

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**El sistema de secreción tipo 3 de *Escherichia coli*
enteropatógena y su uso potencial con fines terapéuticos**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

Pablo Vladimir Cabañas Romero

Ensenada, Baja California. México
2014

Tesis defendida por

Pablo Vladimir Cabañas Romero

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Director del Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Miembro del Comité

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Miembro del Comité

Dr. Marco Antonio De León Nava
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador
del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Noviembre, 2014

Resumen de la tesis de Pablo Vladimir Cabañas Romero, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con Orientación en Biotecnología Marina.

El sistema de secreción tipo 3 de *Escherichia coli* enteropatógena y su uso potencial con fines terapéuticos.

Resumen elaborado por:

Pablo Vladimir Cabañas Romero

El sistema de secreción tipo tres (SST3) de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) le confiere la capacidad de provocar la lesión de adherencia y eliminación (A/E), en los enterocitos del organismo hospedero, ocasionada por la translocación de proteínas que facilitan la adherencia íntima entre la bacteria y el hospedero. El SST3 de EPEC se encuentra codificado en el Locus of Enterocyte Effacement (LEE), una isla de patogenicidad donde se encuentran los genes que codifican para las proteínas que modifican los procesos celulares y las rutas de transducción de señales del organismo hospedero. El mecanismo por el cual EPEC logra modificar el metabolismo celular del hospedero mediante el SST3 ha sido objeto de estudio, lo cual ha permitido entregar proteínas modificadas con fines terapéuticos a células diana a través de cepas bacterianas atenuadas. El SST3 es una nano-máquina compleja que puede ser utilizada como una herramienta terapéutica, al realizar la expresión heteróloga de la isla de patogenicidad LEE y de proteínas quiméricas en cepas no patógenas de *Escherichia coli*, para la entrega de estas proteínas modificadas. El trabajo realizado permitió tomar como ventaja el uso de la cepa comensal MC4100 para expresar heterológamente el SST3 de EPEC y la proteína de interés terapéutico nombrada EspF-CYPBM3 para su exportación eficiente al medio extracelular y su translocación a células epiteliales HeLa. La proteína quimérica mantuvo su actividad enzimática al interior celular, lo que nos permitirá probarla en líneas celulares de cáncer de colon para su posterior utilización en terapias anticancerígenas.

Palabras clave: **Sistema de secreción Tipo III, EPEC, LEE, MC4100, CYPBM3.**

Abstract of the thesis presented by Pablo Vladimir Cabañas Romero, as a partial requirement to obtain the master degree in science of life sciences program with marine biotechnology orientation.

Therapeutic use of Type III Secretion System (T3SS) of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)

Abstract by:

Pablo Vladimir Cabañas Romero

The Type III Secretion System (T3SS) of Enteropathogenic *Escherichia coli* confer the ability to elicit a lesion by the translocation of effector proteins into the enterocytes, facilitating the intimate adherence between bacteria and host cell. EPEC T3SS is codified in the Locus of Enterocyte Effacement (LEE), a pathogenicity island which confers to the bacteria the ability of synthesize the T3SS and the proteins that modify the cellular processes and the transduction signal pathways of the host organism. The mechanism by which EPEC can modify the cellular metabolism of the host organism through the T3SS has been subject to study and has allowed the delivery of therapeutic modified proteins to target cells by attenuated bacterial strains. The T3SS is a complex nano-machine that can be used as a therapeutic tool by performing the heterologous expression of the LEE pathogenicity island and chimeric proteins in non-pathogenic strains of *Escherichia coli*, for the controlled delivery of this modified proteins. In the present work we took advantage of functional heterologous expression of EPEC T3SS into MC4100 commensal strain. In addition, we co-expressed therapeutic protein EspF-CYPBM3 for its efficient delivery into epithelial HeLa cells. The translocation of the protein into the epithelial cells and the presence of enzymatic activity inside host cells provided us encouraging results to test this mechanism in colo-rectal cancer cells for anti-carcinogenic therapies.

Keywords: Secretion System Type III, EPEC, LEE, MC4100, CYP.

“Intenta no volverte un hombre de éxito, sino volverte un hombre de valor”

Albert Einstein

A mis padres, Pedro y Ana.

Agradecimientos

A mi tutor, el Dr. Alejandro Huerta Saquero, por darme la oportunidad de formar parte del grupo de bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, pero sobre todo por brindarme su confianza y paciencia para realizar este proyecto.

A mi comité de tesis, la Dra. Ernestina Castro Longoria, la Dra. Ma. Lucila del Carmen Lares Reyes y el Dr. Marco A. De León Nava, por sus valiosos consejos y apoyo para realizar un buen trabajo de tesis.

A la Dra. Karla Oyuky Juárez por el apoyo experimental en la última fase del trabajo y por compartir su conocimiento y experiencia.

A la Dra. Katrin Quester por su consejo y apoyo incondicional para la realización de los experimentos del trabajo de tesis dentro del laboratorio.

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, Dr. Rubén Darío Cadena Nava y Dr. Sergio A. Águila Puentes por su apoyo y consejo brindado durante el desarrollo de este proyecto.

Al personal académico del posgrado en Ciencias de la Vida y al grupo de bionanotecnología del CNyN de la UNAM por el conocimiento compartido dentro y fuera del laboratorio, pero sobre todo por contagiar su espíritu ávido de conocimiento.

A CONACYT por la beca otorgada durante la maestría.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	iii
Resumen en inglés	iv
Dedicatoria	vi
Agradecimientos	vii
Lista de Figuras	x
Lista de Tablas	xi
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 <i>Escherichia coli</i>	2
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).....	2
2.2 El sistema de secreción tipo 3 (SST3).....	4
2.3 Citocromo oxidasa P450.....	10
2.3.1 CYP450 BM3 variante 21B3.....	13
2.4 Expresión proteica en <i>Escherichia coli</i>	14
2.5 El SST3 como mecanismo de entrega de proteínas de interés terapéutico.....	15
3. Justificación e Hipótesis	17
3.1 Justificación.....	17
3.2 Hipótesis.....	17
4. Objetivos	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
5. Materiales y métodos	19
5.1 Diseño y expresión de la proteína quimérica EspF-CYPBM3.....	19
5.2 Expresión heteróloga de EspF-CYPBM3 en EPEC WT, <i>E. coli</i> DH5α y <i>E. coli</i> K12 MC4100.....	20
5.3 Expresión heteróloga del SST3 en <i>E. coli</i> comensal DH5α y MC4100.	20

Tabla de contenido (continuación)

	Página
5.4 Expresión heteróloga del SST3 y la proteína quimérica EspF-CYPBM3 en <i>E. coli</i> comensal MC4100.....	21
5.5 Ensayos de secreción.....	22
5.6 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	22
5.7 Evaluación de la actividad enzimática.....	22
5.8 Ensayos de infección de células epiteliales HeLa con la cepa MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3.....	23
6. Resultados	26
6.1 Expresión de proteína quimérica EspF-CYPBM3 en EPEC WT.....	26
6.2 Expresión heteróloga del SST3 y las proteínas quiméricas en <i>E. coli</i> comensal MC4100.....	27
6.3 Evaluación de la actividad enzimática.....	28
6.4 Ensayos de infección de células epiteliales HeLa con la cepa MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3.....	29
7. Discusión	31
8. Conclusiones	34
9. Perspectivas	35
Lista de referencias	36

