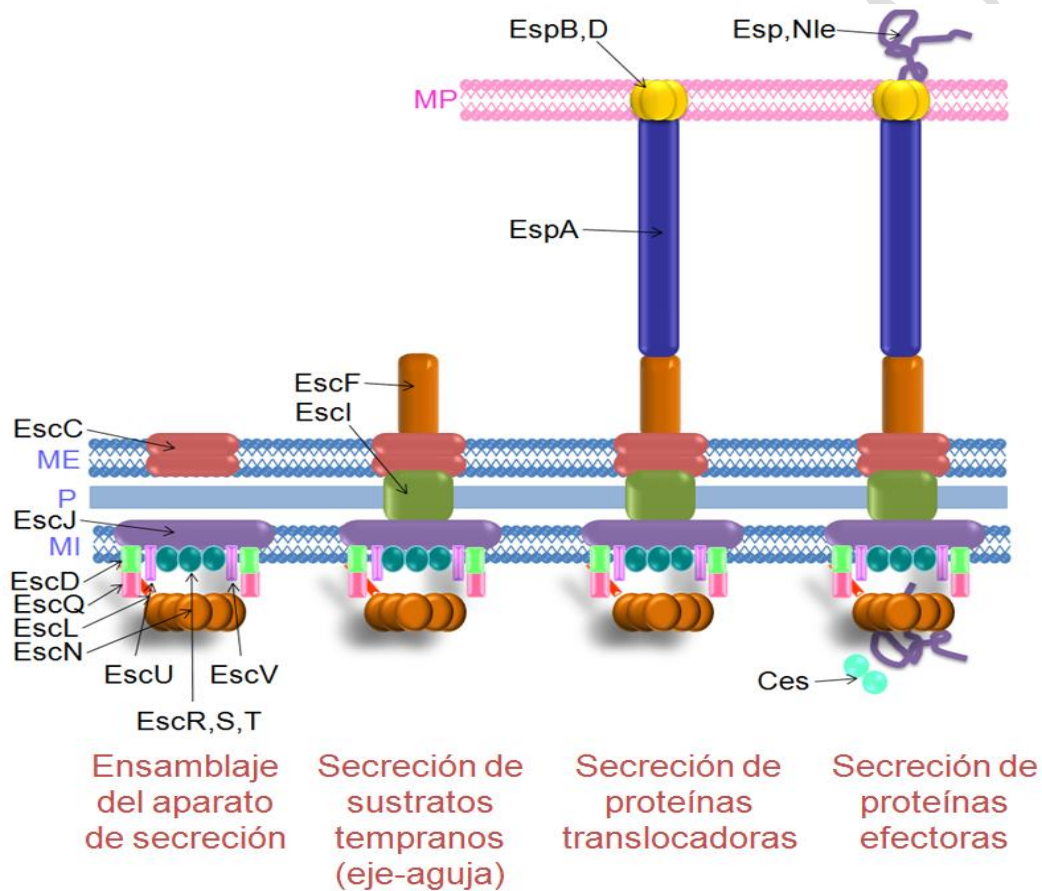


Figura 3. Jerarquía de secreción de sustratos del SST3 durante la biogénesis del inyectisoma de EPEC. MI: membrana interna bacteriana, P: Espacio periplásmico, ME: Membrana externa bacteriana, MP: Membrana plasmática de la célula eucariote.

Los mecanismos precisos mediante los que se regula la secreción ordenada de proteínas aún se desconocen. Sin embargo, se ha reportado que

las proteínas SepL y SepD podrían estar involucradas en el proceso de diferenciación entre las proteínas translocadoras y las efectoras durante el ensamblaje del inyectisoma. Se ha demostrado que estas proteínas son esenciales para la secreción de translocadores, pero no para la de efectoras y que la jerarquía que establece el complejo SepL/SepD es una característica conservada en todos los patógenos que forman la lesión A/E, incluyendo a *Citrobacter rodentium* (patógeno de roedores) y EHEC (patógeno de humanos) (Deng et al., 2005).

➤ **Locus de esfacelamiento enterocítico**

En EPEC todos los genes necesarios para la formación de la lesión A/E y la biogénesis del SST3 se encuentran en una isla de patogenicidad cromosomal denominada Locus de esfacelamiento enterocítico (LEE). El locus LEE está conformado por 41 genes (Figura 4 y Tabla 1) organizados principalmente en 5 operones policistrónicos (Clarke et al., 2003), que codifican para proteínas estructurales del inyectisoma, translocadoras, efectoras, chaperonas, reguladores transcripcionales, el receptor (Tir) y la adhesina (intimina).

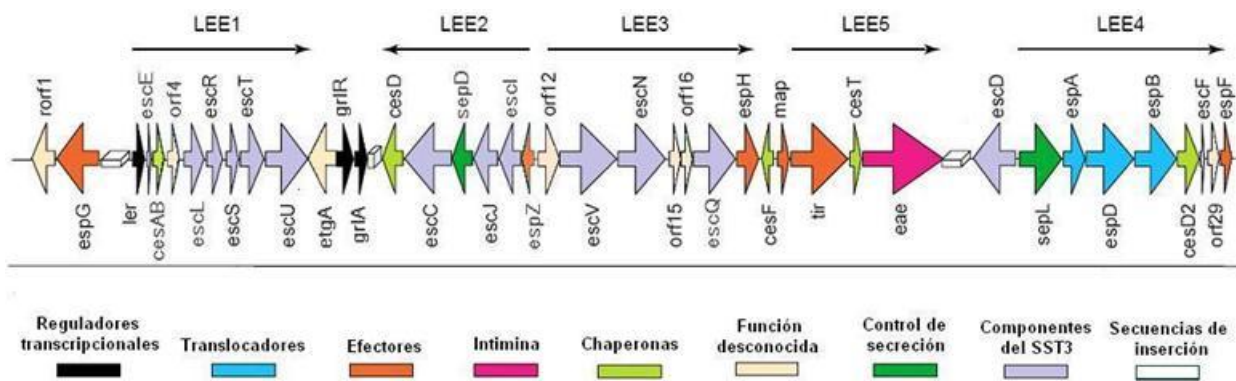


Figura 4. Composición de la isla LEE. LEE1-LEE5 representan los 5 operones.

Tabla 1. Proteínas codificadas en el LEE y sus homólogos en otros sistemas de secreción tipo III.

Proteína	Homólogo	Función	Proteína	Homólogo	Función
Rorf1	SrgB (<i>Salmonella</i>).	N/I	EscV	LcrD (<i>Yersinia</i>), FlhA (flagelo).	Componente del Aparato de exportación
EspG	VirA (<i>Shigella</i>).	Efector	EscN	YscN (<i>Yersinia</i>), FliI (flagelo).	ATPasa
Ler	H-NS, StpA.	Regulador transcripcional positivo	Orf15	YscO? (<i>Yersinia</i>), HrpO? (<i>Pseudomonas</i>), InvI (<i>Salmonella</i>), FliJ? (flagelo).	N/I.
EscE	YscE (<i>Yersinia</i>), PscE (<i>Pseudomonas</i>), SsaE (<i>Salmonella</i>).	ST3	Orf16	YscP (<i>Yersinia</i>), FliK (flagelo).	Regulador de la longitud del gancho/aguja
CesAB		Chaperona	EscQ	YscQ (<i>Yersinia</i>), FliN (flagelo).	Anillo citoplásmico
Orf4	YPO0261, SsaK, CV2589.	N/I	EspH	N/I	Efector translocado
EscL	YscL (<i>Yersinia</i>), FliH (flagelo).	Regulador negativo de la ATPasa EscN	CesF	N/I	Chaperona de EspF
EscR	YscR (<i>Yersinia</i>), FliP (flagelo).	Componente del Aparato de exportación	Map	N/I	Efector translocado

EscS	YscS (<i>Yersinia</i>), FliQ (flagelo).	Componente del Aparato de exportación	Tir	N/I	Efecto- r translocado
EscT	YscT (<i>Yersinia</i>), FliR (flagelo).	Componente del Aparato de exportación	CesT	SycT (<i>Yersinia</i>).	Chaperona múltiple de Tir, Map, EspF.
EscU	YscU (<i>Yersinia</i>), FlhB (flagelo).	Componente del Aparato de exportación	Eae	N/I	Adhesina (Intimina)
EtgA	IagB (<i>Salmonella</i>), IpgF (<i>Shigella</i>).	Transglicosilas a lítica	EscD	YscD (<i>Yersinia</i>), PrgH (<i>Salmonella</i>).	Anillo membrana interna
GrlR	Regulador bongori.	Regulador transcripcional negativo	SepL	SsaL (<i>Salmonella</i>).	Switch en la secreción de efectores
GrlA	Regulador bongori.	Regulador transcripcional positivo	EspA	FliC (flagelo).	Filamento
CesD	SycD (<i>Yersinia</i>), LcrH (<i>Shewanella</i>).	Chaperona de EspB y EspD	EspD	YopB (<i>Yersinia</i>).	Translocador, formador del poro
EscC	YscC (<i>Yersinia</i>), MxiD (<i>Shigella</i>), InvG (<i>Salmonella</i>).	Anillo membrana externa	EspB	YopD (<i>Yersinia</i>).	Translocador, formador del poro y efector translocado
SepD	N/I	Switch de la secreción de efectores	CesD2	LcrR (<i>Yersinia</i>).	Chaperona de EspD
EscJ	YscJ (<i>Yersinia</i>), PrgK (<i>Salmonella</i>), FliF (flagelo).	Anillo membrana interna	EscF	YscF (<i>Yersinia</i>).	Aguja
EscI	PrgJ (<i>Salmonella</i>), MxiI (<i>Shigella</i>), YscI (<i>Yersinia</i>).	Eje periplásmico	CesA2	SsaL (<i>Salmonella</i>).	Chaperona auxiliar de EspA
EspZ	N/I	Efecto- r translocado	EspF	N/I.	Efecto- r translocado
Orf12	SsaM				

N/I: no identificado (Pallen et al., 2005).

➔ Orf15

Aunque a varias de las proteínas codificadas en el LEE se les ha asignado alguna función (Tabla 1), aún quedan componentes sin caracterizar entre los que se encuentra la proteína codificada por el gen *orf15*. La proteína Orf15 tiene una masa molecular predicha de 15.46 kDa, un punto isoelectrico básico y una estructura secundaria principalmente α -helicoidal, con una alta probabilidad de formación de estructuras tipo *coiled coil* (hélices super-enrolladas). A pesar de que no se han encontrado homólogos de Orf15 en otros SST3, las características de Orf15 previamente mencionadas las comparte con proteínas codificadas por genes sinténicos (que se encuentran en la misma posición en otros organismos); en este caso, localizados inmediatamente río abajo del gen que codifica la ATPasa, como son *FliJ* (flagelo), *Spa13* (*Shigella*), *SpaM/InvI* (*Salmonella*), *YscO* (*Yersinia*), *Cpn0706* (*Chlamydomophila*) y *HrpO* (*Pseudomonas*) (Figura 5).

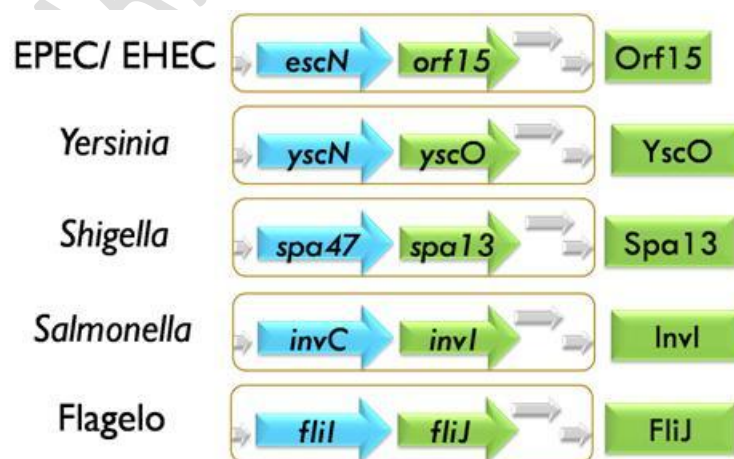


Figura 5. Genes sinténicos a *orf15* en diferentes SST3. Verde: gen equivalente a *orf15*. Azul: gen que codifica la ATPasa.

A pesar de que las proteínas codificadas por estos genes no comparten una alta similitud de secuencia (20-34%), se ha visto que comparten otras características como una masa molecular pequeña, punto isoeléctrico básico, estructura secundaria preferentemente alfa-helicoidal con alta probabilidad de formar estructuras tipo *coiled-coil* (Figura 14B) y todas son esenciales para la secreción vía SST3 (Minamino *et al.*, 2000, Gazi *et al.*, 2008, Collazo *et al.*, 1995, Payne & Straley, 1998, Penno *et al.*, 2006).

➔ **Dominio coiled-coil**

El dominio *coiled-coil* es un motivo de plegamiento común y altamente versátil que se encuentra en un amplio rango de proteínas estructurales y reguladoras con funciones diversas que van desde el ensamblaje de complejos macromoleculares hasta el reconocimiento molecular (Lupas, 1996). La mayoría de las proteínas con regiones *coiled-coil* que se han determinado experimentalmente hasta la fecha, por medio de diferentes métodos biofísicos como cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear, son mayoritariamente de origen eucarionte. Entre las proteínas con regiones *coiled-coil* de procariontes que se han identificado como las contrapartes de proteínas eucariontes, se incluyen reguladores transcripcionales, receptores membranales o mediadores de ensamblaje de subunidades de estructuras como el flagelo (Delahay & Frankel, 2002).

Las regiones *coiled-coil* contienen dos o más α -hélices anfipáticas que se enrollan alrededor de otra. La asociación resultante es un elemento estructural de muchas proteínas y regula interacciones homo- y hetero-oligoméricas. La secuencia de aminoácidos para la formación de estas α -hélices presenta un patrón de repetición de 7 residuos, denominado héptada repetida, en la cual cada residuo se representa por las letras a-b-c-d-e-f-g (Delahay & Frankel, 2002). Los residuos "a" y "d" son típicamente hidrofóbicos y forman un núcleo en el centro de la hélice; proveen la dirección de la fuerza de interacción y pueden influir también en el estado de oligomerización. Las interacciones electrostáticas entre los residuos polares o cargados "e" y "g" proveen el balance de las fuerzas atrayentes y repulsivas a través de la interfase hidrofóbica, la cual define la especificidad y contribuye con la estabilidad de las asociaciones de la hélice (Figura 6) (Zhou *et al.*, 1994).

Las interacciones iónicas entre las hélices son también importantes para determinar el alineamiento y la orientación de las regiones *coiled-coil* y pueden modular el ensamblaje de éstas de manera dependiente del pH (Dutta *et al.*, 2001).

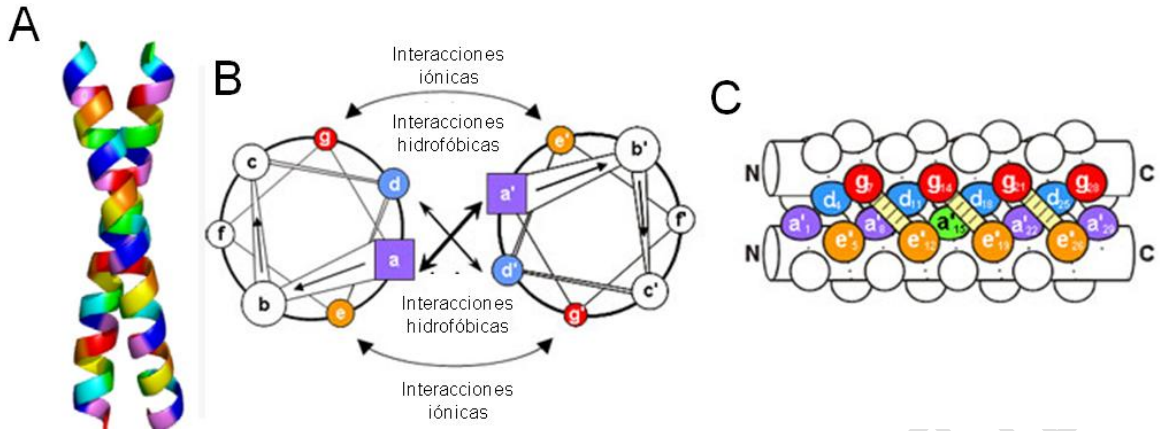


Figura 6. Esquema de una estructura dimérica tipo *coiled-coil*. A. Modelo de las hélices paralelas. B. Diagrama de las héptadas que forman las hélices. Los residuos en las posiciones "a" (morado) y "d" (azul) forman las interacciones hidrofóbicas; los residuos en la posición "e" (naranja) y "g" (rojo) forman interacciones electrostáticas. C. Vista lateral de las hélices. La interacción iónica entre el residuo "e" de una hélice y el residuo "g" de la otra hélice se representa por la barra amarilla (Mason & Arndt, 2004).