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Etapas de la infección que provoca la lesión A/E de EPEC.....	3
2	Estructura del sistema de secreción tipo 3 (SST3) de <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	8
3	Sistema de Secreción Tipo III de EPEC. Microfotografía del SST3 de <i>Salmonella</i>	9
4	Organización genética de la isla de patogenicidad LEE.....	10
5	Espectro de absorción de CYP450 unido a monóxido de carbono.....	11
6	Sistemas P450 de óxido-reducción.....	13
7	Mapa del vector pCWOri donde se muestran los sitios de clonación de la secuencia que codifica para los 20 primeros aminoácidos del efector EspF de EPEC (azul), y la clonación en fase del gen que codifica para la CYPBM3 (morado). La expresión de estos genes fusionados dan como resultado la síntesis de la proteína quimérica EspF-CYPBM3.....	19
8	SDS-PAGE al 15% de expresión heteróloga de la proteína quimérica en EPEC WT.....	27
9	SDS-PAGE al 15% de expresión heteróloga de LEE y proteína quimérica.....	28
10	Actividad enzimática de proteína quimérica EspF-CYPBM3.....	29
11	Microscopía confocal de cultivos de células HeLa que muestran el aumento de la fluorescencia producido por la transformación del sustrato BFC mediado por la proteína quimérica EspF-CYPBM3 translocada eficientemente al interior celular mediante la infección con la cepa comensal MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3. x40.....	30

Lista de Tablas

Tabla		Pági
		na
1	Familias de inyectisomas.....	5

1. Introducción

Escherichia coli (*E. coli*) es la bacteria predominante en la flora intestinal del humano, es un organismo anaerobio facultativo capaz de sobrevivir en ambientes con baja concentración de oxígeno, tal y como se presenta dicha condición en el tracto gastrointestinal (Nataro y Kaper, 1998). *E. coli*, además de otros microorganismos como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Pseudomonas aeruginosa*, que pertenecen a la familia de las enterobacterias, logran alterar el metabolismo celular del organismo hospedero, causando entre otras cosas la remodelación del citoesqueleto de actina (Dacheux *et al.*, 2000). *E. coli* enteropatógena (EPEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, por sus siglas en inglés) y *Citrobacter rodentium* se caracterizan por provocar lesiones de adherencia y eliminación (A/E), en células del epitelio intestinal. Las lesiones A/E provocadas por EPEC que afectan a infantes menores de seis meses de edad en países en desarrollo (Clarke *et al.*, 2003), se presentan una vez que son remplazadas las microvellosidades de la superficie celular por estructuras en forma de pedestal que sostienen individualmente a cada bacteria. Las proteínas efectoras, que modifican el citoesqueleto de actina para formar la estructura en forma de pedestal en la célula del tejido epitelial, son inyectadas mediante una estructura multiproteica en forma de jeringa llamada Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3) (McDaniel y Kaper, 1997). El SST3 o “inyectisoma” es una estructura molecular conformada por varias proteínas que se extienden desde la bacteria patógena hasta el poro de translocación o “translocón”, por donde se inyectan las proteínas efectoras de EPEC que originan la virulencia bacteriana (Vidal *et al.*, 2007). El SST3 es un sistema que permite translocar proteínas directamente del citosol bacteriano hasta el citosol de la célula hospedera, lo que ha despertado gran interés para su utilización como vehículo de entrega dirigida de proteínas. En este trabajo se utilizó con éxito el SST3 de EPEC expresado heterológamente en *E. coli* MC4100 para la entrega de la proteína citocromo P450 BM3 obtenida de *Bacillus megaterium* en células HeLa. Nuestra meta es utilizar esta proteína como terapia anticancerígena dirigida a células de cáncer colorrectal. La estrategia propuesta anteriormente podría disminuir los efectos nocivos de las terapias anticancerígenas actuales al aumentar la eficiencia de transformación de pro-fármacos activados por esta enzima.

2. Antecedentes

2.1 *Escherichia coli*

La familia Enterobacteriaceae representada por bacterias anaerobias facultativas, posee más de 20 géneros bacterianos con más de 120 especies y miles de serotipos. *E. coli* es una bacteria Gram-negativa perteneciente a esta familia, coloniza el tracto gastrointestinal de niños neonatos al momento de ingerir su primer alimento, y además representa a la especie bacteriana intestinal más común (Molina, 2011). La colonización del intestino se mantiene controlada por el sistema inmune, por lo que la bacteria permanece en el lumen intestinal de manera comensal (Vidal, 2007). Sin embargo, variedades patógenas de *E. coli* son capaces de provocar diferentes enfermedades, como *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* de la meningitis neonatal (NMEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC) (Nataro y Kaper, 1998). EPEC es uno de los principales agentes causantes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo. La diarrea tipo acuoso, es una de las principales características de la infección y se puede presentar en diferentes grados de intensidad (Vidal, 2007; Monjarás-Feria *et al.* 2012).

2.1.1 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Escherichia coli enteropatógena se caracteriza por provocar una lesión de adherencia y eliminación, también conocida en inglés como attaching and effacing (A/E). La alteración histopatológica A/E provocada por EPEC en el intestino se realiza mediante la translocación de proteínas de virulencia que son transportadas a través del sistema de secreción que expresa este tipo de bacteria patógena. Las características de la lesión A/E son la eliminación de las microvellosidades, el re-arreglo de los filamentos de actina y la formación de estructuras tipo pedestal. La lesión A/E provocada por EPEC se logra mediante un proceso de infección que consiste en la adherencia no íntima (Figura 1A), etapa en la cual EPEC reconoce las microvellosidades de la célula epitelial mediante el Bundle Forming Pili (BFP) para permitir la autoagregación de microcolonias de EPEC sobre la superficie de la célula epitelial. La segunda etapa de infección

comienza con la eliminación de las microvellosidades, la activación del sistema de secreción y la ulterior translocación de proteínas efectoras al citoplasma de la célula hospedera (Figura 1 B). El contacto directo entre el SST3 de EPEC y la célula epitelial, es posible mediante el reconocimiento del alto nivel de colesterol ubicado en la superficie de la célula eucariota. El reconocimiento inicia el proceso de translocación de la primeras proteínas de virulencia, intimina y su receptor Tir. El receptor Tir al ser translocado al citosol de la célula hospedera, se ancla en la membrana del enterocito y funciona como receptor para la proteína intimina ubicada en la membrana externa de EPEC. Las proteínas de virulencia translocadas posteriormente, Map, EspF, EspB, EspH y EspZ, son algunos efectores responsables de afectar el metabolismo celular mediante la alteración de numerosas rutas de transducción de señales de la célula hospedera, las cuales provocan mal funcionamiento de la mitocondria, los transportadores de nutrientes y las uniones oclusivas. Las diversas alteraciones de las funciones celulares de la célula epitelial finalmente dan paso a la tercera etapa de la infección, la adherencia íntima (Figura 1 C). La adherencia íntima entre ambas células se logra mediante la estructura en forma de pedestal formada por la acumulación de filamentos de actina dentro de la célula hospedera. El pedestal mantiene unidos de manera estrecha (~10 nm) a EPEC y a su célula hospedera (Elliot *et al.*, 1995; Chen y Frankel, 2005; Garmendia *et al.*, 2005; Cornelis, 2006; Vidal, 2007).

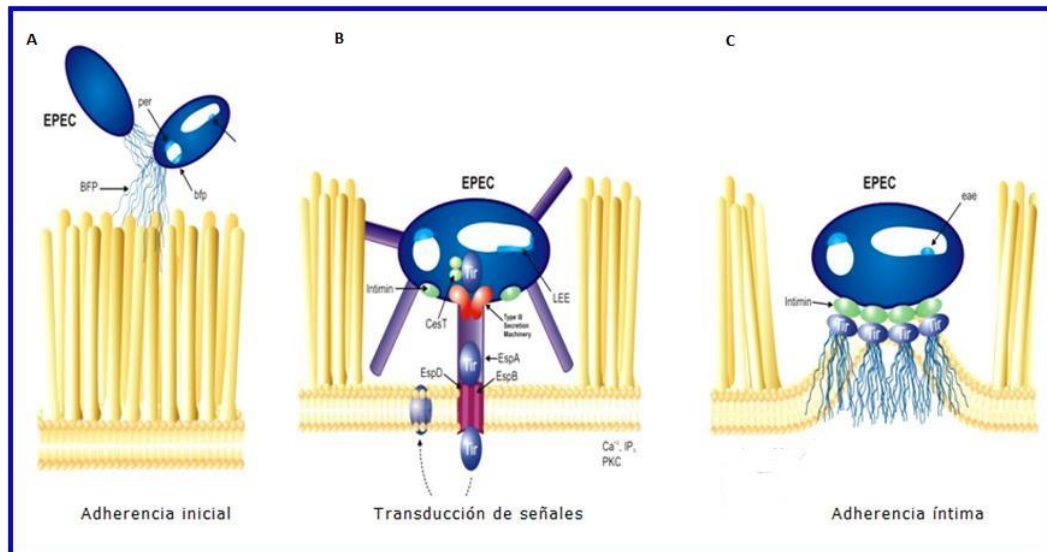


Figura 1. Etapas de la infección que provoca la lesión A/E de EPEC. (Strynadka, 2011). Modificado de <http://www.fernness.com/science-01.html>

2.2 El sistema de secreción tipo 3 (SST3)

Los sistemas de transporte de proteínas están presentes en todos los organismos vivos, ya sean vesículas de secreción especializadas presentes en células eucariotas o sistemas de secreción bacterianos. Las bacterias simbiotes patogénicas, comensales o mutualistas, utilizan estos sistemas para modular las interacciones existentes con el medio donde se encuentran presentes, ya sea para la adquisición de nutrientes, la expresión de factores de virulencia o para mantener su ciclo de vida (Thanassi y Hultgren, 2000; Tseng *et al.*, 2009). Las bacterias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes*, *Rhodococcus equi* y *Mycobacterium tuberculosis*, son un grupo que expresa un solo tipo de sistema de secreción específico, el Sistema de Secreción Tipo 7 (SST7) utilizado por algunas bacterias como *Staphylococcus aureus* para la virulencia (Tseng *et al.*, 2009). Las bacterias Gram-negativas, debido a la presencia de una doble membrana, necesitan transportar las moléculas que se encuentran en su interior mediante sistemas más complejos que permitan secretar eficientemente las moléculas producidas dentro de la bacteria al medio extracelular. Los sistemas de secreción conocidos en bacterias Gram-negativas exportan a las proteínas de dos formas diferentes. El primer mecanismo Sec-dependiente, realizado por los sistemas de secreción tipo 2, tipo 5 y tipo 7, en un primer paso reconoce una secuencia N-terminal hidrofóbica en la proteína por transportar para lograr exportarla al espacio periplasmático mediante la hidrólisis de ATP y posteriormente, en un segundo paso, a la membrana externa. El segundo mecanismo, capaz de exportar en un solo paso y de manera directa a la proteína del citoplasma bacteriano a la membrana externa, es realizado por los sistemas de secreción tipo 1, tipo 3, tipo 4 y tipo 6 (Saier, 2006; Tseng *et al.*, 2009).

El Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3) o “inyectisoma” es un componente macromolecular que no presenta similitudes genéticas a nivel de secuencia, pero en estructura y función se encuentra conservado en diferentes organismos como EPEC, *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella*, por mencionar algunos ejemplos. Los inyectisomas se dividen en siete familias que contienen diferentes especies bacterianas, algunas familias están limitadas a dos *phylum*, mientras que los inyectisomas de algunos

agentes patógenos de vida libre de animales abarcan 3 familias (Tabla 1). El SST3 de *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* pertenece a la familia Chlamydiales. El inyectisoma de la familia Rhizobiales es expresado por los simbioses de plantas *Mesorhizobium loti* y *Rhizobium* sp. Las familias de inyectisomas Hrp1 y Hrp2 están representadas en especies patógenas de plantas, sin embargo, también están presentes en agentes patógenos de humano *Vibrio parahaemolyticus* y *Xanthomonas campestris*. La familia de inyectisomas Ysc se presenta en agentes patógenos de animales, algunos ejemplos son *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bordetella pertussis*. La familia SPI-1 incluye los inyectisomas de *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* entre otras bacterias patógenas de humanos. La familia SPI-2 incluye al SST3 de EPEC y EHEC, además de *Yersinia pestis* y *Salmonella enterica* los cuales son algunos ejemplos de agentes patógenos capaces de expresar inyectisomas pertenecientes a diferentes familias (Cornelis, 2006; Mueller *et al.*, 2008).

Tabla 1. Familias de inyectisomas (Modificado de Cornelis, 2006).

Familia	Especie	Descripción
Chlamydiales	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Patógeno humano intracelular obligado (tracoma, infecciones genitales)
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Patógeno humano intracelular obligado (enfermedades respiratorias graves)
Rhizobiales	<i>Mesorhizobium loti</i>	Simbionte de planta (fijación de nitrógeno)
	<i>Rhizobium</i> sp	Simbionte de planta (fijación de nitrógeno)
Hrp1	<i>Pseudomonas syringae</i>	Patógeno de planta
	<i>Erwinia amylovora</i>	Patógeno de planta

	<i>Pantoea agglomerans</i>	Comensal humano y ambiental, rara vez patogénico
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Patógeno humano (gastroenteritis transmitida por mariscos)
Hrp2	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Patógeno humano (meloidosis)
	<i>Rasltonia solanacearum</i>	Patogéno de planta
	<i>Xanthomonascampestris</i>	Patógeno de planta
Ysc	<i>Yersinia pestis</i>	Patógeno humano y roedor (plaga)
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Patógeno humano y roedor
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Patógeno humano (gastroenteritis, adenitis mesentérica)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Patógeno humano, animal e insecto (fibrosis quística en pacientes quemados o inmunodeprimidos)
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Patógeno de pez
	<i>Photorhabdus luminescens</i>	Mutualista con nematodos entomófagos
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Patógeno humano (gastroenteritis transmitida por mariscos)
	<i>Bordetella pertussis</i>	Patógeno humano (tos ferina)
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Bacteria reductora de sulfato