BIÓL. MARIANA ROMO

ANTECEDENTES

Para caracterizar a la proteína Orf15, ha sido necesario analizar los antecedentes que se tienen sobre las proteínas codificadas por los genes sinténicos antes mencionadas. A continuación se presenta una breve reseña de los estudios que se han realizado con las proteínas codificadas por los genes sinténicos a *orf15*, tanto en el sistema flagelar como en diferentes sistemas de virulencia.

▼ FliJ (Sistema flagelar)

Esta proteína de 17 kDa comparte características con algunas chaperonas y por medio de inmunorréplica de afinidad, se demostró que interactúa con sustratos de la clase eje-gancho, así como con sustratos de la clase filamento, por lo que se propuso que FliJ funciona como una chaperona general (Minamino et al., 2000). La secuencia de la región amino terminal de FliJ posee una alta probabilidad de formar α -hélices del tipo *coiled-coil*, lo que sugiere que puede participar en varias interacciones tanto consigo misma como con su(s) sustrato(s). Por otro lado, a través de cromatografía de exclusión molecular se propuso un modelo de oligomerización monómero-trímero para la proteína FliJ y aunque el estado oligomérico preferencial en el citoplasma es monomérico, se ha

visto que también es capaz de formar tetrámeros (Fraser *et al.*, 2003). A su vez, se demostró que los primeros 73 aminoácidos de la región N-terminal son indispensables para que esta proteína pueda desempeñar sus funciones, entre las que se encuentran la de permitir la exportación de proteínas flagelares y prevenir su agregación en el citoplasma bacteriano (Minamino *et al.*, 2000). Entre las interacciones reportadas para FliJ (Figura 7) están las encontradas con las proteínas FliI, ATPasa del sistema flagelar (Minamino *et al.*, 2000); FliH, regulador negativo de FliI (Minamino & Macnab, 2000a); FlhA y FlhB, proteínas integrales de membrana del aparato de exportación (Fraser *et al.*, 2003, Minamino & Macnab, 2000b); y FliM, un componente del anillo C (Gonzalez-Pedrajo *et al.*, 2006).

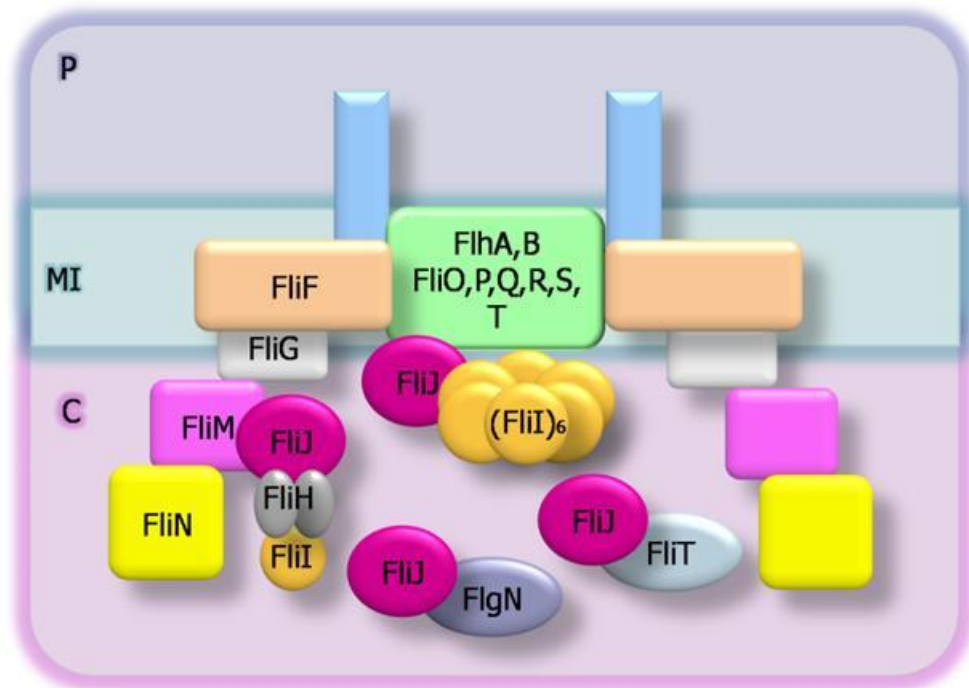


Figura 7. Representación espacial de las interacciones entre los componentes del cuerpo basal y el aparato de exportación con FliJ. P: periplasma, MI: membrana interna, C: citoplasma. (Figura Modificada de (Fraser *et al.*, 2003, Evans *et al.*, 2006)

Estudios más recientes con la proteína FliJ reportan que ésta no reconoce a los sustratos libres ni al complejo chaperona-sustrato, sino que es capaz de reclutar a algunas chaperonas entre las que se encuentran las chaperonas de las proteínas adaptadoras entre el gancho y el filamento conocidas como HAPS (FlgL y FlgK) y de la tapa del filamento también llamada *cap* (FliD) (Figura 2A), que son FlgN y FliT respectivamente (Figura 7). Sin embargo, no se detectó interacción con la chaperona de la subunidad principal del filamento (FliS, chaperona de la flagelina FliC), por lo que se propone que FliJ es una chaperona de chaperonas que participa en la regulación de la secreción de proteínas durante la biogénesis flagelar facilitando la exportación de las proteínas minoritarias FlgL y FlgK (Evans et al., 2006). Un dato interesante es que FliJ puede interactuar al mismo tiempo con las chaperonas FlgN y FliT ya que los sitios de interacción para cada una están localizados en diferentes regiones; mientras que FlgN interactúa con los residuos 21-50, FliT interactúa con los residuos 61-100. Al eliminar cualquiera de estos dominios, se evita la interacción con la respectiva chaperona y estas versiones truncas de FliJ no pueden complementar una mutante $\Delta fliJ$ (Evans et al., 2006).

▼ YscO (*Yersinia* spp)

YscO es una proteína de 18.9 kDa, que posee un punto isoeléctrico de 7.89, no tiene secuencia señal ni dominios hidrofóbicos y su secuencia predice una gran probabilidad de formar estructuras tipo *coiled-coil*.

YscO y las proteínas SpaM/InvI (*Salmonella*) y Spa13 (*Shigella*) comparten algunas características como son similitud de tamaño, carga, punto isoeléctrico y estructura secundaria, por lo que se cree pueden poseer funciones similares. Se ha reportado que YscO es necesaria para la secreción de las proteínas efectoras Yops (Figura 8). Aunque en este estudio no fue posible determinar si el efecto que tiene YscO sobre la secreción de las proteínas es directo o si participa alguna otra proteína del sistema, sí se pudo observar que YscO puede secretarse, característica que no se comparte con las proteínas Spa13 o InvI/SpaM (Payne & Straley, 1998).

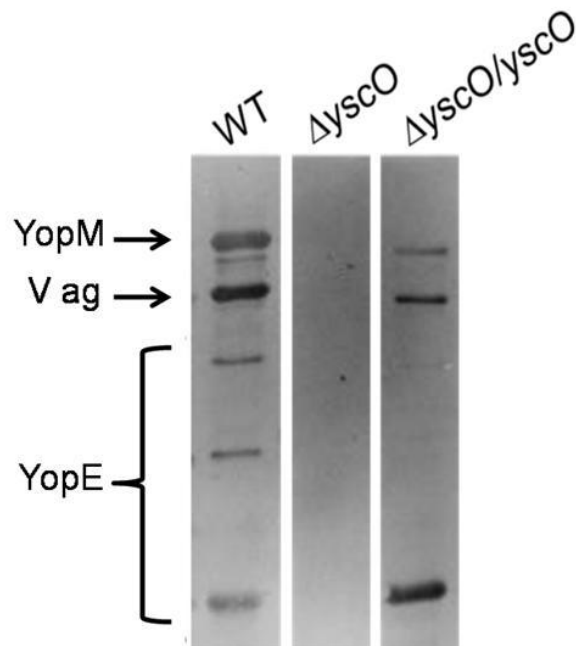


Figura 8. Perfil de secreción de la cepa Δyso en *Yersinia*. WT: cepa silvestre. Δyso : cepa mutante en *yso*. $\Delta yso/yso$: cepa mutante en *yso* complementada con el gen en trans (Payne & Straley, 1998).

Recientemente se propuso que YscO podría estar participando en la jerarquía de secreción al interactuar con YscU (componente del aparato de secreción) y reclutar a YscP (proteína que regula la longitud de la aguja y que participa en la regulación de la jerarquía de secreción) (Riordan & Schneewind, 2008).

➔ **Spa13 (*Shigella* spp)**

Esta proteína de ~13 kDa, al igual que las proteínas de este grupo es esencial para que se lleve a cabo la secreción de efectores (Figura 9). Una característica particular de esta proteína es que se produce gracias a un deslizamiento (*slippage*) de la RNA polimerasa que ocurre en la región sobrelapada de dos marcos de lectura denominados *spa13a* y *spa13b*. Este deslizamiento se da durante la transcripción y es debido a una serie de 10 adeninas o timinas que provocan que la RNA polimerasa incorpore o elimine hasta un par de nucleótidos en el RNA mensajero, cambiando el marco de lectura río abajo de donde se da este proceso. Una vez que se da el cambio en el marco de lectura, se produce la proteína funcional Spa13. Se cree que ésta es una forma de controlar la secreción a través de la cantidad de Spa13 funcional disponible; y se piensa que este proceso puede también regular la expresión de los genes río abajo (Penno *et al.*, 2006).

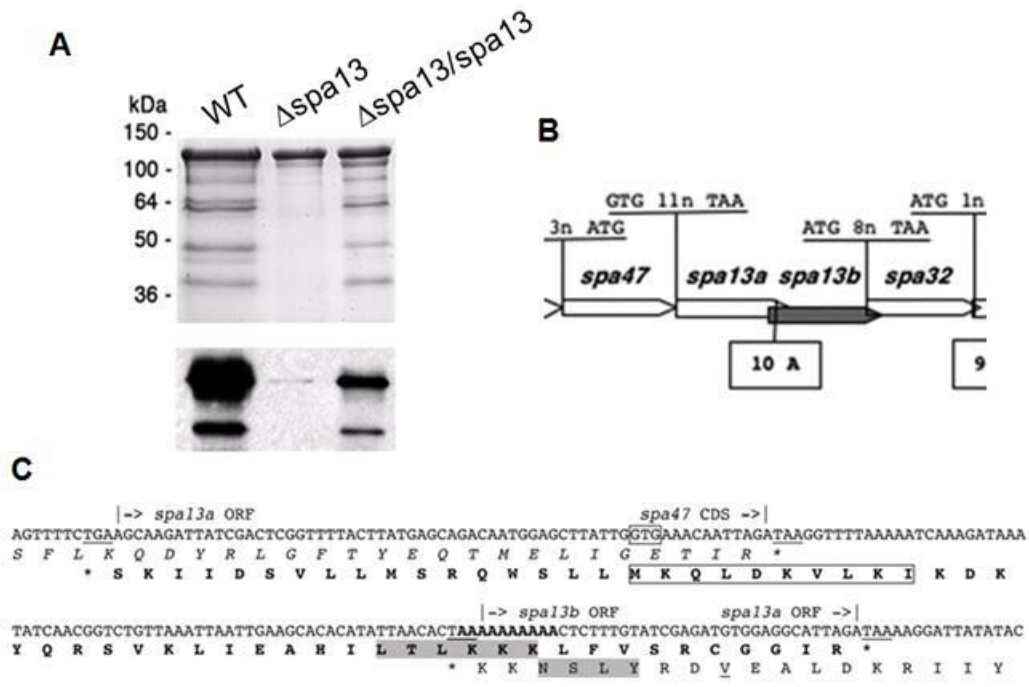


Figura 9. Fenotipo de la mutante $\Delta spa13$ y transcripción de *spa13*. A. Perfil de secreción de la cepa silvestre (WT), la mutante nula en *spa13* ($\Delta spa13$) y la mutante nula en *spa13* complementada en *trans* ($\Delta spa13/spa13$). B. Localización de los dos marcos de lectura que codifican a Spa13. 10 A: Sitio en donde se lleva a cabo el *slippage*. C. El esquema muestra la región 3' de *spa47*, *spa13a* y la región 5' de *spa13b*. La secuencia de aminoácidos codificada por *spa47* está en *itálicas* y la que está codificada por *spa13a* está en *negritas*. Los codones de paro de cada marco de lectura están subrayados (Penno et al., 2006).

➤ ***InvI/SpaM (Salmonella spp)***

Esta proteína de aproximadamente 18 kDa no se ha podido detectar en el sobrenadante como una proteína secretada y se ha propuesto que juega un papel importante en la formación de apéndices de internalización en *Salmonella Typhymurium*. No se han encontrado proteínas ortólogas en otros microorganismos, lo que sugiere que *InvI* pudiera ser un buen candidato con funciones efectoras específicas de *Salmonella* (Collazo et al., 1995).

➔ Orf15 (*Citrobacter* spp)

En *Citrobacter rodentium* se demostró que al eliminar el gen que codifica para Orf15 se afecta la secreción de proteínas, tanto de translocadores como de efectores (Figura 10). También se observó que no hay formación del pedestal y no hay infección en ratones; por lo que se determinó que esta proteína pertenece a los componentes que son esenciales para la secreción y la infección por el microorganismo (Deng et al., 2001)

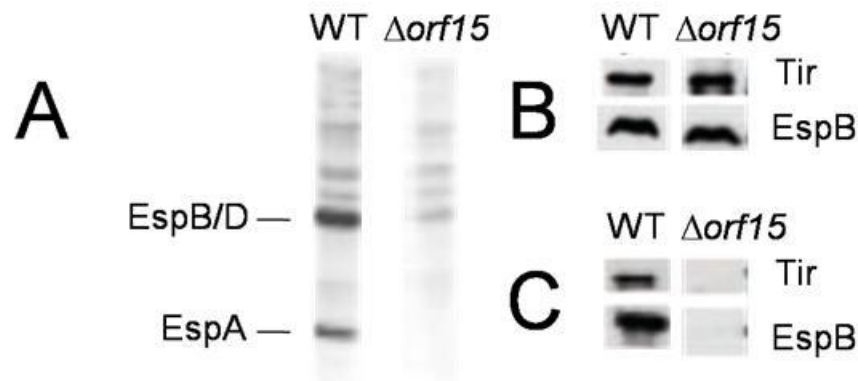


Figura 10. Producción y secreción de proteínas en la cepa $\Delta orf15$. A. Perfil de secreción de proteínas en SDS-PAGE de las cepas silvestre (WT) y mutante en el gen *orf15* ($\Delta orf15$). B. Immunodetección con anticuerpos específicos anti-Tir y anti-EspB de la producción de proteínas. C. Immunodetección de proteínas secretadas con anticuerpos específicos anti-Tir y anti-EspB (Deng et al., 2001).

➔ Cpn0706 (*Chlamydomophila* spp)

Cpn0706 tiene una masa molecular de 19.8 kDa y un pI de 9.7. Recientemente, por medio de ensayos de interacción utilizando el sistema del doble híbrido y por copurificación tipo *pull-down*, se encontró que, al igual que para FliJ, esta proteína interactúa con la ATPasa CdsN, en

particular con los últimos 38 aminoácidos (Figura 11). Debido a que la interacción de Cpn0706 con CdsN se pudo detectar solamente en condiciones de baja concentración de sal, se propone que ésta es débil y transitoria por lo que se propone que Cpn0706 pudiera ser en realidad una chaperona de la ATPasa. La proteína recombinante His-Cpn0706 se analizó en electroforesis nativa y por inmunodetección se comprobó que es capaz de formar dímeros, capacidad que comparte con algunas chaperonas del SST3 (Stone *et al.*, 2008).