SPI-1	<i>Salmonella entérica</i>	Patógeno humano (gastroenteritis)
	<i>Shigella flexneri</i>	Patógeno humano (disentería)
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Patógeno humano (meloidosis)
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Patógeno humano emergente (provoca meloidosis)
	<i>Yersinia enterolitica</i>	Patógeno humano (gastroenteritis, adenitis mesentérica)
	<i>Sodalis glossinidius</i>	Simbionte de la mosca Tse-tse
SPI-2	<i>Escherichia coli EPEC</i>	Patógeno humano (gastroenteritis)
	<i>Escherichia coli EHEC</i>	Patógeno humano (uremia, hemolisis)
	<i>Salmonella enterica</i>	Patógeno humano (gastroenteritis)
	<i>Citrobacter rodentium</i>	Patógeno de ratón
	<i>Chromobacter violaceum</i>	Patógeno humano emergente (meloidosis)
	<i>Yersinia pestis</i>	Patógeno de humano y roedor (plaga)
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Patógeno de humano y roedor
	<i>Edwardsiella tarda</i>	Patógeno humano (gastroenteritis)

El inyectisoma de EPEC es un complejo multiproteico de una longitud que sobrepasa los 600 nm con un diámetro externo de aproximadamente 10 nm. Las proteínas que conforman este sistema de secreción son al menos 20 proteínas diferentes, las cuales le permiten a EPEC translocar directamente al citoplasma de la célula hospedera moléculas efectoras específicas con el fin de ejercer una gama amplia de funciones de virulencia (Halim-Hegazy *et al.*, 2012). El proceso por el cual se forma el SST3 comienza cuando la bacteria reconoce el estímulo externo correcto al encontrarse en el nicho fisiológico idóneo, esto ocurre cuando la bacteria reconoce a la célula epitelial mediante el Bundle Forming Pili (BFP) (Bockler *et al.*, 2008). La primera parte del SST3 en formarse es la estructura basal (figura 2), la cual está constituida por las proteínas EscR, -S, -T, -U y -V que se encuentran ancladas en la membrana interna (MI), la proteína transmembranal EscC ubicada en la membrana externa (ME) y la lipoproteína EscJ. Las proteínas que forman la base de la estructura comunican directamente el citosol bacteriano con el medio extracelular, por lo que las moléculas secretadas no tienen contacto con el periplasma bacteriano (Vidal, 2007).

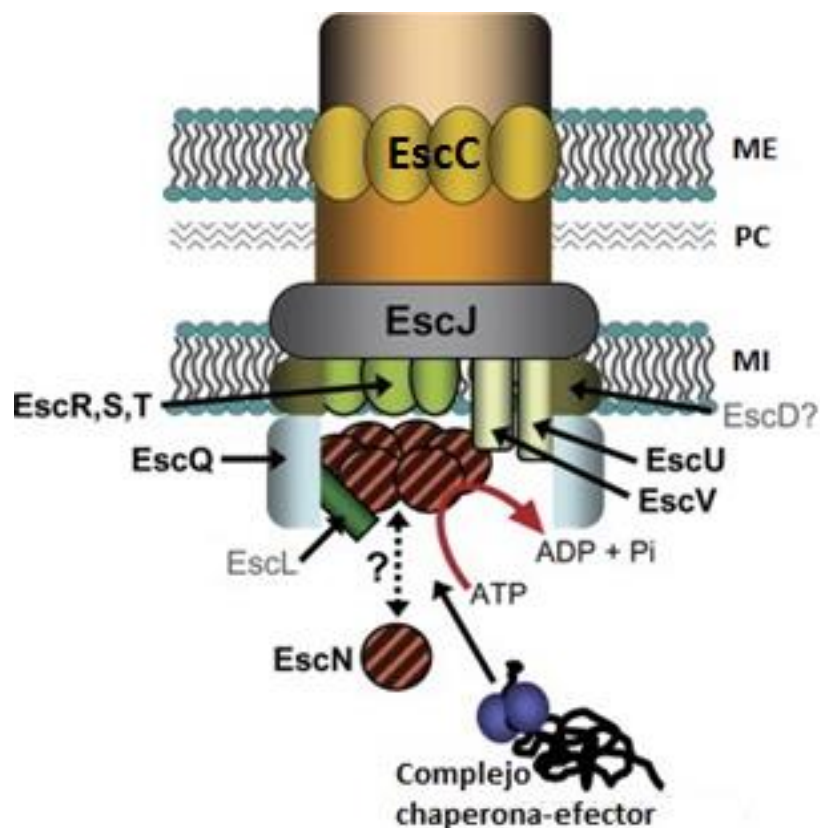


Figura 2. Estructura del sistema de secreción tipo 3 (SST3) de *E. coli* enteropatógena (EPEC). (Modificado de Andrade *et al.*, 2007).

Posteriormente, la proteína EscF pasa a través de la base de la estructura recién ensamblada por medio de la energía provista por la ATP-asa EscN, para ubicarse en el neo-extremo del SST3 y permitir el paso de EspA y su posterior polimerización en el espacio extracelular. Las últimas proteínas que conforman el inyectisoma, EspB y EspD, se encuentran en la punta de este complejo macromolecular. La proteína hidrofílica EspA, que se localiza en la punta del inyectisoma, sirve como plataforma para que las proteínas hidrofóbicas EspD y EspB se inserten en la membrana de la célula hospedera y así formar el poro de translocación o “translocón” (Figura 3). La estimación de 8 nm del diámetro interno del translocón mediante microscopía de fuerza atómica puede presentar cierta discrepancia al ser comparado con mediciones realizadas con experimentos de osmoprotección, ya que se ha determinado mediante este último método que el diámetro interno puede medir de 3 a 5 nm. La discordancia en el diámetro puede deberse a la forma de embudo que presenta el translocón, el cual se estrecha hacia el interior de la membrana de la célula epitelial (Cornelis, 2006; Mueller *et al.*, 2008).

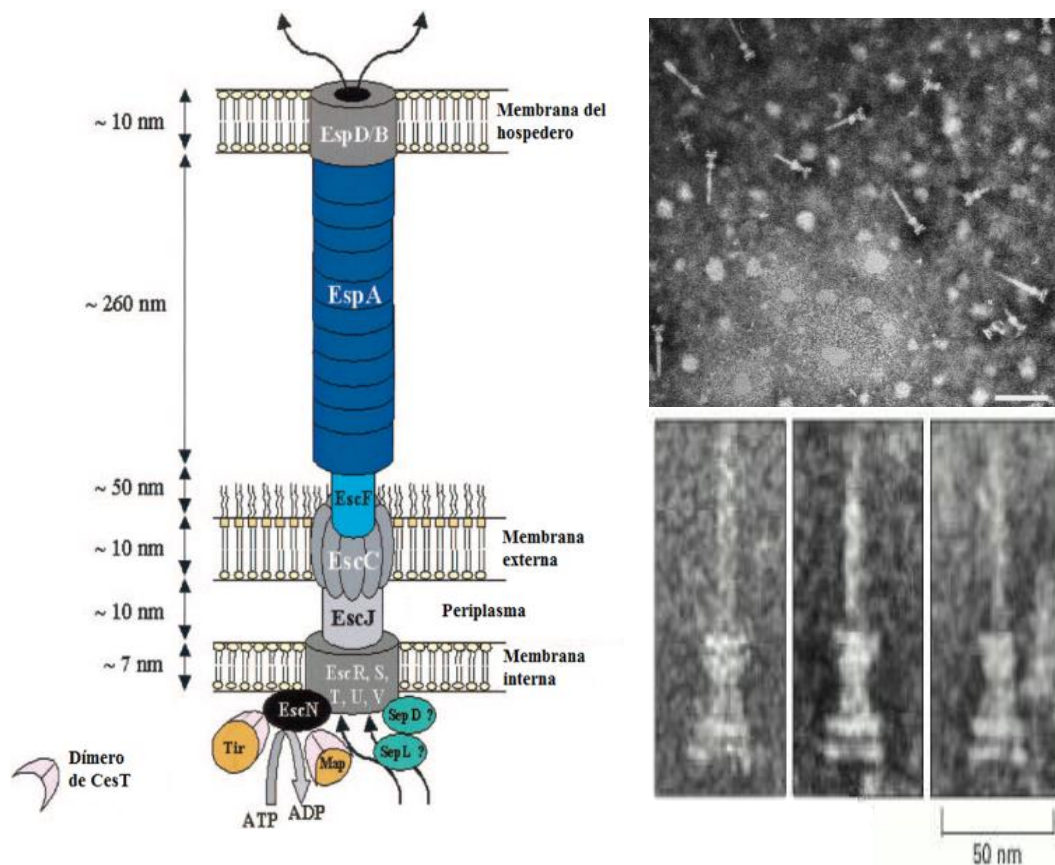


Figura 3. Sistema de Secreción Tipo 3 de EPEC (izq.) (Andrade *et al.*, 2007). Microfotografías del SST3 de *Salmonella* (der.) (Tamano *et al.*, 2002).

Culminado el proceso de construcción del SST3 mediante la inserción transmembranal del poro de translocación, las múltiples proteínas de virulencia de EPEC son secretadas a través del inyectisoma para dar comienzo al proceso de infección y provocar la lesión A/E. Las proteínas que conforman el SST3 y las proteínas efectoras que pasan a través de este complejo multiproteico, se encuentran codificadas en los genes contenidos en el Locus Enterocyte Effacement (LEE) (Figura 4). La isla de patogenicidad LEE de 35 kb contiene a las proteínas de virulencia en cinco operones policistrónicos que se dividen en tres dominios de virulencia: el primer dominio consta de los operones LEE1, LEE2 y LEE3 los cuales contienen los genes que codifican para las proteínas del SST3; el operón LEE4, el segundo dominio, posee los genes codificantes de la proteínas translocadoras y efectoras; el último dominio representado por LEE5, tiene los genes que codifican para la proteína íntima y a su proteína receptora Tir (Vidal *et al.*, 2007).

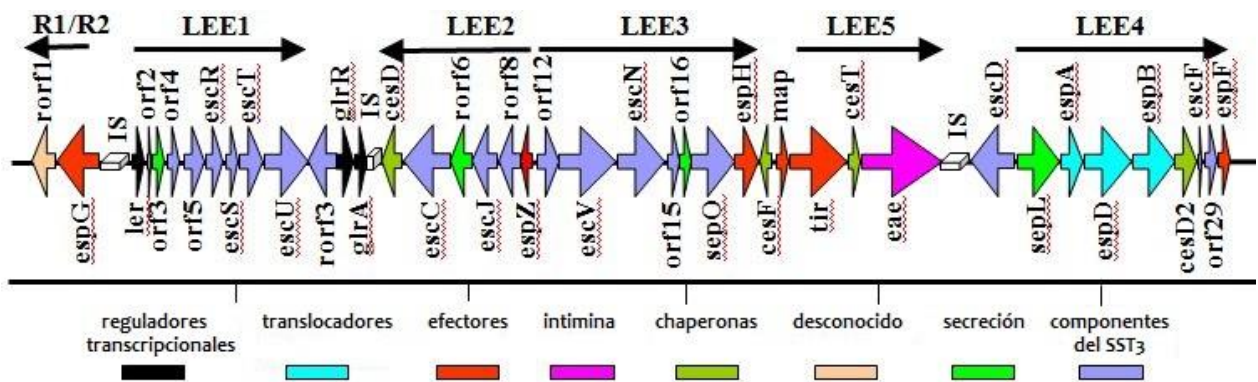


Figura 4. Organización genética de la isla de patogenicidad LEE. (Modificado de Dean *et al.*, 2005).

2.3 Citocromo oxidasa P450

La superfamilia citocromo P450 designada así por las propiedades espectroscópicas del pigmento que contienen el cual absorbe a una longitud de onda a los 450 nanómetros contiene a las enzimas hemotiolato oxigenasas. Las P450 clasificadas como CYP450 según el criterio filogenético basado en la secuencia aminoacídica de la cadena polipeptídica enzimática, identifica a las citocromo con las siglas CYP, seguido del número que designa a la familia, la letra que identifica a la subfamilia y finalmente el número que corresponde con el gen, por ejemplo la CYP450 BM3 proveniente de *Bacillus megaterium* (Gallego-Fernández, 2011). La estructura de estas hemoproteínas tiene un grupo prostético (protoporfirina IX) unido a cuatro átomos de nitrógeno

pirrólicos del anillo de porfirina, dos ligandos axiales y sitios de unión para el sustrato y oxígeno. La enzima P450 está conformada por 12 hélices alfa y dos láminas beta que rodean a la región hemo altamente conservada, mientras que las regiones variables permiten el anclaje a la membrana además del reconocimiento y unión a sustratos (Devlin, 2006; Gallego-Fernández, 2011). El espectro de absorción característico de 450 nm que presentan los CYP450 mostrado en la Figura 5, se obtiene por la presencia de un agente reductor que se une fuertemente al hierro de la hemoproteína (Orellana y Guajardo, 2004; Devlin, 2006). La reacción general catalizada por un P450 se muestra en la fórmula (1) donde el sustrato (S) representa un fármaco u otro compuesto químico que contiene como sustituyente un alcano, alqueno, anillo aromático o anillo heterocíclico que sirve como sitio para la oxigenación que es activada por un ciclo catalítico que consume NAD(P)H (Devlin, 2006; Vidal-Limón *et al.*, 2013). La “peroxide shunt pathway” es una ruta catalítica menos eficiente que no utiliza proteínas donadoras de electrones como el NAD(P)H e interviene como mecanismo alternativo de monooxigenación realizado por el P450 (Vidal-Limón *et al.*, 2013).