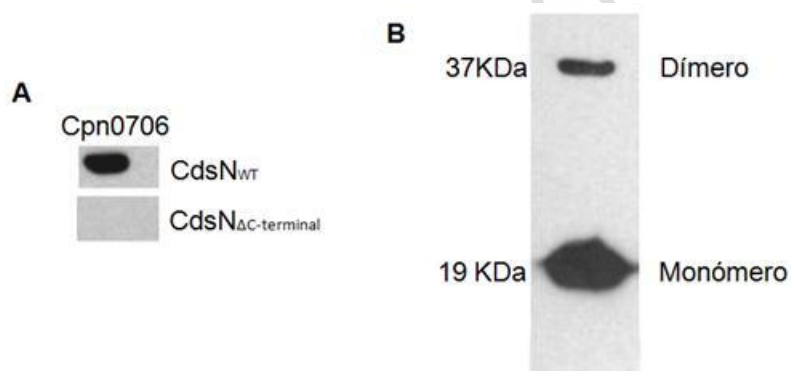


Figura 11. Interacción de Cpn0706 con la ATPasa y oligomerización. A. Inmunodetección de un *pull-down* de His-Cpn0706 con GST-CdsN silvestre (CdsN_{WT}) y His-Cpn0706 con GST-CdsN sin la región carboxilo terminal (CdsN_{ΔC-terminal}). B. Inmunodetección de His-Cpn0706 utilizando anticuerpos anti-His (Stone *et al.*, 2008).

▼ HrpO (*Pseudomonas syringae* pv *phaseolica*)

HrpO posee una masa molecular de 23 kDa. Recientemente se obtuvo el cristal de esta proteína y se realizó un análisis de su plegamiento por medio de dicroísmo circular, así como de su interacción con otras proteínas del SST3 utilizando el sistema de doble híbrido en levadura.

Entre los resultados más destacados está la capacidad de HrpO de formar poblaciones heterogéneas de oligómeros, desde monómeros hasta tetrameros, capacidad dependiente de la concentración de proteína. Al igual que lo observado con FliJ, HrpO interactúa con HrpE, el regulador negativo de la ATPasa (Gazi *et al.*, 2008).

BIÓL. MARIANA ROMO CASTILLO

OBJETIVO GENERAL

Realizar una caracterización parcial de la proteína Orf15, así como de su función en el proceso de secreción de efectores de virulencia en EPEC.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clonar el gen *orf15* amplificado por PCR en diferentes vectores.
2. Producir y purificar la proteína recombinante Orf15.
3. Producir antisuero contra Orf15.
4. Analizar el fenotipo de la sobreproducción de Orf15 en la cepa silvestre de EPEC.
5. Generar una mutante eliminando el gen *orf15*.
6. Analizar el fenotipo de la mutante $\Delta orf15$.
7. Analizar el efecto de la sobreproducción de la ATPasa EscN en la cepa mutante $\Delta orf15$.

MATERIAL Y MÉTODO

▼ Cepas utilizadas, plásmidos y construcciones.

Tabla 2. Cepas utilizadas

Cepa	Descripción	Referencia
Top10 <i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>φ80lacZΔM15 ΔlacX74</i> <i>deoR nupG recA1</i> <i>araD139 Δ(ara-leu) 7697</i> <i>galU galK rpsL(Stp^R)</i> <i>endA1 λ⁻</i>	Posee una eliminación parcial del gen <i>lacZ</i> ; lo que permite la α -complementación. Permite obtener transformaciones más eficientes. Reduce la probabilidad de que haya una recombinación no deseada del ADN. Posee una eliminación parcial del gen <i>lacZ</i> . Presenta resistencia a estreptomicina.	Invitrogen
XL1-Blue <i>endA1 gyrA96 (nal^R)</i> <i>thi-1 recA1 relA1 lac</i> <i>glnV44 F' [::Tn10</i> <i>proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)</i> <i>M15] hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺)</i>	Cepa derivada de <i>E. coli</i> K12. Mutante en la endonucleasa I. Reduce la probabilidad de que haya una recombinación no deseada del ADN. Posee una eliminación parcial del gen <i>lacZ</i> ; lo que permite la α -complementación. Permite obtener transformaciones más eficientes. Presenta resistencia a ácido nalidíxico.	Stratagene
BL21 (DE3) pLyss <i>E. coli B F₁ dcm</i> <i>ompT hsdS (r_B m_B⁻) gal</i> <i>λ(DE3) [pLyss Cam^r]</i>	Cepa derivada de <i>E. coli</i> B. Carece de las proteasas Lon y OmpT lo que ayuda a una mejor expresión de genes. Posee el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> . Es capaz de producir la lisozima T7 para reducir los niveles de expresión basal y posee resistencia a cloranfenicol.	Stratagene
JR501 <i>r_m⁺</i>	Cepa utilizada para convertir plásmidos a compatibilidad con <i>Salmonella</i>	(Ryu & Hartin, 1990)
SJW1368 <i>ΔcheW-flhD</i>	Cepa de <i>Salmonella</i> mutante en operón maestro. Cepa utilizada para producir proteínas codificadas en el vector pTrc99A.	(Ohnishi et al., 1994)
EPEC _{WT} <i>E2368/69- O127:H6</i>	Cepa prototipo de <i>E. coli</i> enteropatógena. Resistente a estreptomicina.	(Levine et al., 1977)
EPEC _{ΔescN}	Cepa mutante en el gen <i>escN</i> . Resistente a estreptomicina.	(Gauthier et al., 2003)

Tabla 3. Vectores utilizados

Nombre	Tamaño (pb)	Resistencia	Referencia
pGEM-T Easy	3015	Amp	PROMEGA
pET19b	5700	Amp	Novagen
pTrc99a	4176	Amp	Amersham
pTrc99a-FF4	4176	Amp	(Ohnishi <i>et al.</i> , 1997)
pTopo-2HA	5000	Amp	(Deng <i>et al.</i> , 2004)
pET23b	3600	Amp	Novagen
pKD46	6078	Amp	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD4	3267	Kan	(Datsenko & Wanner, 2000)
pACTrc		Cm	G.M. Fraser

Tabla 4. Construcciones

Nombre	Descripción	Referencia
pMMo15	pGEM-T Easy + <i>orf15</i> (NdeI-BamHI)	Este trabajo
pNEo15	pET19b + <i>orf15</i> (NdeI-BamHI). Subclonado de pMMo15.	Este trabajo
pMTo15	pTrc99a-FF4 + <i>orf15</i> (NdeI-BamHI). Subclonado de pMMo15.	Este trabajo
pMATo15	pACTrc + <i>orf15</i> (NdeI-BamHI). Subclonado de pMMo15.	Este trabajo
pMTHo15	pTrc99a + <i>his-orf15</i> subclonado de pNEo15 (PstI - BamHI)	Este trabajo
pMHo15	pTOPO-2HA + <i>orf15</i> (HindIII/XhoI). Posee el sitio de unión a ribosoma original de <i>orf15</i> .	Este trabajo
pME23o15	pET23b + <i>orf15</i> (HindIII / XhoI)	Este trabajo
pMMo15(1-60)	pGEM T-Easy + <i>orf15(1-60)</i> . Codifica la versión trunca de Orf15 del residuo 1 al 60 (NdeI/BamHI)	Este trabajo
pNEo15(1-60)	pET19b + <i>orf15(1-60)</i> . Codifica la versión trunca de Orf15 del residuo 1 al 60 (NdeI/BamHI) con una etiqueta de 10 histidinas en la región N-terminal.	Este trabajo
pNTo15(1-60)	pTrc99a_FF4 + <i>orf15(1-60)</i> . Codifica la versión trunca de Orf15 del residuo 1 al 60 (NdeI/BamHI)	Este trabajo
pMMo15(60-125)	pGEM T-Easy + <i>orf15(60-125)</i> . Codifica la versión trunca de Orf15 del residuo 60 al 125 (NdeI/BamHI)	Este trabajo
pMEo15(60-125)	pET19b + <i>orf15(60-125)</i> . Codifica la versión trunca de Orf15 del residuo 60 al 125 (NdeI/BamHI) con una etiqueta de 10 histidinas en la región N-terminal.	Este trabajo
pMTo15(60-125)	pTrc99a_FF4 + <i>orf15(60-125)</i> . Codifica la versión trunca de Orf15 del residuo 60 al 125 (NdeI/BamHI)	Este trabajo

pATcN	pTrc99a-FF4 + <i>escN</i>	(Andrade <i>et al.</i> , 2007)
pATHcN	pTrc99a + <i>his-escN</i>	(Andrade <i>et al.</i> , 2007)

➤ **Medios de cultivo y antibióticos.**

Se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) enriquecido con una solución de las vitaminas timina y tiamina.

Los ensayos de secreción de proteínas del SST3 se realizaron en medio DMEM en el cual se ha visto que se estimula la producción y secreción de proteínas del SST3 en EPEC a 37°C con CO₂ al 5% (Kenny *et al.*, 1997).

Los antibióticos utilizados fueron ampicilina 100 µg ml⁻¹, tetraciclina 50 µg ml⁻¹, estreptomycin 50 µg ml⁻¹ o kanamicina 10 µg ml⁻¹ según la cepa y el plásmido utilizado.

➤ **Generación de construcciones**

Se diseñaron cebadores (Tabla 5) a partir de las secuencias reportadas (Elliott *et al.*, 1998) para poder amplificar por PCR los genes de interés a partir de ADN cromosomal de la cepa silvestre de EPEC E2348/69 stp^R. Los productos purificados por Wizard (PROMEGA) se clonaron en pGEM-T Easy. Las construcciones obtenidas se transformaron en células XL1-blue y

después de obtener el DNA plasmídico se secuenciaron para corroborar que no había mutaciones. A partir de estas construcciones se subclonaron los genes de interés en los diferentes vectores de expresión que se utilizaron: pET19b, pET23b, pTrc99A, pTrc99A_FF4, pACTrc (Figura 12).

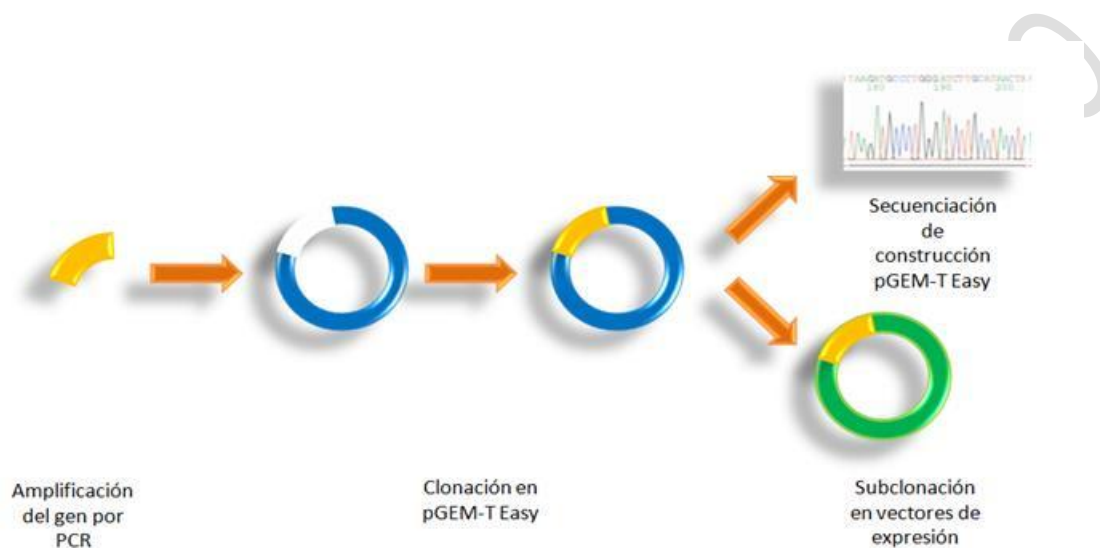


Figura 12. Estrategia experimental para la elaboración de construcciones en plásmidos de expresión.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación de orf15.

Nombre del cebador	Secuencia	Sitio de restricción	%GC	T _m
Orf15_NdeF	5` ttgectgcatatggttgacag 3`	NdeI	47.6	52 °C
Orf15_BamHIR	5` agaggatccctagtcaaagta 3`	BamHI	42.8	50 °C
Orf15_60Rv	5` aatttgcatatgtgtcgttg 3`	NdeI	38.1	49°C
Orf15_60Fw	5` ttatggatcctcactttatcc 3`	BamHI	38.1	49°C
Orf15HindIII_Fwd	5` agcaccaaagctttcagtagttac 3`	HindIII	41.7	54°C
Orf15Xho_Rvs	5` agagaactcgaggtcaaagtaatg 3`	XhoI	41.6	54°C

➔ Producción, purificación y cuantificación de proteínas recombinantes

Se utilizó el sistema de expresión pET, el cual permite la sobreproducción de proteínas recombinantes mediante la clonación del gen de interés en el vector pET19b. En este sistema la expresión del gen clonado se encuentra bajo el control del promotor del fago T7.

Para inducir este promotor se transformó la construcción en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (BDP), la cual lleva insertado en el cromosoma una copia del gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5* inducible por IPTG. Al añadir IPTG al cultivo se transcribe el gen de la RNA polimerasa de T7, la cual reconoce el promotor del plásmido pET19b y se inicia la expresión del gen de interés. Otra característica de este sistema es que inserta una secuencia de 10 histidinas (10xHis) en la región N-terminal de la proteína producida, por lo que es posible purificarla mediante cromatografía de afinidad con una resina acoplada a níquel Ni-NTA (QIAGEN).

Células BDP transformadas con la construcción pNEo15 (pET19b+orf15) se crecieron a 37°C en LB con 100 µg ml⁻¹ toda la noche. 3 ml del cultivo se inocularon en 300 ml de medio LB + ampicilina y se crecieron a 37°C hasta obtener una DO₆₀₀ =1.0. Se agregó IPTG a una concentración final de 0.5 mM y se continuó creciendo durante 5 horas a 20°C. Se tomó una muestra cada hora para comprobar la producción de la proteína por medio de SDS-PAGE. El cultivo se centrifugó a 26000 xg durante 25 minutos y la pastilla se

congeló hasta su uso. La pastilla se resuspendió con 30 ml de Amortiguador A (Tris 20mM, NaCl 150mM) con lisozima 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y PMSF 100 mM. Las células se sonicaron y centrifugaron a 27000 xg durante 30 minutos a 4°C. La fracción soluble se incubó con 2 ml de resina Ni-NTA. Se pasó la muestra por una columna para compactar la resina y obtener la fracción no unida. Se hicieron lavados con 30 ml de amortiguador A con imidazol 30 mM, 40 ml de amortiguador A con imidazol 60 mM y 20 ml de amortiguador A con imidazol 80 mM. Se realizaron 3 eluciones con 2 ml de amortiguador A con 400 mM de imidazol, colectando cada muestra por separado. Se analizaron las muestras en SDS-PAGE 15% y se tiñeron los geles con Azul de Coomassie.

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por medio del método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). El método determina la concentración de proteína soluble a través de la interacción proteína-colorante. Se mide la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Los valores obtenidos son comparados con una curva estándar dando valores relativos de la concentración de proteínas totales en la muestra. Las reacciones se realizaron en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml, con un volumen de reacción de 1000 μl (980 μl de reactivo Bradford diluido 1:4 en agua y 20 μl de la proteína), usando concentraciones conocidas de la proteína BSA como patrón estándar.

➤ Producción de anticuerpos policlonales

Se utilizó un conejo hembra de raza Nueva Zelanda. Se inmunizó 3 veces por vía subcutánea (SC) y 1 vez por vía intravenosa (IV) a intervalos de 21 días (Figura 13) con 120 µg de proteína, utilizando como vehículo adyuvante completo e incompleto de Freund en el caso de vía SC. A los 14 días de cada inmunización se tomó una muestra del suero para analizar la especificidad de los anticuerpos. En el día 83 se sangró el conejo a blanco con punción directa al corazón para obtener la mayor cantidad de suero. El título de anticuerpos y la especificidad se comprobó por inmunodetección tipo Western Blot.