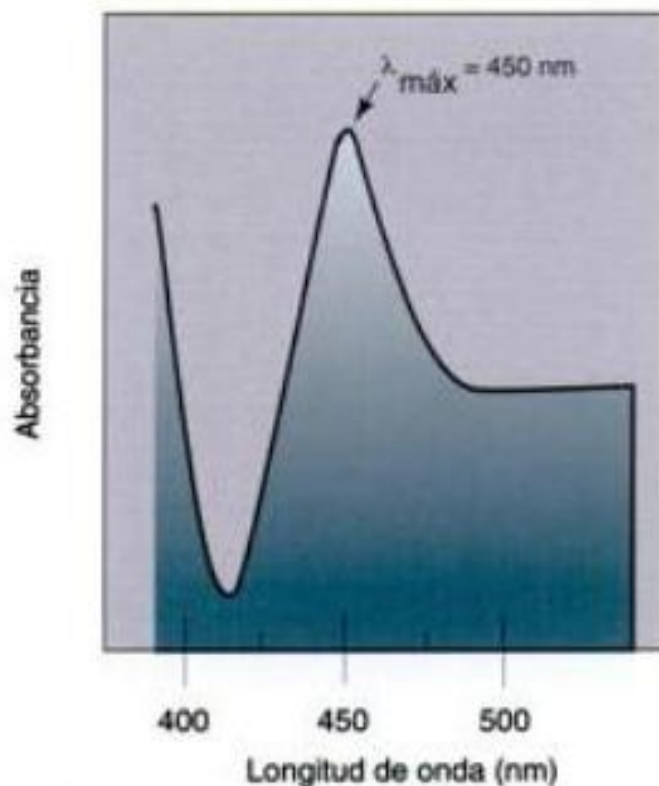


Figura 5. Espectro de absorción de CYP450 unido a monóxido de carbono. (Devlin, 2006).



La CYP450 está distribuida ampliamente en animales, plantas y microorganismos donde primordialmente cataliza la hidroxilación (monooxigenación) de alta especificidad de compuestos endógenos, así como la metabolización minoritariamente específica de compuestos exógenos. Participa en un gran número de reacciones de activación dioxigénicas como la hidroxilación de alcanos, la epoxidación de olefinas, la conversión de moléculas aromáticas a fenoles y la conversión de sulfuros a sulfóxidos o sulfonas (Guengerich, 2001; Donato, 2004; Yun *et al.*, 2007; Di Nardo y Gilardi, 2012; Vidal-Limón *et al.*, 2013). Los sistemas P450 se dividen en dos clases de acuerdo a su compañero óxido-reductor. La clase I en su mayoría P450 bacterianos obtienen los electrones de la ferredoxina (FD) aportados por el NAD(P)H de membrana dependiente de ferredoxina reductasa (FDR). El sistema P450 clase II microsomal, obtiene los electrones del flavín adenin dinucleótido (FAD) y la flavín mononucleótido que contiene NAD(P)H cP450 reductasa (CPR) (Figura 6) (Munro *et al.*, 2002). Los CYP450 llevan a cabo en el humano la oxidación de moléculas endógenas como el colesterol y prostaciclina, además de ser parte central del metabolismo oxidante de xenobióticos y fármacos utilizados en terapias anticancerígenas (Murray, 2000; Young-Jin y Sanghee, 2003). El sistema P450 del humano se encuentra mayormente expresado en el hígado y el intestino, está asociado a la membrana mitocondrial y al retículo endoplásmico, consta de 57 genes y está conformado por la citocromo P450 y la citocromo reductasa P450 que permite la transferencia de electrones del NAD(P)H al cofactor del P450 (Danielson, 2002; Nebert y Russell, 2002; Orellana y Guajardo, 2004; Di Nardo y Gilardi, 2012).

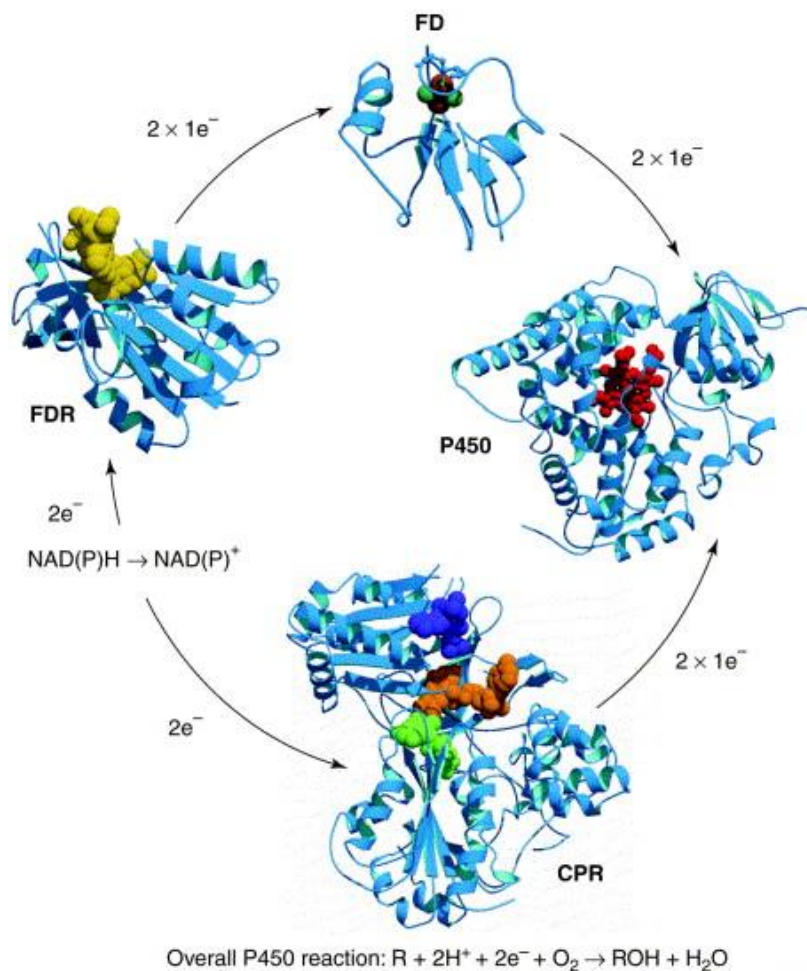


Figura 6. Sistemas P450 de óxido-reducción. (Munro *et al.*, 2002).

2.3.1 CYP450 BM3 variante 21B3

Los sistemas P450 bacterianos presentan una actividad catalítica mayor a los P450 de organismos eucariotas, además de presentar un alto nivel de expresión y solubilidad en hospederos heterólogos (Munro *et al.*, 2002; Vanina, 2012). El flavocitocromo P450 BM3 de *Bacillus megaterium* es una enzima bacteriana soluble considerada como un buen candidato para ser utilizado como biocatalizador en la biotecnología, debido a que puede ser expresada fácilmente en *E. coli*, posee la actividad catalítica más alta determinada para una monooxigenasa y tiene gran similitud con miembros de la familia CYP4A eucariota (Munro *et al.*, 2002; Lussenburg *et al.*, 2005; Damsten *et al.*, 2008; Vanina, 2012). El sistema P450 BM3 también conocido como CYP102A1, es un sistema que está mayormente relacionado en secuencia, estructura, actividad y pareja óxido-

reductora con los sistemas microsomales clase I presentes en organismos bacterianos, además como característica única, mantiene en una cadena polipeptídica sencilla a la diflavin P450 reductasa unida al C-terminal de un péptido de 119 kDa del dominio hemo, lo que le permite ser una enzima catalíticamente autosuficiente (Munro, 2002; Poulos y Johnson, 2005). La CYP102A1 utiliza el sistema de óxido–reducción de mamífero (clase II) mediante el cual obtiene los electrones a partir de la transferencia electrónica mediada por la flavín adenin dinucleótido (FAD) y la flavín mononucleótido (FMN) que contienen NAD(P)H y la P450 reductasa (De Mot y Parret, 2002; Munro *et al.*, 2002).

La variante 21B3, nombrada así por Salazar *et al.* (2003), es una enzima obtenida a partir de la CYP450 BM3 que ha sido modificada mediante métodos de evolución dirigida para mejorar su capacidad termoestable y conservar gran parte de su actividad peroxigenasa en comparación a la CYP450 BM3 WT, lo que le permite catalizar biotransformaciones bajo condiciones de reacción muy simples al utilizar solamente el dominio hemo competente para catálisis y peróxido de hidrógeno como sustratos. La finalidad de utilizar esta variante de la CYP450 BM3 en terapias anticancerígenas, es obtener la mayor eficiencia posible para catalizar la biotransformación de pro-fármacos anticancerígenos al tomar como ventaja su fácil expresión en *Escherichia coli*, la mayor actividad catalítica monooxigenasa que presenta, las similitudes con la CYP4A eucariota y las modificaciones de sustitución aminoacídica que mejoran su termoestabilidad.

2.4 Expresión proteica en *Escherichia coli*

La necesidad de sintetizar proteínas recombinantes terapéuticas, vacunales o de diagnóstico a nivel industrial como la insulina, producida en *E. coli* en 1978 por Genentech, requieren de herramientas biotecnológicas que permitan la obtención de un producto de calidad que no presente algún riesgo para la salud del humano (Lara, 2011; García *et al.*, 2013). La información genética de la proteína de interés que se necesita producir debe ser insertada en un vector eficiente que proporcione el mayor rendimiento proteico posible al obtener un mayor número de copias, además de no presentar o

carecer de limitaciones en la expresión de la proteína recombinante como la formación de cuerpos de inclusión que requieran procesos posteriores de purificación y plegamiento de la proteína recombinante. El promotor, el gen de resistencia a antibiótico y las modificaciones a las que han sido sometidos los sistemas de expresión, son algunas de las características que se deben tomar en cuenta para obtener la expresión deseada de la proteína recombinante (Lara, 2011).

Los sistemas de expresión son elaborados con mutaciones específicas para diferentes propósitos que brindan el mayor número de ventajas posible durante su empleo. El uso de diferentes sistemas de expresión como levaduras, bacterias, plantas y células de diferentes organismos, permite obtener el rendimiento y las características proteicas deseadas. La caracterización genética y fisiología de *Escherichia coli* ha influido considerablemente en su utilización en la industria biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes. Las ventajas que ofrece *E. coli* como hospedero del vector de expresión, como la estabilidad del vector de expresión, la eficiencia transcripcional y traduccional, la estabilidad de las moléculas ante el ambiente proteolítico del hospedero, por mencionar algunos ejemplos, además de las diferentes modificaciones genéticas a las que ha sido sometida, como la delección de los genes *lonA* y *ompT*, los cuales favorecen la degradación proteolítica de los productos recombinantes, le confieren ciertas ventajas en su utilización en la industria biotecnológica (García *et al.*, 2013). La cepas MC4100 y DH5 α de *E. coli* con genotipo [F⁻ (*araD139*) Δ (*argF-lac*)169 λ ⁻ e14⁻ *flhD5301* Δ (*fruK-yeiR*)725(*fruA25*) *relA1 rpsL150* (Str^r) *rbsR22* Δ (*fimB-fimE*)632(:!S1) *deoC1*] y F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 gyrA95 deoR nupG 80dlacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYA-argF*)U169 *hsdR17*(*rK-mK+*) λ ⁻ respectivamente, son los organismos hospederos de los vectores de clonación utilizados en este trabajo para la expresión heteróloga de la proteína recombinante EspF-CYPBM3 y del SST3 de EPEC .

2.5 El SST3 como mecanismo de entrega de proteínas de interés terapéutico

Los SST3 de *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium* han sido utilizados con éxito como mecanismos capaces de translocar antígenos dentro de células de

mamíferos (Epaulard *et al.*, 2006; Russman *et al.*, 1998). Además, con el inyectisoma de *E. coli* se ha logrado la entrega de anticuerpos al interior de la célula eucarionte para la inactivación de proteínas blanco (Blanco-Toribio *et al.*, 2010). La utilización del SST3 como mecanismo de entrega proteica presenta algunas limitaciones: como la reversión intrínseca bacteriana de cepas atenuadas a virulentas; las modificaciones estructurales del citoesqueleto y de las vías de señalización de la célula huésped, alteradas por las proteínas efectoras empleadas como sustrato del SST3; respuesta inmunológica ante bacterias, lo que limita su utilización a largo plazo; además del control limitado sobre algunas cepas bacterianas como *S. typhimurium*, ya que tiene la capacidad de internalizarse en el organismo.

La expresión heteróloga del SST3 en una cepa inocua de *E. coli* (DH5 α) realizada en 1997 por McDaniel y Kaper, con el cósmido pCDV462 que contiene toda la secuencia de LEE, demostró la síntesis de un inyectisoma funcional capaz de infectar células epiteliales en cultivo, sin embargo, la translocación de las proteínas efectoras (EspF, EspG, EspH, SepZ Map y Tir) codificadas en la isla LEE se presentó de manera ineficiente. A partir de una expresión heteróloga exitosa de LEE en una bacteria comensal podremos utilizar este sistema para la entrega de proteínas de interés terapéutico mediante la utilización de cepas comensales, no patógenas. Además, se pueden construir proteínas quiméricas de interés terapéutico que sean reconocidas por el SST3 mediante la adición de un péptido señal proveniente de EspF (proteína efectora de EPEC), para su translocación directa a células hospederas. La utilización de la expresión heteróloga, tanto de LEE como de la proteína quimérica en una cepa inocua, brindará la posibilidad de enviar proteínas anti cancerígenas como la CYPBM3 21B3 para eliminar células cancerosas, particularmente de cáncer de colon.

3. Justificación e Hipótesis

3.1 Justificación

El uso de bacterias patógenas atenuadas para la entrega de proteínas de interés terapéutico muestra resultados alentadores, pero no excluye la posibilidad de reversión de las variedades bacterianas a su carácter patogénico. El presente trabajo pretende tomar ventaja de utilizar el SST3 expresado en una cepa inocua para la entrega de proteínas terapéuticas para reducir el riesgo potencial del uso de bacterias patógenas. Mediante la expresión heteróloga de LEE de EPEC en cepas comensales de *E. coli*, así como la construcción de proteínas quiméricas que puedan ser reconocidas como sustrato del SST3 para su secreción, permitirá su uso en terapias dirigidas a combatir el cáncer de colon.

3.2 Hipótesis

La expresión heteróloga del Sistema de Secreción Tipo 3 y de la proteína quimérica EspF-CYPBM3 en la cepa comensal de *E. coli* MC4100, permitirá la translocación eficiente de esta proteína quimérica funcional a cultivos de células epiteliales.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Utilizar el Sistema de Secreción Tipo 3 de EPEC como vector de translocación de sustratos con fines terapéuticos.