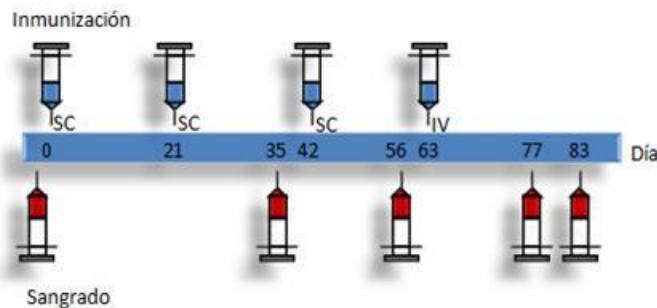


Figura 13. Esquema de inmunización. Las jeringas azules representan los días de inmunización y las rojas representan los días de sangrado. SC: Vía subcutánea IV: Vía intravenosa.

➤ Inmunodetección de proteínas tipo Western blot.

Una vez realizada la separación de las proteínas por electroforesis, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.22 µm (Biorad). La transferencia se realizó a 70 volts constantes por 95 min

utilizando un amortiguador de transferencia (Tris 20 mM, Glicina 150 mM, Metanol 20%). Posteriormente las membranas se lavaron y bloquearon con amortiguador Tween-TBS-leche 5% (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, Tween 20 0.1%, NaCl 150 mM, leche en polvo descremada 5%) por un periodo mínimo de 1 hora a 4 °C con agitación constante. Luego de 3 lavados con Tween-TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%), por 10 minutos se incubaron 1 hora a 4 °C con agitación constante con el anticuerpo de interés. Las membranas se lavaron con Tween-TBS durante 30 minutos, para luego incubarse con el segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa (GAR, RAG o GAM según el caso) diluido en Tween-TBS. Luego de 3 lavados con Tween-TBS por 30 minutos, se utilizó el estuche ECL-Western Blot (Amersham) para la quimioluminiscencia.

➤ **Ensayo de secreción de proteínas *in vitro***

Estudios previos han demostrado que crecer la cepa de EPEC en medio DMEM en ausencia de célula hospedera, promueve la expresión y secreción de los componentes del SST3. Siguiendo el protocolo propuesto (Kenny et al., 1997), se creció un cultivo en LB con los antibióticos correspondientes toda la noche a 37°C. Se inocularon 60 µl del cultivo en 6 ml de medio DMEM pre-equilibrado a 37°C en 0.5% de CO₂ y se incubó hasta obtener una DO₆₀₀=1.0 en las condiciones en que se pre-equilibró el medio DMEM. Los cultivos se centrifugaron a 16000 xg durante 2 minutos y los sobrenadantes se incubaron con TCA 10% toda la noche a 4°C para precipitar las proteínas secretadas. Las muestras se centrifugaron a

20000 xg durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante utilizando vacío para eliminar todo el TCA. Las pastillas se resuspendieron en amortiguador de corrida SDS + Tris saturado 10%. Las muestras se analizaron en SDS-PAGE 15%.

➤ **Generación de una mutante nula en el gen *orf15*.**

Por medio de recombinación homóloga utilizando la recombinasa Red del fago λ (Datsenko & Wanner, 2000) se produjo una mutante nula de EPEC en el gen *orf15* insertando un casete de resistencia a kanamicina. Con esta metodología es posible reemplazar una secuencia cromosómica por un gen de resistencia a antibiótico, generado por PCR, utilizando oligonucleótidos con extensiones homólogas correspondientes al gen que se quiere eliminar. Estas extensiones permiten la recombinación mediante la recombinasa Red en las regiones flanqueantes al gen.

El casete de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4 se amplificó utilizando cebadores que en su extremo 5' contenían secuencias homólogas (50 nucleótidos) al gen *orf15*, más la secuencia correspondiente a P1 y P2 del plásmido PKD4 (Tabla 6). De esta forma, al amplificar el casete del plásmido pKD4, se genera un fragmento de PCR que contiene la resistencia al antibiótico flanqueada por los sitios FRT, las secuencias P1 y P2, más las secuencias homólogas al gen que se quiere eliminar. Después de la amplificación el fragmento se purificó utilizando el Kit Wizard (Promega) y posteriormente se digirió con la enzima *DpnI* para eliminar el ADN molde

utilizado en la PCR, ya que este enzima digiere selectivamente el ADN metilado. El producto se repurificó utilizando el mismo Kit.

El plásmido pKD46 codifica para la recombinasa Red del fago λ bajo el control de un promotor inducible por L-arabinosa y al tener un origen de replicación termosensible se cura fácilmente a 43°C. La recombinasa Red, además de favorecer la recombinación inhibe a la exonucleasa V, permitiendo así la entrada a la célula de un fragmento de PCR sin que este sea digerido.

Células de EPEC_{WT} transformadas con el plásmido pKD46 se crecieron en 5 ml de medio SOB con ampicilina y 1 mM de L-arabinosa a 30°C hasta obtener una DO₆₀₀=0.6 y se prepararon células electrocompetentes haciendo 3 lavados con 1 volumen de glicerol frío al 10 % y concentrando en 1/100 de volumen. Los productos de PCR se purificaron y electroporaron en 25 μ l de células. Después del choque se agregó 1 ml de medio SOC y se incubaron por 3 horas a 37°C. Se plaquearon 0.5ml en LB + Kan. El resto de las células se mantuvieron toda la noche a temperatura ambiente y se plaquearon en LB + Kan. Después de la selección primaria con kanamicina, las mutantes se mantuvieron en medio sin antibiótico a 43°C y se volvió a comprobar la resistencia a kanamicina y sensibilidad a la ampicilina. La inserción del casete en el lugar de interés se analizó por PCR utilizando cebadores internos (KT y K2); (Datsenko & Wanner, 2000) y externos (Orf15_NdeF, Orf15_BamHIR) al mismo.

Tabla 6. Cebadores diseñados para la generación de la mutante Δ orf15

Nombre del cebador	Secuencia			Tm (°C)	%GC
Δorf15_fwd2	5' atgttggaca agcagagcga gagctgcttc 3'	gaattttatc accgattgag	tattcgtaaa gtgtaggctg	68	44.29
Δorf15_rvs2	5' agtaatgttc tttctactga ctccttagtt 3'	ctttatggca tttattaaca	aaagataatt tatgaatatc	61	25.71

BIÓL. MARIANA ROMO CASTILLO

RESULTADOS

- **Orf15 comparte las mismas características que las proteínas codificadas por los genes sinténicos.**

Por medio del análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la proteína Orf15, se pudo determinar que tiene una masa molecular de 14.56 kDa, un punto isoeléctrico básico de 9.6, no posee secuencia señal para secretarse a través del sistema Sec y no tiene dominios transmembranales. Su estructura secundaria se predice preferentemente alfa-helicoidal (Figura 14A) y con tendencia a formar estructuras tipo coiled-coil al igual que las proteínas similares a FliJ (Figura 14B).

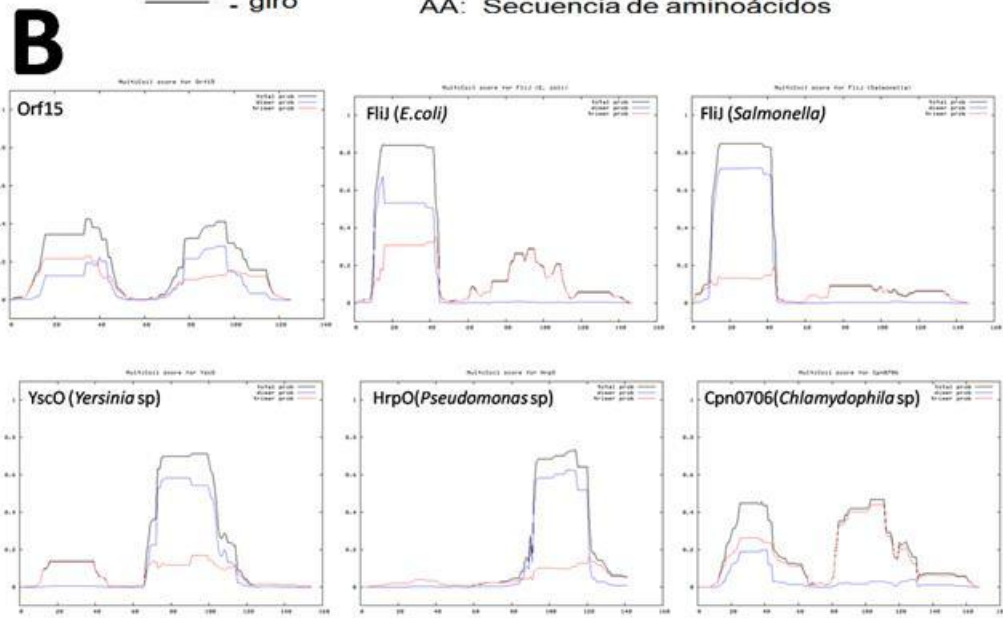
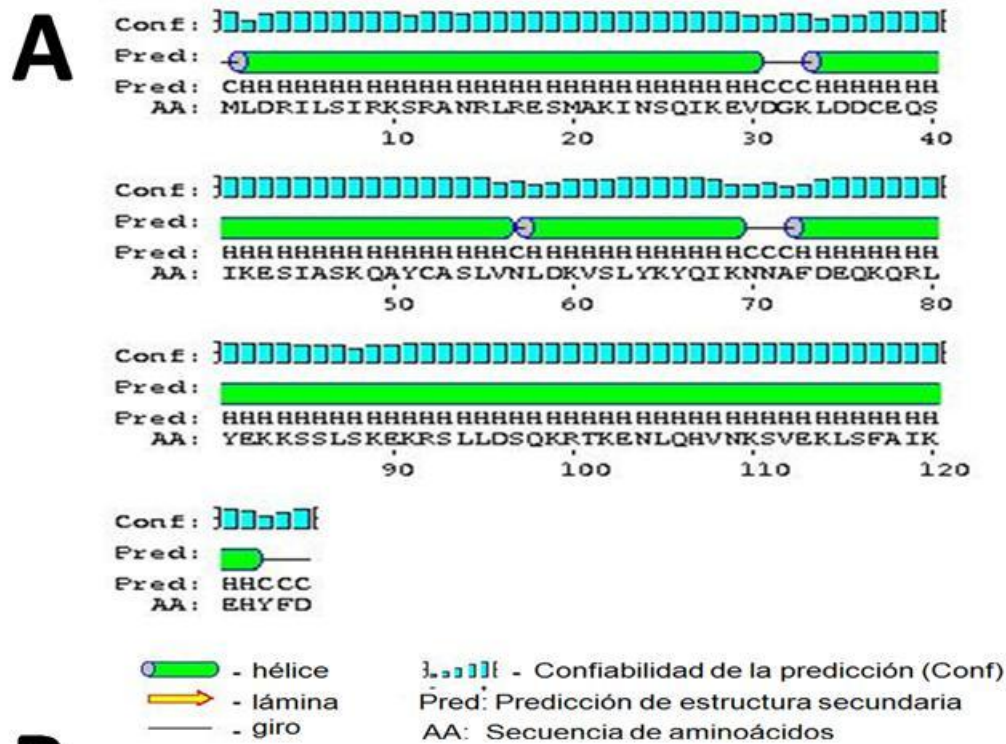


Figura 14. Predicción de la estructura secundaria de Orf15. A. Predicción de la estructura secundaria de Orf15 (PSI-Pred). B. Análisis de secuencia realizado con el programa Multicoil (Wolf et al., 1997) Rojo: probabilidad para trímero. Azul: probabilidad para dímero. Negro: Probabilidad total.

Se realizó un alineamiento de la proteína Orf15 con las proteínas codificadas por genes sintéticos, encontrando una mayor similitud (34%) con la proteína YscO (*Yersinia*) como se muestra en la Figura 15A. En la base de datos Pfam, se identificó un grupo de proteínas que forman la familia YscO, por lo que se decidió hacer un alineamiento de Orf15 con algunas de éstas. Se observó que Orf15 tiene numerosos residuos conservados con los miembros de esta familia e incluso se identificaron 7 residuos idénticos, los cuales podrían ser importantes para la función de este grupo de proteínas (Figura 15B).

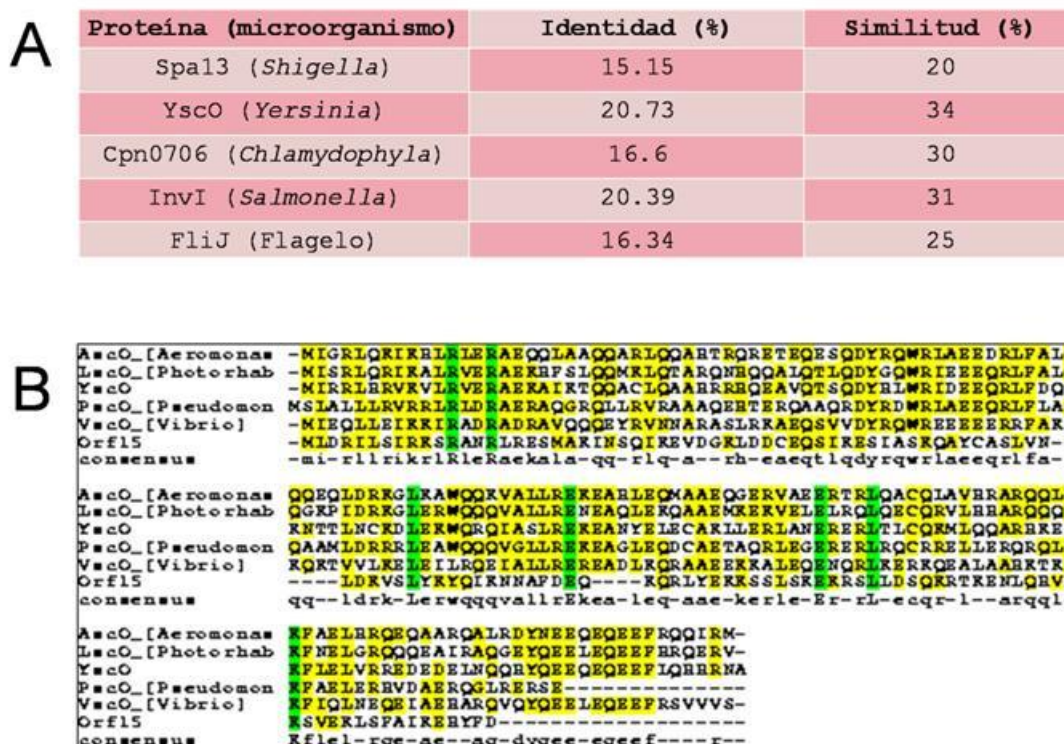


Figura 15. Similitud de Orf15 con las proteínas codificadas por genes sintéticos. A. Porcentaje de identidad y similitud de Orf15 con las proteínas codificadas por genes sintéticos obtenidos utilizando el programa CLC Biology Workbench. B. Alineamiento de Orf15 con algunas de las proteínas de la familia YscO utilizando el programa SDSC Biology Workbench. Amarillo: Residuos similares y conservados. Verde. Residuos idénticos.

▼ **Construcciones con el gen *orf15* silvestre y versiones truncas.**

Basados en la predicción de estructuras tipo *coiled-coil* (Figura 14B) se generaron dos versiones truncas de la proteína, las cuales contenían cada uno de estos dominios y se denominaron Orf15₍₁₋₆₀₎ y Orf15₍₆₀₋₁₂₅₎ dependiendo de los aminoácidos que codifican. Utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla 5, se amplificaron por PCR las diferentes versiones de *orf15* (WT, 1-60 y 60-125), como se muestra en la Figura 16A.

Para la versión silvestre del gen *orf15* se esperaba un producto de 378 pb. La versión *orf15*₍₁₋₆₀₎ que codifica para los residuos 1-60 de la proteína, tiene un tamaño de 180 pb y la versión *orf15*₍₆₀₋₁₂₅₎ que codifica para los residuos 60-125 de la proteína tiene un tamaño de 196 pb. Los productos correspondientes al tamaño esperado se purificaron del gel de agarosa utilizando el estuche comercial *QIAquick gel extraction* (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Posteriormente, las muestras se analizaron por electroforesis en agarosa al 1% (Figura 16B).

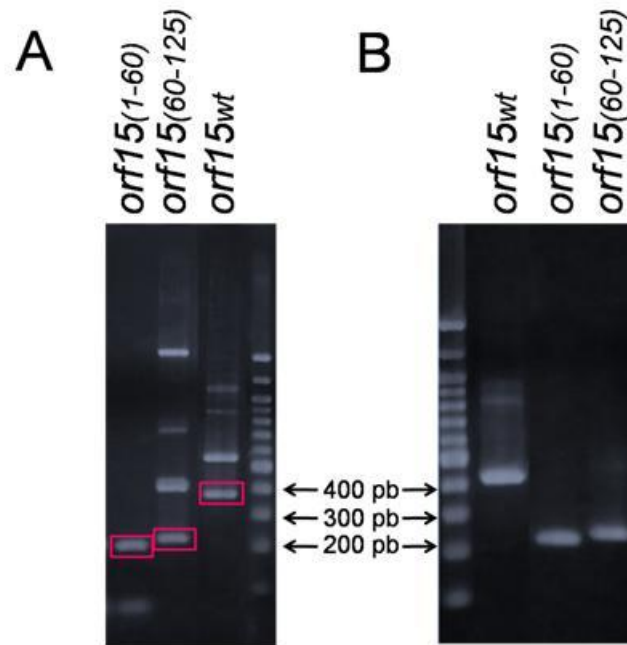


Figura 16. Amplificación por PCR del gen *orf15* y las versiones trunca *orf15* (1-60), *orf15* (60-125). A. Productos obtenidos de la reacción de PCR. Para el gen silvestre *orf15* (wt) se esperaba un producto de 378 pb, para la versión trunca 1-60 se esperaba un producto de 180 pb y para la versión trunca 60-125 se esperaba un producto de 196 pb. Los productos correspondientes al tamaño esperado están enmarcados en un rectángulo rosa. B. Productos de la reacción de PCR purificados a partir del gel de agarosa (*QIAquick gel extraction, QIAGEN*). Electroforesis en agarosa al 1% en TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio.

Los productos del PCR purificados, se clonaron en el vector pGEM T-Easy (PROMEGA) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La inserción del producto de PCR se corroboró por medio de un análisis de restricción con la enzima *EcoRI* (Figura 17). Las construcciones obtenidas se secuenciaron (Figura 18) para corroborar que no hubiera mutaciones, ya que éstas servirían de base para subclonar en diferentes vectores de expresión. Las construcciones obtenidas se nombraron pMGo15, pMGo15(1-60) y pMGo15(60-125) según la región de Orf15 que codifican.

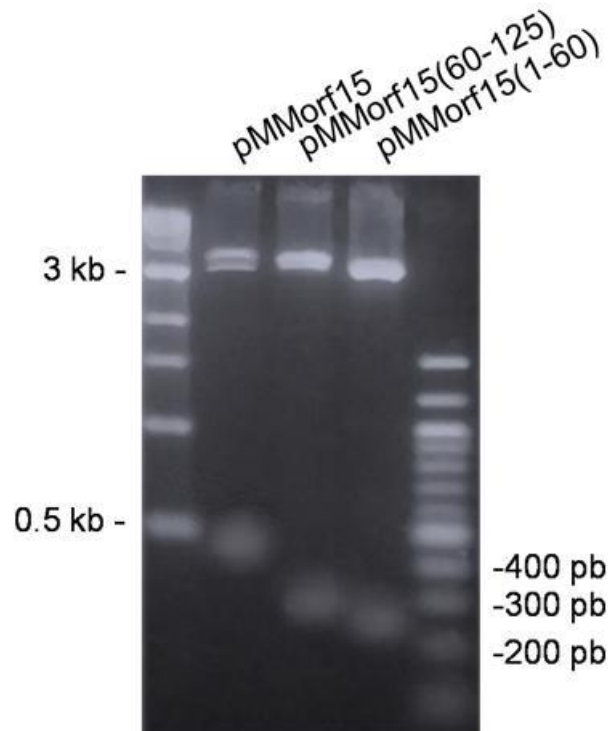


Figura 17. Análisis de restricción de las construcciones obtenidas de pGEM T-Easy y las diferentes versiones de *orf15* con la enzima *EcoRI*. pMorf15: pGEM T-Easy + *orf15wt*, pMorf15(1-60): pGEM T-Easy + *orf151-60*, pMorf15(60-125): pGEM T-Easy + *orf1560-125*. El tamaño del vector pGEM T-Easy es de 3015pb. Los insertos *orf15wt*, *orf15(1-60)* y *orf15(60-125)* liberados del vector con la enzima *EcoRI* tienen un tamaño aproximado de 420pb, 210pb y 230pb respectivamente. Electroforesis en agarosa al 1% con TAE 1X, teñido con bromuro de etidio.

Una vez que se obtuvieron estas construcciones, las diferentes versiones de *orf15* se subclonaron en los vectores de expresión pET19b y pTrc99A_FF4 (Figura 19). La comprobación de la introducción de insertos en los vectores de expresión se realizó por medio de PCR de la colonia, utilizando los cebadores con los que se amplificaron los diferentes productos.

pMGorf15

```

pMGorf15 CCGGCCGCCA TGGCGGCCGC GGGAAATCGA TTTTGCCTGC ATATGTTGGA
orf15_sequ -----
----- --ATGTTGGA

pMGorf15 CAGAATTTTA TCTATTCGTA AAAGCAGAGC GAACCGATTG AGAGAATCAA
orf15_sequ CAGAATTTTA TCTATTCGTA AAAGCAGAGC GAACCGATTG AGAGAATCAA

pMGorf15 TGGCTAAGAT TAACTCTCAG ATAAAAGAGG TGGATGGTAA ACTCGATGAC
orf15_sequ TGGCTAAGAT TAACTCTCAG ATAAAAGAGG TGGATGGTAA ACTCGATGAC

pMGorf15 TGGGAGCAAT CCATTAAGA GTCGATTGCC TCTAAGCAGG CGTATTGTGC
orf15_sequ TGGGAGCAAT CCATTAAGA GTCGATTGCC TCTAAGCAGG CGTATTGTGC

pMGorf15 ATCGCTGGTG AATTTGGATA AAGTGTGCTT GTATAAATAT CAGATTAATA
orf15_sequ ATCGCTGGTG AATTTGGATA AAGTGTGCTT GTATAAATAT CAGATTAATA

pMGorf15 ACAATGCATT TGATGAGCAA AAGCAGCGAT TGTATGAGAA AAAATCTTCA
orf15_sequ ACAATGCATT TGATGAGCAA AAGCAGCGAT TGTATGAGAA AAAATCTTCA

pMGorf15 CTTTCGAAGG AAAAGCGTTC ATTGCTAGAT TCACAAAAAC GAACAAAAGA
orf15_sequ CTTTCGAAGG AAAAGCGTTC ATTGCTAGAT TCACAAAAAC GAACAAAAGA

pMGorf15 GAATCTGCAG CATGTTAATA AATCAGTAGA AAAATTATCT TTTGCCATAA
orf15_sequ GAATCTGCAG CATGTTAATA AATCAGTAGA AAAATTATCT TTTGCCATAA

pMGorf15 AGGAACATTA CTTTGACTAG GGATCCTCTA ATCACTAGTG AATTGCGGGC
orf15_sequ AGGAACATTA CTTTGACTAG -----
-----

```

pMGorf15
(1-60)

```

pMGorf15(1-6 70 80 90 100 110 120
TGGCGGCCGCCGGAATTCGATTTGCTGCATATGTTGGACAGAAATTTATCTATTCGTA
Orf15 -----ATGTTGGACAGAAATTTATCTATTCGTA
10 20

pMGorf15(1-6 130 140 150 160 170 180
AAAGCAGAGCGAACCGATTGAGAGAAATCAATGGCTAAGATTAACCTTCAGATAAAAGAGG
Orf15 -----AAAGCAGAGCGAACCGATTGAGAGAAATCAATGGCTAAGATTAACCTTCAGATAAAAGAGG
30 40 50 60 70 80

pMGorf15(1-6 190 200 210 220 230 240
TGGATGGTAAACTCGATGACTGCGAGCAATCCATAAAGAGTCGATTGCCCTAAGCAGG
Orf15 -----TGGATGGTAAACTCGATGACTGCGAGCAATCCATAAAGAGTCGATTGCCCTAAGCAGG
90 100 110 120 130 140

pMGorf15(1-6 250 260 270 280 290 300
CGTATTGTGCATCGCTGGTGAATTTGGATAAAGTGAAGATCCATAAATATCACTAGTGA
Orf15 -----CGTATTGTGCATCGCTGGTGAATTTGGATAAAGTGAAGATCCATAAATATCACTAGTGA
180 160 170 180 190

```

pMGorf15
(60-125)

```

pMGorf15(60- 70 80 90
-----GCCG---GCC---GCGGAAT-----TCGATT-TGAATTTGGCA
Orf15 -----ATTAAGAGTCGATTGCCCTAAGCAGCGCTATTGTGCATCGCTGGTGAATTTGGATAAA
130 140 150 160 170 180

pMGorf15(60- 100 110 120 130 140 150
GTGCTGTTGATAAATATCAGATTA AAAACAATGCATTGATGAGCAAAGCAGCGATTG
Orf15 -----GTGCTGTTGATAAATATCAGATTA AAAACAATGCATTGATGAGCAAAGCAGCGATTG
190 200 210 220 230 240

pMGorf15(60- 160 170 180 190 200 210
TATGAGAAAAATCTTCACTTTGGAAGGAAAAGCGTTCATTGCTAGATTACAAAAACGA
Orf15 -----TATGAGAAAAATCTTCACTTTGGAAGGAAAAGCGTTCATTGCTAGATTACAAAAACGA
250 260 270 280 290 300

pMGorf15(60- 220 230 240 250 260 270
ACAAAAGAGAAATCTGCAACATGTTAATAAATCASTAGAAAAATATCTTTGGCATAAAG
Orf15 -----ACAAAAGAGAAATCTGCAACATGTTAATAAATCASTAGAAAAATATCTTTGGCATAAAG
310 320 330 340 350 360

pMGorf15(60- 280 290 300 310 320 330
GAACATTACTTTGACTAGGGATCCTCTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCGCTCAGGTC
Orf15 -----GAACATTACTTTGACTAG-----
370

```

Figura 18. Alineamiento de las secuencias de las construcciones obtenidas en pGEM T-Easy con la secuencia reportada del gen *orf15*. pMGorf15: pGEM T-Easy con la versión completa de *orf15*. PMGorf15 (1-60): pGEM T-Easy con la versión que codifica los residuos 1-60 de Orf15. PMGorf15 (60-125): pGEM T-Easy con la versión que codifica los residuos 60-125 de Orf15. En cuadro rosa se presenta los codones modificados para poder generar las diferentes versiones. Alineamientos realizados en Biology WorkBench.

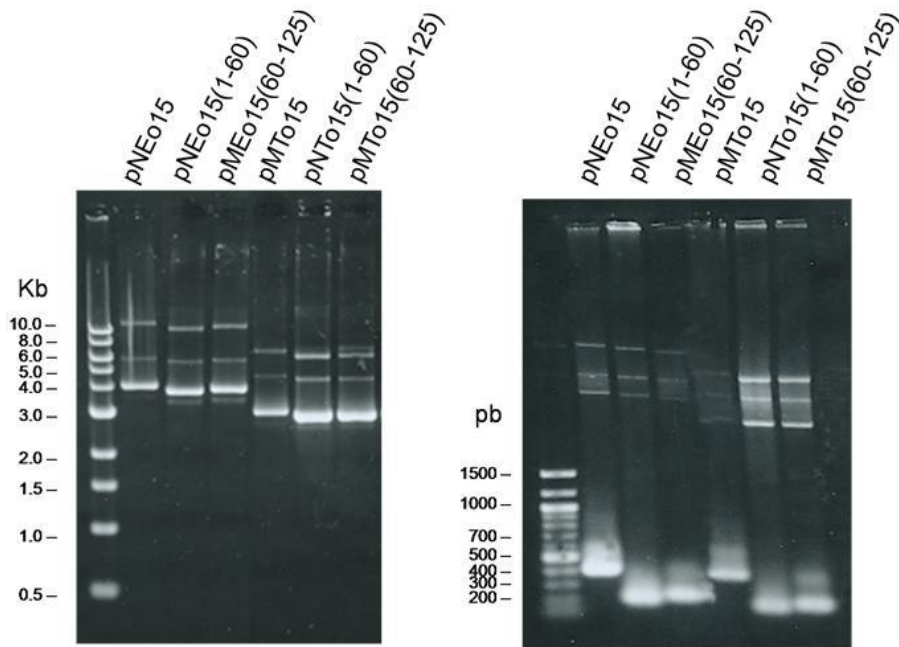


Figura 19. Construcciones de las versiones de *orf15* en los vectores de expresión pET19b y pTrc99A_FF4. A. Plásmido de las construcciones. Electroforesis en agarosa 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. B. PCR de colonia para comprobar presencia de insertos. pNEo15: pET19b/*orf15*, pNEo15 (1-60): pET19b/*orf15* (1-60), pMEo15 (60-125): pET19b/*orf15* (60-125), pMTo15: pTrc99A_FF4/*orf15*, pNTo15 (1-60): pTrc99A_FF4/*orf15* (1-60), pMTo15 (60-125): pTrc99A_FF4/*orf15* (60-125). Electroforesis en agarosa 1.2% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio.

► Producción de la proteína recombinante His-Orf15.

La construcción de *orf15* en pET19b (pNEo15) se transformó en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS (BDP). A partir de un cultivo de 300 ml, la producción de proteínas se indujo utilizando 0.5 mM de IPTG a 20°C durante 5 horas. Cada hora se tomó una muestra del cultivo para obtener el perfil de inducción (Figura 20A). Para corroborar que la proteína producida fuera la de nuestro interés, se realizó una inmunodetección tipo Western Blot (Figura 20B) utilizando anticuerpos específicos contra

la etiqueta de 10 histidinas que se produce al sobreexpresar en este vector (anti-His).

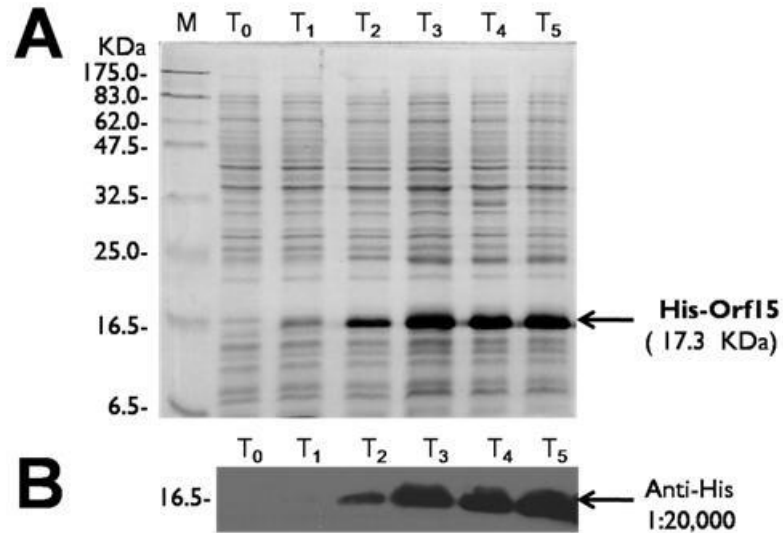


Figura 20. Producción de la proteína His-Orf15. A. Perfil de producción de la proteína His-Orf15 cada hora (T₁-T₅). T₀ corresponde a la muestra del cultivo antes de agregar IPTG. SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. B. Inmunodetección tipo Western Blot para corroborar la producción de la proteína utilizando anticuerpos anti-His.

➤ Purificación de la proteína His-Orf15 en condiciones nativas.

Se estandarizó la purificación de la proteína recombinante His-Orf15 en condiciones nativas por medio de cromatografía de afinidad con una resina acoplada a níquel (Ni-NTA, QIAGEN). La producción de proteína se realizó a partir de un cultivo de 200 ml de LB crecido hasta obtener una DO₆₀₀ de 1.0 e inducido con 0.5 mM de IPTG durante 5 horas a 20°C. Las células se centrifugaron 30 minutos a 6000 x g. Se eliminó el sobrenadante y las células se congelaron.

Para purificar la proteína, las células resuspendidas en amortiguador PBS, se lisaron por sonicación, se centrifugaron y el sobrenadante se incubó con la resina Ni-NTA, como se mencionó en la metodología; se realizaron lavados con concentraciones crecientes de imidazol (30, 60 y 80 mM) y se hicieron eluciones con 500 mM de imidazol. En cada paso del protocolo se obtuvo una muestra y se analizó por medio de SDS-PAGE 15% para analizar la pureza de la proteína obtenida (Figura 21).

La proteína obtenida se dializó en PBS y posteriormente se cuantificó utilizando el método de Bradford obteniendo un rendimiento de 850 μ g de proteína a partir de los 200 ml de cultivo.

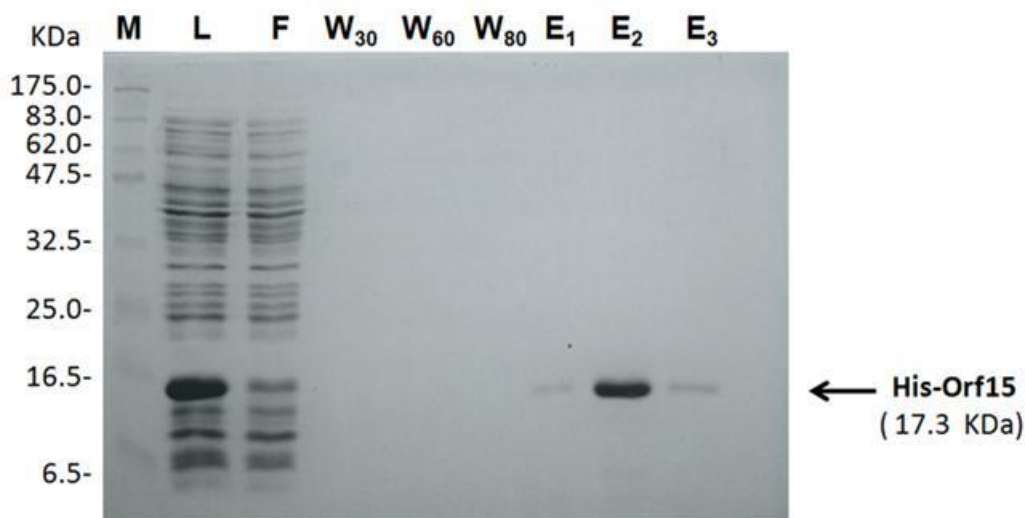


Figura 21. Purificación de His-Orf15. L: lisado incubado con la resina Ni-NTA. F: fracción no unida a la resina. W₃₀: Lavado con Imidazol 30 mM. W₆₀: Lavado con Imidazol 60 mM. W₈₀: Lavado con Imidazol 80 mM. E₁₋₃: Eluciones hechas con Imidazol 500 mM. SDS-PAGE 15% teñido con Azul de Coomassie.

La cantidad y pureza de la proteína purificada fue suficiente para producir anticuerpos policlonales en conejo, así como para poder realizar posteriormente ensayos de interacción con otras proteínas del sistema.

▼ **Obtención de anticuerpos anti-Orf15.**

Se siguió el protocolo de inmunización descrito en la metodología y la especificidad de los anticuerpos se comprobó por inmunodetección tipo Western Blot utilizando la fracción soluble de un lisado de inducciones de las proteínas Orf15_{wt}, Orf15₍₁₋₆₀₎ y Orf15₍₆₀₋₁₂₅₎ sin etiqueta, en células de *Salmonella* SJW1368 (Figura 22B). Adicionalmente, se analizó la especificidad de los anticuerpos utilizando la fracción soluble de lisados de diferentes cepas de EPEC (wt, Δ escN, Δ orf15 y Δ ler), utilizando como control positivo una inducción de pMT015 en células SJW1368 (Figura 22B). Como se puede observar, el suero es capaz de reconocer tanto a la proteína Orf15 silvestre como a las versiones truncas de Orf15.

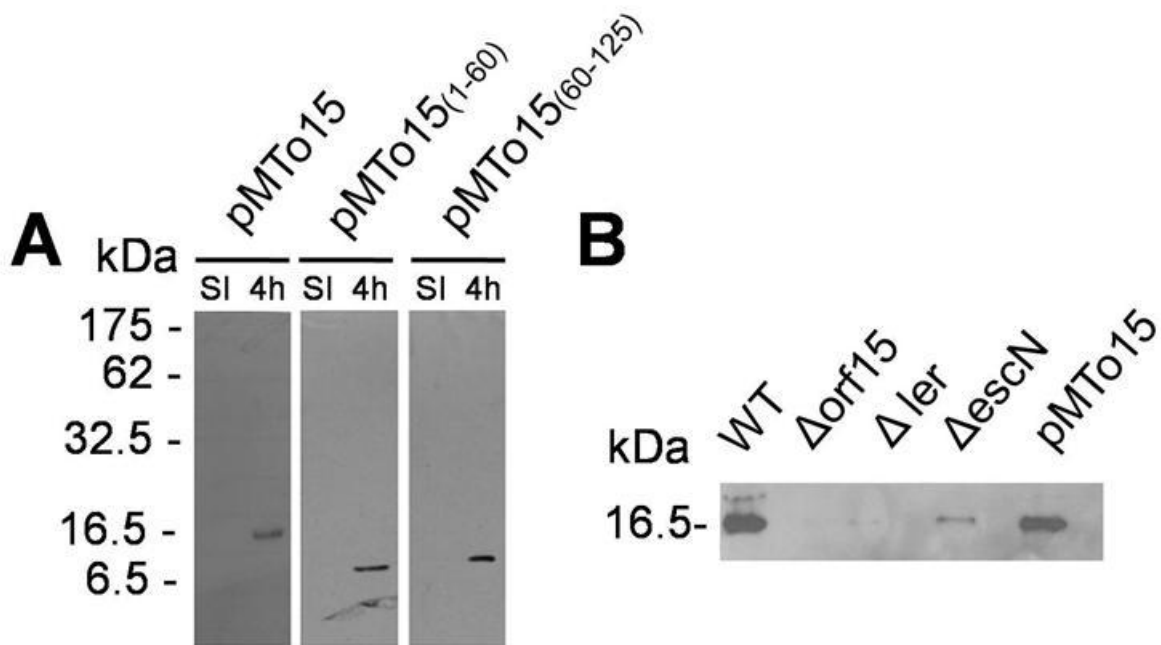


Figura 22. Inmunodetección tipo Western blot utilizando los anticuerpos policlonales anti-Orf15. A. Inmunodetección de las diferentes versiones de Orf15. pMT015: pTrc99A + *orf15*, pNT015 (1-60): pTrc99A+ *orf15* (1-60), pMT015 (60-125): pTrc99A+ *orf15* (60-125). SI: Muestra del plásmido transformado en SJW1368 antes de agregar IPTG. 4h: Inducción de la producción de las proteínas al agregar 0.5 mM de IPTG e incubar 4 horas a 20°C. Anticuerpo primario: Anti-Orf15 1:20,000. Anticuerpo secundario GAR 1:20,000. B. Inmunodetección de Orf15 en los lisados de diferentes cepas de EPEC. Anticuerpo primario: anti-Orf15 1:2,000. Anticuerpo secundario GAR 1:20,000.

➤ **His-Orf15 presenta formas oligoméricas resistentes a SDS.**

Inicialmente, al purificar la proteína His-Orf15, en el gel se observaron otras bandas de mayor tamaño que no se pudieron eliminar a pesar de incrementar el volumen de los lavados con imidazol. Para corroborar si se trataba de formas oligoméricas o de alguna proteína contaminante, se analizaron diferentes muestras de la proteína purificada por medio de SDS-PAGE al 15%, tanto en presencia como en ausencia de un agente reductor como es el β -mercaptoetanol (Figura 23). Las muestras con agente reductor también se hirvieron durante 5 minutos. Lo que se observó

es que en presencia de β -mercaptoetanol y después de hervirse, las bandas que corresponden a proteínas de mayor tamaño desaparecen; lo que nos indica que se trata de formas oligoméricas de Orf15 con enlaces disulfuro y resistentes a SDS. El estado oligomérico de la proteína aún no se ha determinado, por lo que como perspectiva de este trabajo se ha planteado el caracterizar esta propiedad, así como determinar su importancia en la función de la misma.

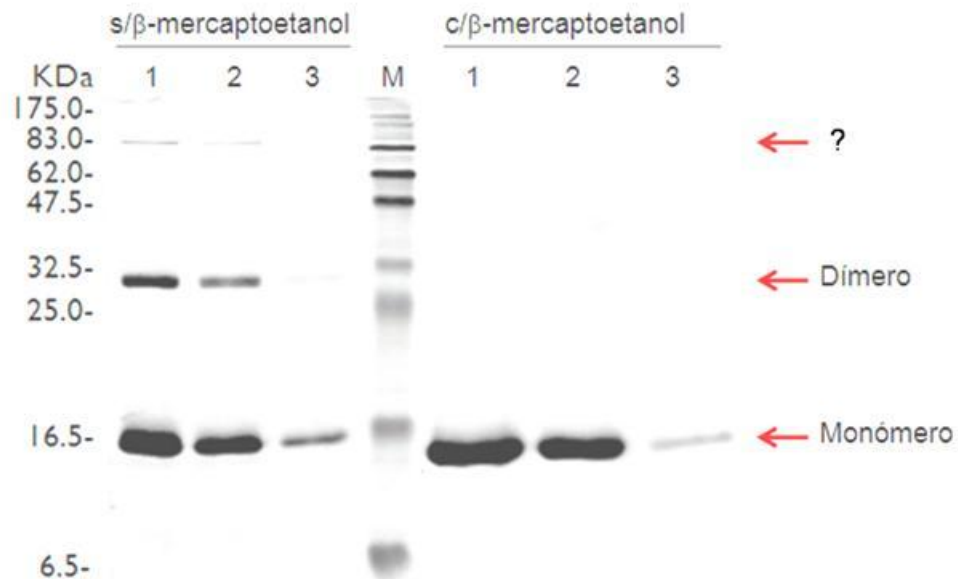


Figura 23. Formas oligoméricas de His-Orf15 resistentes a SDS. Análisis de diferentes eluciones con 500 mM de Imidazol (1-3) de la proteína His-Orf15 en SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie, en presencia y ausencia de agente reductor (β -mercaptoetanol). Se identificaron formas oligoméricas (flechas) resistentes a SDS.

▼ **Orf15 posee un efecto multicopia que bloquea la secreción de proteínas.**

En el sistema flagelar se ha reportado que la sobreproducción de FliJ en una cepa silvestre de *Salmonella*, ocasiona una disminución en el nado

de la bacteria, lo que sugiere que esta proteína pudiera estar interactuando con otros componentes relacionados con el proceso de exportación (Minamino & MacNab, 2000b). Para determinar si existe un efecto similar de Orf15, se sobreprodujeron las proteínas His-Orf15 y Orf15 en EPEC, a partir de las construcciones en el vector pTrc99A induciendo la expresión de los plásmidos con 0.01 mM de IPTG en medio DMEM a 37°C en una atmósfera de CO₂ 5% durante 3 horas. Las proteínas secretadas al sobrenadante se precipitaron adicionando TCA al 10% e incubaron toda la noche a 4 °C. Después de centrifugar, la pastilla se resuspendió en amortiguador de carga SDS: Tris-saturado 10% para analizarlas por SDS-PAGE 15% (Figura 24A).

Lo que se observó es que la sobreproducción tanto de Orf15, como de His-Orf15 tiene un efecto multicopia negativo en la secreción. La producción de proteínas se analizó a partir de las células completas y se pudo observar que no hay alteración en la síntesis (Figura 24B), lo que indica que el efecto de sobreexpresión sólo afecta el proceso de secreción. Esto sugiere que Orf15 podría estar interactuando con y/o reclutando algunos de los componentes que participan en el proceso de secreción, pudiendo ser dicha proteína un componente del aparato secretor.

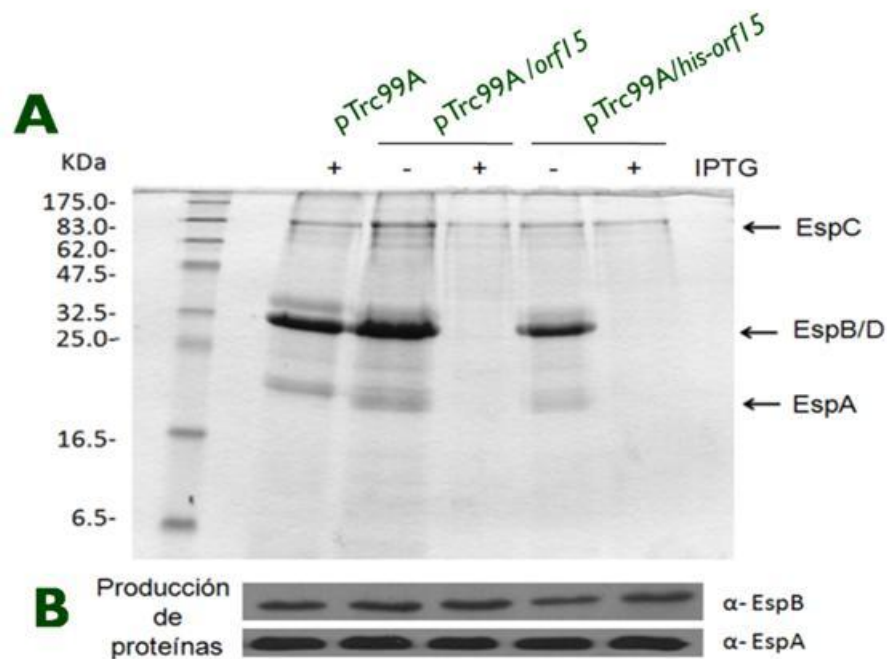


Figura 24. Efecto multicopia de Orf15. A. Ensayo de secreción de proteínas en medio DMEM a 37°C con CO₂ 5%. B: La producción de proteínas se corroboró por medio de inmunodetección utilizando anticuerpos específicos anti-EspB (1:30,000) y anti-EspA (1:40,000) y como anticuerpo secundario GAR (1:20,000).

➔ **Orf15 es un componente esencial del SST3 de EPEC.**

Para entender la función de la proteína Orf15 se generó una mutante nula de EPEC en el gen *orf15* insertando un casete de resistencia a kanamicina, a través de recombinación homóloga utilizando el sistema de la recombinasa Red del fago Lambda (Datsenko & Wanner, 2000). La inserción del casete en el lugar de interés se analizó por PCR utilizando cebadores internos y externos al mismo (Figura 25 y Figura 26). Por último el producto de PCR que se muestra en la Figura 26A se mandó a secuenciar y se verificó la correcta inserción del casete y ausencia de mutaciones.

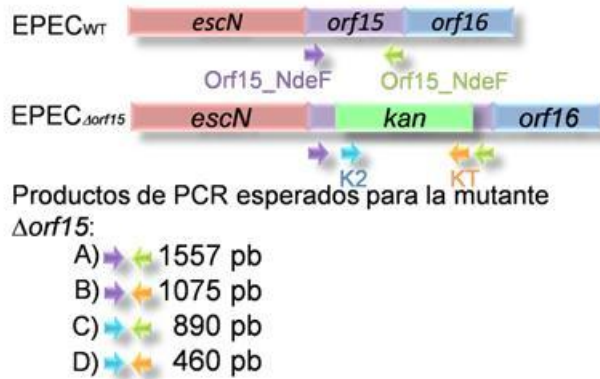


Figura 25. Esquema del gen *orf15* silvestre (WT) y el gen mutado con el casete de Kanamicina ($\Delta orf15$). Las flechas indican los diferentes cebadores utilizados.

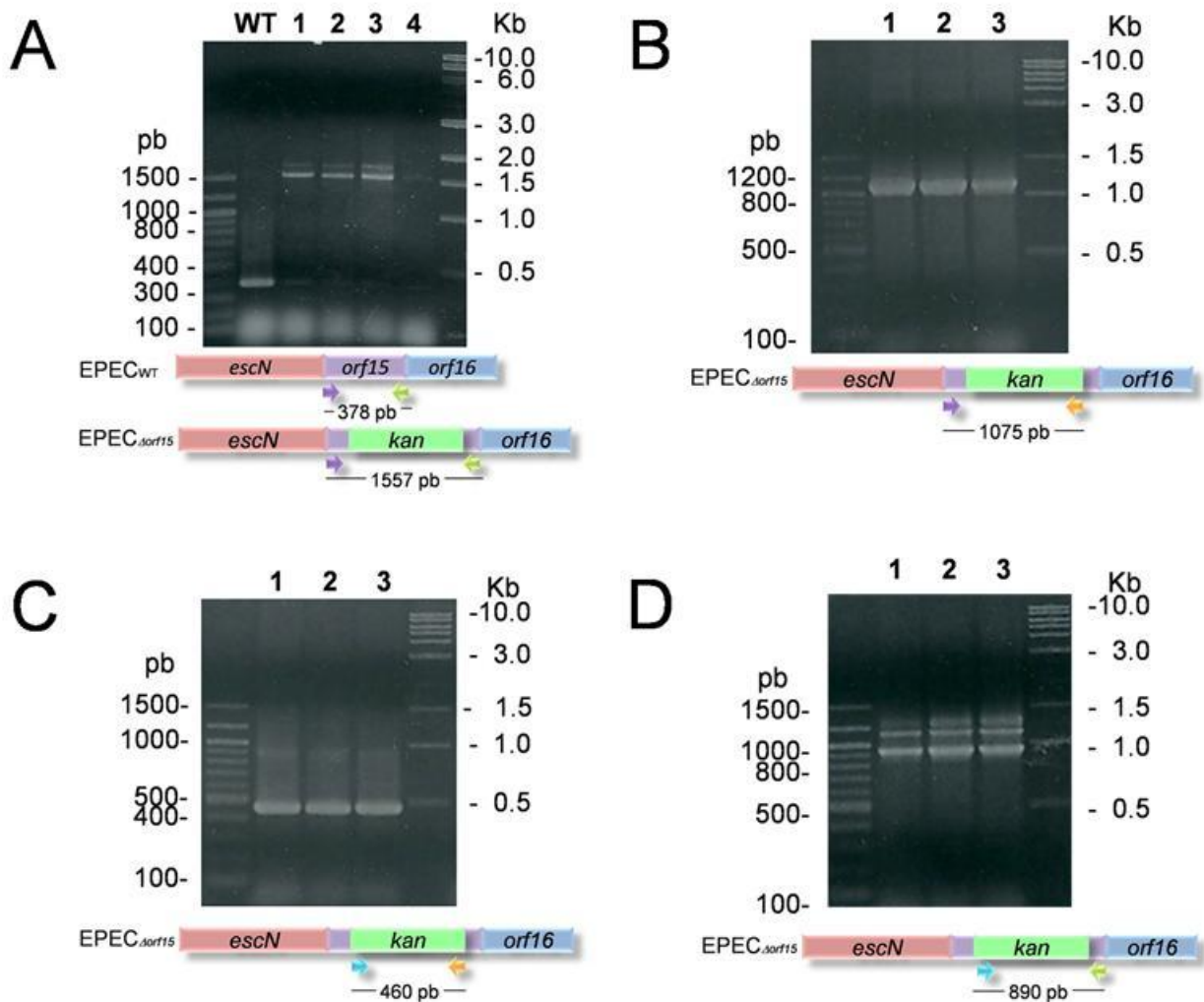


Figura 26. Productos de PCR obtenidos durante el análisis de la mutante. A: PCR utilizando los cebadores Orf15_NdeF y Orf15_BamHIR. B. PCR utilizando los cebadores Orf15_NdeF y KT. C. PCR utilizando los cebadores K2 y Orf15_BamHIR. D. PCR utilizando los cebadores K2 y KT.

Una vez que se obtuvo la cepa mutante, se determinó el efecto en la secreción ocasionado por la eliminación del gen *orf15*. Para determinar el fenotipo de secreción se crecieron 3 cepas de EPEC (WT, Δ *escN* y Δ *orf15*) en medio DMEM a 37°C con 5% de CO₂ para obtener el perfil de secreción de proteínas, como se describe en la metodología. Se utilizó la cepa mutante en la ATPasa EscN la cual no secreta proteínas del SST3 (Andrade et al., 2007). La proteína EspC es un autotransportador independiente del SST3 (Stein et al., 1996) y sirvió como control de carga. El resultado mostró que la mutante Δ *orf15* es incapaz de secretar tanto proteínas efectoras como translocadoras (Figura 27A). Esto se corroboró con inmunodetección de la secreción (Figura 27B) y producción (Figura 27C) de proteínas utilizando anticuerpos específicos. La supresión en la secreción de proteínas a través del SST3 en la mutante Δ *orf15*, nos indica que Orf15 es una proteína indispensable para la secreción.

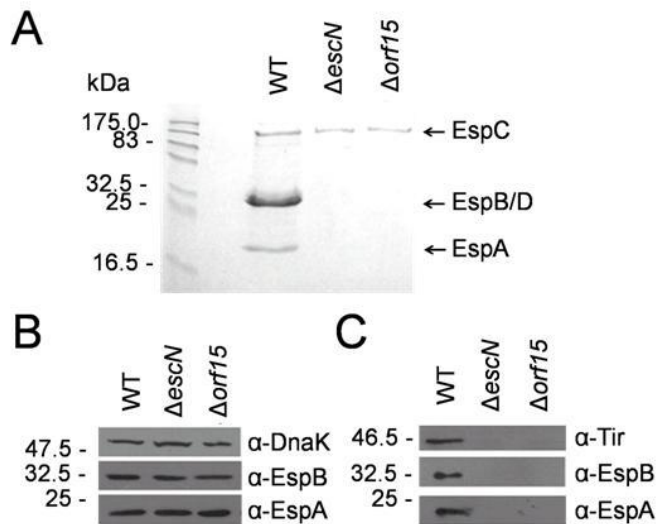


Figura 27. Fenotipo de secreción de la mutante Δ *orf15*. A. Perfil de secreción de las cepas WT, Δ *escN* y Δ *orf15*. B. Inmunodetección de proteínas producidas. C. Inmunodetección de proteínas secretadas utilizando anticuerpos específicos anti-Tir, anti-EspA y anti-EspB.

Para restaurar el fenotipo y comprobar que la mutación no tiene efectos sobre otros componentes del sistema, la cepa $\Delta orf15$ se transformó con los plásmidos pMT015 (pTrc99A_FF4 + *orf15*) y pNE015 (pET19b + *orf15*), así como con los vectores vacíos (pTrc99A y pET19b). La secreción de proteínas se restaura al introducir el gen *orf15 in trans* (Figura 28A), lo que nos indica que la supresión en la secreción de proteínas del SST3 es un efecto propio de la proteína Orf15 y de nuevo se puede corroborar la hipótesis de que Orf15 es un componente esencial durante el proceso de secreción. La producción de proteínas se corroboró por inmunodetección con anticuerpos específicos anti-EspA y anti-EspB (Figura 28B). Otro resultado interesante es que también la proteína His-Orf15 es capaz de complementar a la mutante, lo que nos indica que esta versión de Orf15, con la etiqueta de 10 histidinas en la región N-terminal, es funcional.

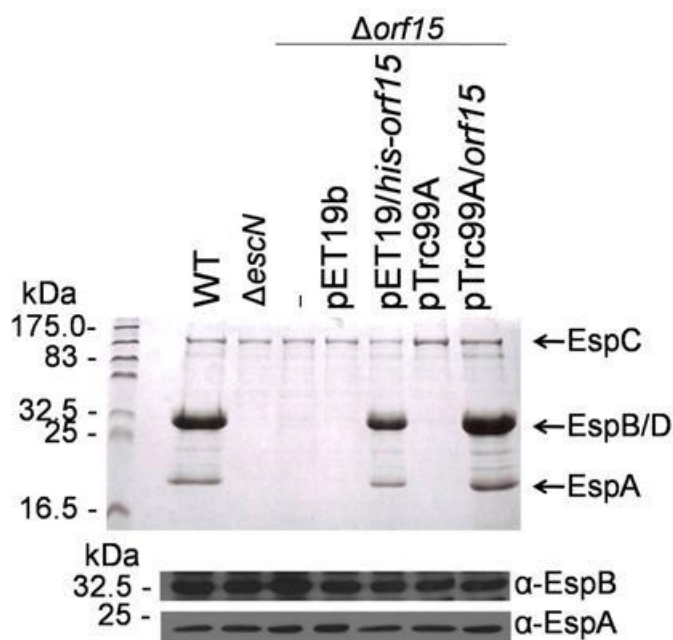


Figura 28. Complementación de $\Delta orf15$.
 A. Perfil de secreción de las diferentes cepas. SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie. B. Inmunodetección tipo Western Blot de la producción de proteínas utilizando anticuerpos específicos.

➤ **La región C-terminal de Orf15 es indispensable para su función.**

Con el fin de analizar la importancia de la región C-terminal de orf15, se generaron nuevas versiones de Orf15; la primera, con una etiqueta de 6 histidinas en el C-terminal (Orf15-His) y la segunda, con una etiqueta de 2 epítopes de hemaglutinina en el C-terminal (Orf15-HA). Para ver si estas versiones eran funcionales se complementó la cepa $\Delta orf15$. Lo que se pudo observar es que Orf15-His no complementa la mutante al mismo nivel que la versión de Orf15 con la etiqueta de 10 histidinas en la región amino (His-Orf15) y con la versión Orf15-HA no se observa complementación (Figura 29). El número de copias de los plásmidos pET23b (utilizado para producir la proteína Orf15-His) y pET19b (utilizado para producir la proteína His-Orf15) es de 40 copias por célula, mientras que el del plásmido pTOPO-2HA (utilizado para producir la proteína Orf15-HA) es de 500 a 700 copias por célula. Con base en el efecto multicopia antes visto para Orf15 (Figura 24), podemos concluir que este es el factor principal para que la versión Orf15-HA no complemente la cepa $\Delta orf15$. Sin embargo, ya que el número de copias en los vectores pET es igual, podemos concluir que la etiqueta en la región carboxilo afecta la funcionalidad de la proteína. Esto podría sugerir que la interacción de la región C-terminal con otro componente del sistema es importante para llevar a cabo la secreción de proteínas.

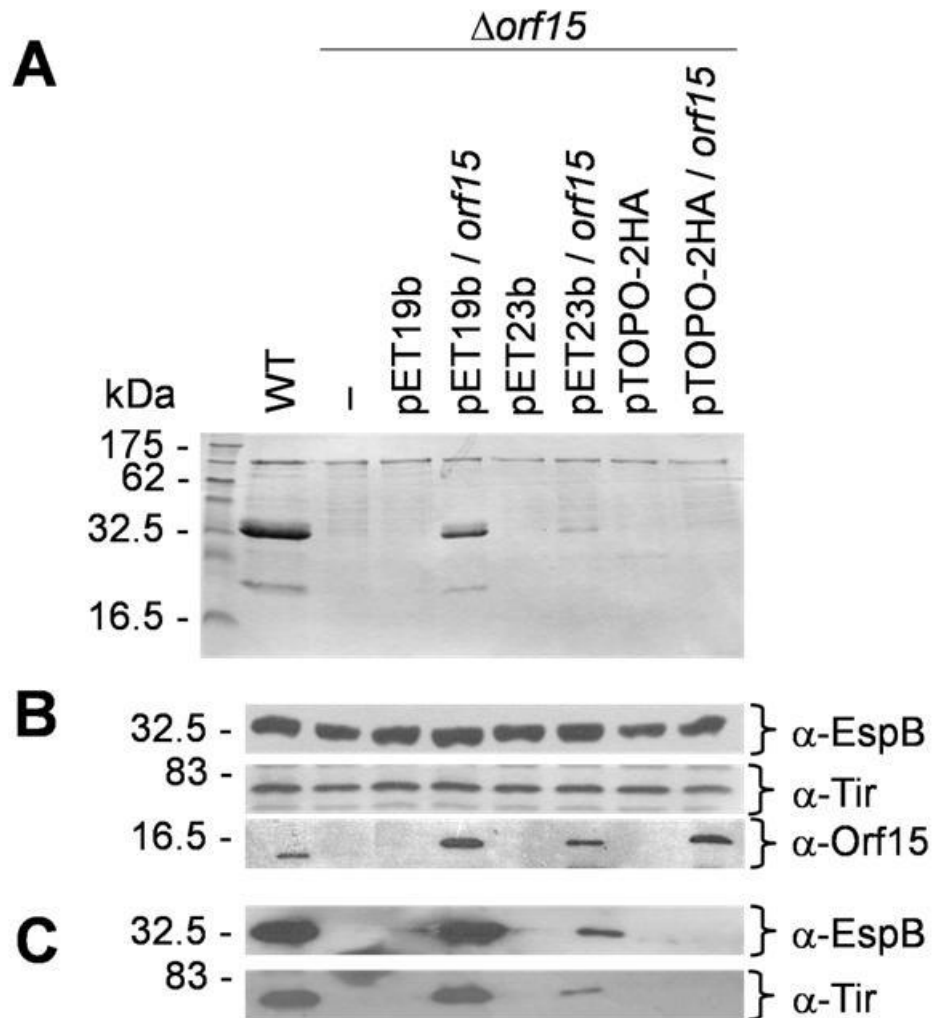


Figura 29. Complementación de $\Delta orf15$ con versiones de Orf15 con etiquetas en el C-terminal. A. Ensayo de secreción en DMEM a 37°C con CO₂ 5%. B. Inmunodetección de producción de proteínas en lisados celulares con anticuerpos específicos anti-EspB, anti-Tir y anti-Orf15. C. Inmunodetección de secreción de proteínas con anticuerpos específicos anti-EspB y anti-Tir.

▼ La ATPasa EscN restaura parcialmente la secreción en la cepa $\Delta orf15$.

En el 2003, Macnab y su grupo investigaron los efectos de la sobreproducción de componentes solubles del aparato de exportación flagelar en un fondo mutante en la proteína FliH (regulador negativo de

la ATPasa, FliI) (Minamino et al., 2003) y encontraron que la sobreproducción de la ATPasa FliI produce una recuperación parcial de la secreción y la motilidad en una mutante *fliH*. Siguiendo la misma estrategia, la cepa $\Delta orf15$ se transformó con un plásmido que codifica la proteína EscN. Las células se incubaron en DMEM a 37°C con CO₂ 5% y se agregó 0.1 mM de IPTG para inducir la sobreexpresión del gen *escN*. Las proteínas secretadas se precipitaron con TCA al 10%, como se ha mencionado anteriormente. El fenotipo de secreción se analizó por medio de inmunodetección utilizando anticuerpos anti-EspB, anti-EspA y anti-DnaK (como control de lisis celular, ya que es una proteína citoplásmica). En el caso de las proteínas efectoras EspF y Tir no se pudieron detectar las proteínas posiblemente debido a que la cantidad que se secreta es muy poca. Sin embargo, se observó que la secreción de las proteínas translocadoras EspB y EspA se restaura parcialmente al sobreproducir a la proteína EscN. Como control, se sobreprodujo una mutante catalítica de EscN (EscN_{K183E}), la cual no restaura el proceso de secreción (**Figura 30**). Estos resultados sugieren que la función de Orf15 se encuentra relacionada con la de la ATPasa, pudiera ser facilitando su correcta localización. Asimismo, se requiere de una enzima funcional para poder restaurar el fenotipo de la mutante.

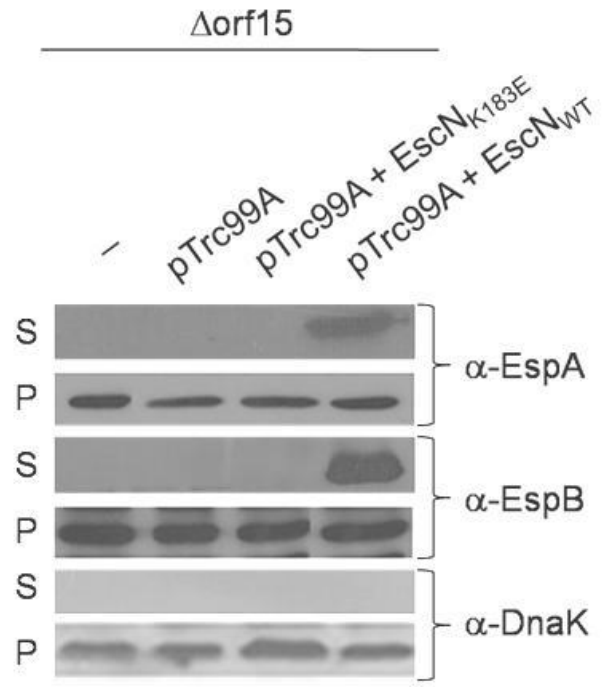


Figura 30. Sobreproducción de EscN en $\Delta orf15$. Inmunodetección de proteínas secretadas (S) y proteínas producidas (P) al sobreproducir la ATPasa EscN silvestre y la mutante catalítica EscN_{K183E}.

BIÓL. MARIANA ROJAS CASTILLO

DISCUSIÓN

El modelo de estudio en este proyecto es un patógeno importante que afecta a 30% de la población infantil de este país (Nataro & Kaper, 1998).

Estamos interesados en caracterizar el SST3 y el proceso de secreción de efectores de virulencia, así como la participación de cada uno de sus componentes en el ensamblaje y en su funcionamiento. Dentro de la isla de patogenicidad LEE, se encontró un gen que codifica para una proteína de función desconocida, por lo que se planteó como objetivo la caracterización de ésta para conocer su función en la biogénesis del inyectisoma y la secreción de proteínas de virulencia.

En este trabajo se obtuvieron evidencias importantes sobre la relevancia de la proteína Orf15 en el proceso de secreción tipo III. La baja similitud de secuencia (20-34%) de Orf15 con las proteínas codificadas por genes sintéticos como InvI (*Shigella*), YscO (*Yersinia*) o SpaM (*Salmonella*) ha dificultado la definición de estas proteínas dentro de una misma familia o como posibles ortólogos; sin embargo, gracias al análisis bioinformático realizado se identificó que Orf15 comparte ciertas características con las proteínas equivalentes de otros SST3 como son un tamaño pequeño, un punto isoeléctrico básico, una estructura

secundaria preferentemente alfa-helicoidal y una tendencia a formar estructuras tipo *coiled-coil* (Minamino *et al.*, 2000, Gazi *et al.*, 2008, Collazo *et al.*, 1995, Payne & Straley, 1998, Penno *et al.*, 2006). También se pudieron identificar algunos residuos que están conservados entre los miembros de este grupo y que pudieran estar participando en su función.

La purificación de la proteína His-Orf15 nos permitió observar la presencia de formas oligoméricas resistentes a SDS en ausencia de un agente reductor como el β -mercaptoetanol, las cuales probablemente se formen a través de puentes disulfuro entre las cisteínas que posee Orf15 en su secuencia (Cys37 y Cys52). El estudio de estos residuos durante la oligomerización de Orf15 y de la importancia del estado oligomérico en la función de la proteína es una de las perspectivas a realizarse.

Otro factor importante ha sido el análisis de la sobreexpresión de *orf15* en una cepa silvestre de EPEC. Al igual que lo observado para FliJ, la sobreproducción de Orf15 en la cepa silvestre provoca la supresión de secreción de las proteínas del SST3, lo que sugiere que Orf15 podría estar interactuando con otras proteínas involucradas en la secreción.

Al analizar el fenotipo de la cepa mutante en el gen *orf15* pudimos corroborar que al igual que las proteínas de este grupo, Orf15 es una proteína indispensable para la secreción de proteínas del SST3. Este defecto en la secreción es similar al observado para otras proteínas de

LEE, en *Citrobacter rodentium*, que son componentes del aparato de secreción incluyendo la ATPasa EscN, el regulador de la ATPasa EscL y las proteínas EscR, EscS, EscT, EscU (Deng et al., 2004); por lo que se piensa que Orf15 podría tratarse de un componente del aparato de exportación. También se pudo concluir que la región C-terminal de la proteína es importante para su función, ya que estaría involucrada en la interacción con algún otro componente como EscN.

Al analizar el efecto que tiene la sobreproducción de la ATPasa en la cepa $\Delta orf15$ se observó una restauración parcial de la secreción. La explicación más sencilla para este proceso se puede describir como que un exceso de la ATPasa EscN sustituye la posible participación que Orf15 podría tener en la localización, oligomerización o activación de la ATPasa. Sin embargo, el hecho de que la secreción no se restaure de forma similar a la secreción de la cepa silvestre, nos indica que Orf15 juega un papel importante en la funcionalidad y/o localización de la ATPasa EscN para que ésta pueda proveer la energía suficiente para que se lleve a cabo la secreción de proteínas a través del SST3. Esto es comparable con los resultados observados en el sistema flagelar de *Salmonella*, donde la sobreproducción de la ATPasa FliI restaura parcialmente la exportación de proteínas del SST3 y la motilidad en una cepa $\Delta fliH$ (Minamino et al., 2003).

Durante este estudio se obtuvieron las primeras herramientas para poder realizar un análisis funcional sobre la proteína Orf15 y los primeros resultados sobre la importancia que puede jugar esta proteína durante el proceso de secreción.

BIÓL. MARIANA ROMO CASTILLO

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos durante el proyecto podemos concluir que:

1. Orf15 comparte características con las proteínas codificadas por genes sinténicos, es pequeña (15 kDa), con un punto isoeléctrico básico (9.6), una estructura secundaria preferentemente alfa helicoidal con tendencia a formar estructuras tipo *coiled-coil*.
2. Orf15 es un componente esencial del aparato de secreción ya que al eliminar el gen que codifica a esta proteína, no hay secreción de proteínas del sistema de virulencia.
3. Orf15 tiene estados oligoméricos resistentes a SDS en ausencia de un agente reductor, como el β -mercaptoetanol, lo que sugiere se trata de puentes disulfuro que sirven para interacciones intermoleculares.
4. La región carboxilo es importante para la función, ya que si se le añade una etiqueta (histidinas o 2 epítopes de Hemaglutinina), la proteína pierde su funcionalidad y no es capaz de complementar la secreción en una cepa $\Delta orf15$.

5. La función de la proteína Orf15 se encuentra relacionada con la de la ATPasa del sistema de secreción.

Las perspectivas que se han planteado para continuar con este trabajo son:

- ✓ Identificar y caracterizar las interacciones de Orf15 con diferentes componentes del SST3 como la ATPasa (EscN) y las proteínas EscL y EscQ; así como con las chaperonas (CesAB, CesD, CesD2, CesF, CesT y CesA2).
- ✓ Identificar el dominio de Orf15 que participa en la interacción con cada uno de los componentes del SST3.
- ✓ Identificar los residuos importantes para la función de Orf15 a través de mutagénesis dirigida y ensayos de complementación
- ✓ Determinar el estado oligomérico de Orf15.

BIBLIOGRAFÍA

- Albert, M. J., M. Ansaruzzaman, S. M. Faruque, P. K. Neogi, K. Haider & S. Tzipori, (1991) An ELISA for the detection of localized adherent classic enteropathogenic Escherichia coli serogroups. *J Infect Dis* **164**: 986-989.
- Aldridge, P. & K. T. Hughes, (2001) How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol* **9**: 209-214.
- Andrade, A., J. P. Pardo, N. Espinosa, G. Perez-Hernandez & B. Gonzalez-Pedrajo, (2007) Enzymatic characterization of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion ATPase EscN. *Arch Biochem Biophys* **468**: 121-127.
- Bettelheim, K. A., L. Beutin, K. Gleier, J. L. Pearce, R. K. Luke & S. Zimmermann, (2003) Serotypes of Escherichia coli isolated from healthy infants in Berlin, Germany and Melbourne, Australia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**: 55-63.
- Clarke, S. C., R. D. Haigh, P. P. Freestone & P. H. Williams, (2003) Virulence of enteropathogenic Escherichia coli, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* **16**: 365-378.
- Collazo, C. M., M. K. Zierler & J. E. Galan, (1995) Functional analysis of the Salmonella typhimurium invasion genes invL and invJ and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the inv locus. *Mol Microbiol* **15**: 25-38.
- Crepin, V. F., R. Shaw, C. M. Abe, S. Knutton & G. Frankel, (2005) Polarity of enteropathogenic Escherichia coli EspA filament assembly and protein secretion. *J Bacteriol* **187**: 2881-2889.
- Daniell, S. J., E. Kocsis, E. Morris, S. Knutton, F. P. Booy & G. Frankel, (2003) 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol* **49**: 301-308.
- Datsenko, K. A. & B. L. Wanner, (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- Delahay, R. M. & G. Frankel, (2002) Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Mol Microbiol* **45**: 905-916.
- Deng, W., Y. Li, P. R. Hardwidge, E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, S. Lee, S. Gruenheid, N. C. Strynaka, J. L. Puente & B. B. Finlay, (2005) Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun* **73**: 2135-2146.
- Deng, W., Y. Li, B. A. Vallance & B. B. Finlay, (2001) Locus of enterocyte effacement from Citrobacter rodentium: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect Immun* **69**: 6323-6335.
- Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson & B. B. Finlay, (2004) Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3597-3602.
- Dreyfus, G., A. W. Williams, I. Kawagishi & R. M. Macnab, (1993) Genetic and biochemical analysis of Salmonella typhimurium Flil, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the FOF1 ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. *J Bacteriol* **175**: 3131-3138.
- Dutta, K., A. Alexandrov, H. Huang & S. M. Pascal, (2001) pH-induced folding of an apoptotic coiled coil. *Protein Sci* **10**: 2531-2540.
- Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg & J. B. Kaper, (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic Escherichia coli E2348/69. *Mol Microbiol* **28**: 1-4.

- Estrada-Garcia, T., C. Lopez-Saucedo, R. Thompson-Bonilla, M. Abonce, D. Lopez-Hernandez, J. I. Santos, J. L. Rosado, H. L. DuPont & K. Z. Long, (2009) Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* **47**: 93-98.
- Evans, L. D., G. P. Stafford, S. Ahmed, G. M. Fraser & C. Hughes, (2006) An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17474-17479.
- Fan, F. & R. M. Macnab, (1996) Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **271**: 31981-31988.
- Flisser, A., A. Velasco-Villa, C. Martinez-Campos, F. Gonzalez-Dominguez, B. Briseno-Garcia, R. Garcia-Suarez, A. Caballero-Servin, I. Hernandez-Monroy, H. Garcia-Lozano, L. Gutierrez-Cogco, G. Rodriguez-Angeles, I. Lopez-Martinez, S. Galindo-Virgen, R. Vazquez-Campuzano, S. Balandrano-Campos, C. Guzman-Bracho, A. Olivo-Diaz, J. de la Rosa, C. Magos, A. Escobar-Gutierrez & D. Correa, (2002) Infectious diseases in Mexico. A survey from 1995-2000. *Arch Med Res* **33**: 343-350.
- Fraser, G. M., B. Gonzalez-Pedrajo, J. R. Tame & R. M. Macnab, (2003) Interactions of FliJ with the *Salmonella* type III flagellar export apparatus. *J Bacteriol* **185**: 5546-5554.
- Gauthier, A., J. L. Puente & B. B. Finlay, (2003) Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* **71**: 3310-3319.
- Gazi, A. D., M. Bastaki, S. N. Charova, E. A. Gkougkouli, E. A. Kapellios, N. J. Panopoulos & M. Kokkinidis, (2008) Evidence for a coiled-coil interaction mode of disordered proteins from bacterial type III secretion systems. *J Biol Chem* **283**: 34062-34068.
- Ghosh, P., (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 771-795.
- Gomes, T. A., V. Rassi, K. L. MacDonald, S. R. Ramos, L. R. Trabulsi, M. A. Vieira, B. E. Guth, J. A. Candeias, C. Ivey, M. R. Toledo & et al., (1991) Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. *J Infect Dis* **164**: 331-337.
- Gonzalez-Pedrajo, B., T. Minamino, M. Kihara & K. Namba, (2006) Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. *Mol Microbiol* **60**: 984-998.
- Goosney, D. L., R. DeVinney & B. B. Finlay, (2001) Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect Immun* **69**: 3315-3322.
- Hayward, R. D., J. M. Leong, V. Koronakis & K. G. Campellone, (2006) Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. *Nat Rev Microbiol* **4**: 358-370.
- Hueck, C. J., (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Ide, T., S. Michgehl, S. Knapstein, G. Heusipp & M. A. Schmidt, (2003) Differential modulation by Ca²⁺ of type III secretion of diffusely adhering enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**: 1725-1732.
- Journet, L., K. T. Hughes & G. R. Cornelis, (2005) Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence (review). *Mol Membr Biol* **22**: 41-50.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro & H. L. Mobley, (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-140.
- Kenny, B., A. Abe, M. Stein & B. B. Finlay, (1997) Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* **65**: 2606-2612.
- Lee, S. H. & J. E. Galan, (2004) *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol* **51**: 483-495.
- Levine, M. M., E. S. Caplan, D. Waterman, R. A. Cash, R. B. Hornick & M. J. Snyder, (1977) Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* **17**: 78-82.

- Lupas, A., (1996) Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol* **266**: 513-525.
- Maddocks, O. D., A. J. Short, M. S. Donnenberg, S. Bader & D. J. Harrison, (2009) Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PLoS ONE* **4**: e5517.
- Mason, J. M. & K. M. Arndt, (2004) Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem* **5**: 170-176.
- Minamino, T., R. Chu, S. Yamaguchi & R. M. Macnab, (2000) Role of FliJ in flagellar protein export in *Salmonella*. *J Bacteriol* **182**: 4207-4215.
- Minamino, T., B. Gonzalez-Pedrajo, M. Kihara, K. Namba & R. M. Macnab, (2003) The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH. *J Bacteriol* **185**: 3983-3988.
- Minamino, T. & R. M. MacNab, (2000a) FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol Microbiol* **37**: 1494-1503.
- Minamino, T. & R. M. MacNab, (2000b) Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol Microbiol* **35**: 1052-1064.
- Moraes, T. F., T. Spreter & N. C. Strynadka, (2008) Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 258-266.
- Nataro, J. P. & J. B. Kaper, (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Ochoa, T. J., F. Barletta, C. Contreras & E. Mercado, (2008) New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**: 852-856.
- Ohnishi, K., F. Fan, G. J. Schoenhals, M. Kihara & R. M. Macnab, (1997) The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly. *J Bacteriol* **179**: 6092-6099.
- Ohnishi, K., Y. Ohto, S. Aizawa, R. M. Macnab & T. Iino, (1994) FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 2272-2281.
- Pallen, M. J., S. A. Beatson & C. M. Bailey, (2005) Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol* **5**: 9.
- Parsot, C., C. Hamiaux & A. L. Page, (2003) The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **6**: 7-14.
- Payne, P. L. & S. C. Straley, (1998) YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *J Bacteriol* **180**: 3882-3890.
- Penno, C., A. Hachani, L. Biskri, P. Sansonetti, A. Allaoui & C. Parsot, (2006) Transcriptional slippage controls production of type III secretion apparatus components in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **62**: 1460-1468.
- Riordan, K. E. & O. Schneewind, (2008) YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes. *Mol Microbiol* **68**: 1485-1501.
- Ryu, J. & R. J. Hartin, (1990) Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2. *Biotechniques* **8**: 43-45.
- Stein, M., B. Kenny, M. A. Stein & B. B. Finlay, (1996) Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol* **178**: 6546-6554.
- Stone, C. B., D. L. Johnson, D. C. Bulir, J. D. Gilchrist & J. B. Mahony, (2008) Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN (Cpn0707) of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Bacteriol* **190**: 6580-6588.
- Tampakaki, A. P., V. E. Fadoulglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos & M. Kokkinidis, (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**: 805-816.
- Thomas, N. A., W. Deng, N. Baker, J. Puente & B. B. Finlay, (2007) Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **282**: 29634-29645.

- Vidal, J. E., A. Canizalez-Roman, J. Gutierrez-Jimenez & F. Navarro-Garcia, (2007) [Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic Escherichia coli]. *Salud Publica Mex* **49**: 376-386.
- Wolf, E., P. S. Kim & B. Berger, (1997) MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci* **6**: 1179-1189.
- Yonekura, K., S. Maki, D. G. Morgan, D. J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada & K. Namba, (2000) The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* **290**: 2148-2152.
- Zhou, N. E., C. M. Kay & R. S. Hodges, (1994) The net energetic contribution of interhelical electrostatic attractions to coiled-coil stability. *Protein Eng* **7**: 1365-1372.

BIÓL. MARIANA ROMO CASTILLO