4.2 Objetivos particulares

1. Expresión heteróloga del LEE de EPEC en *E. coli* comensal.
2. Construcción de proteínas quiméricas (EspF-CYPBM3) competentes para la secreción a través del SST3 de EPEC.
3. Co-expresión del SST3 y de proteínas quiméricas en *E. coli* comensal.
4. Evaluación *in vitro* de la secreción de las proteínas quiméricas.
5. Evaluación *in vivo* de la translocación de las proteínas quiméricas en cultivo de células epiteliales.
6. Evaluación funcional de la proteína quimérica.
 - 6.1) Evaluación de actividad enzimática.
 - 6.2) Evaluación de la translocación de la proteína quimérica a células cancerosas en cultivo.

5. Materiales y métodos

5.1 Diseño y expresión de la proteína quimérica EspF-CYPBM3

El vector de expresión pCWOri (Addgene) se utilizó para clonar la secuencia nucleotídica que codifica para los primeros 20 aminoácidos del efector de EPEC EspF que contiene la señal para la secreción vía SST3 (Blanco-Toribio *et al.*, 2010). Hacia el extremo 3' de la secuencia señal, se incluyó un sitio de restricción *NdeI*, y otro adyacente *EcoRI*. Dichos sitios fueron utilizados para la clonación en fase de secuencias de genes que codifican para la proteína de interés terapéutico, en este caso la CYPBM3 (Figura 7). La construcción se secuenció y la producción de proteínas quiméricas se evaluó mediante ensayos de sobre expresión y SDS-PAGE.

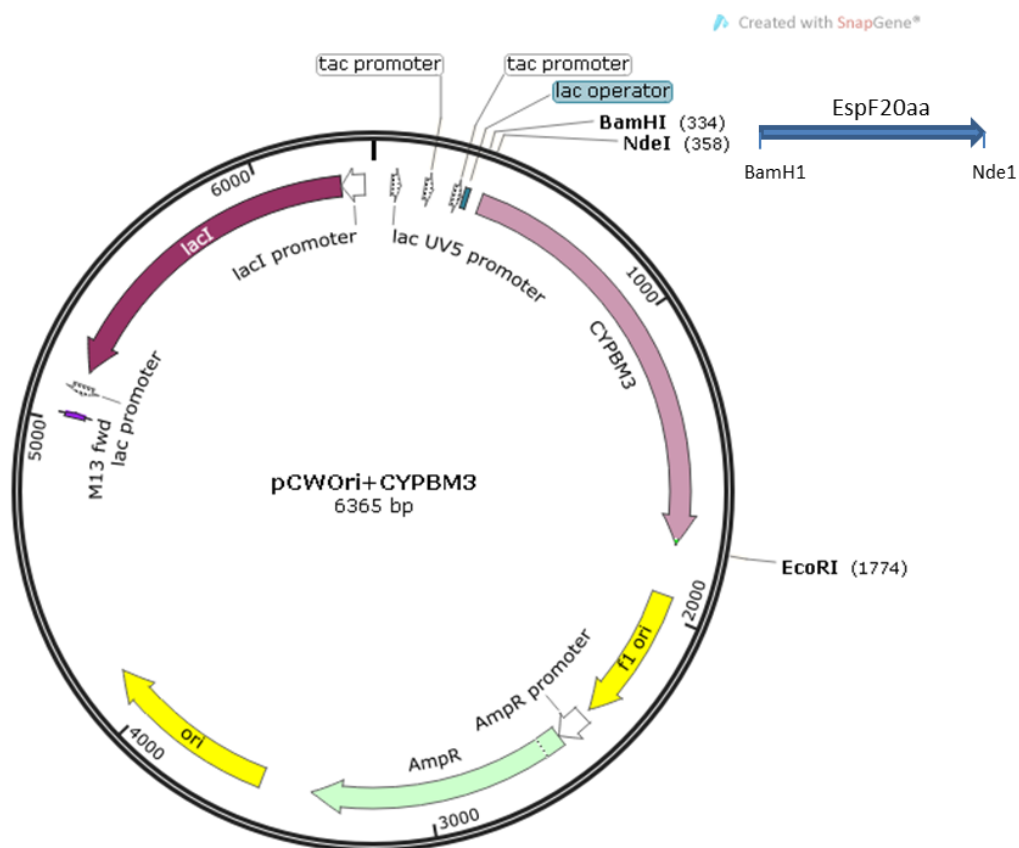


Figura 7. Mapa del vector pCWOri donde se muestran los sitios de clonación de la secuencia que codifica para los 20 primeros aminoácidos del efector EspF de EPEC (azul), y la clonación en fase del gen que codifica para la CYPBM3 (morado). La expresión de estos genes fusionados da como resultado la síntesis de la proteína quimérica EspF-CYPBM3.

5.2 Expresión heteróloga de EspF-CYPBM3 en EPEC WT, *E. coli* DH5α y *E. coli* K12 MC4100

La expresión de EspF-CYPBM3 se logró mediante la previa preparación de células competentes de EPEC WT, DH5α y MC4100. Las células competentes se obtuvieron de tres cultivos, cada uno correspondiente a EPEC WT, DH5α y MC4100, con 10 mL de medio Luria- Bertani (LB), 10 μL de Estreptomicina (Sm) 100mg/mL y 100 μL la cepa de interés. Después de incubar cada cultivo durante de 2 horas a una temperatura de 37 °C y con agitación constante de 200 rpm, los cultivos se redistribuyeron en tubos de reacción para su posterior centrifugación a 10k rpm durante dos minutos. Las pastillas celulares obtenidas tras la centrifugación y decantación del medio, se lavaron tres veces con 1.5 mL de glicerol al 10% estéril y posteriormente fueron resuspendidas con 200 μL de glicerol al 10%. Posteriormente se adicionaron 5 μL del plásmido pCWOri-EspFCYPBM3 y 80 μL de la pastilla resuspendida a una celda de electroporación para dar paso a la electroporación a 2500 volts. La cepas electroporadas se resuspendieron en un tubo de reacción con 1 mL de LB para mantenerlas en agitación constante durante una hora a 37 °C. Luego de la agitación, nuevamente se centrifugaron a 10k rpm durante dos minutos y se decantó el contenido hasta dejar ~50 μL de cada transformante. Las alícuotas obtenidas finalmente se sembraron “overnight” en LB sólido con Sm y Ampicilina (Amp) 200 mg/mL. Finalmente las cepas transformantes del medio LB sólido fueron sembradas en 5 mL de LB líquido con las concentraciones antes mencionadas de Sm y Amp. La expresión heteróloga de la proteína en EPEC WT, DH5α y MC4100 se evaluó mediante la inducción de la expresión de la proteína y su posterior visualización con SDS-PAGE.

5.3 Expresión heteróloga del SST3 en *E. coli* comensal DH5α y MC4100

La expresión de LEE en DH5α y MC4100 se desarrolló mediante la preparación de células competentes de DH5α y MC4100. El cultivo correspondiente a cada cepa contenían 10 mL de medio Luria- Bertani (LB), 10 μL de Estreptomicina (Sm) 100mg/mL y 100 μL la cepa de interés. Después incubar cada cultivo durante 2 horas a una

temperatura de 37 °C y con agitación constante de 200 rpm, los cultivos se redistribuyeron en tubos de reacción para su posterior centrifugación a 10k rpm durante dos minutos. Las pastillas obtenidas tras la centrifugación y decantación del medio se lavaron tres veces con glicerol estéril al 10% y fueron resuspendidas con 200 µL de glicerol al 10%. Posteriormente se adicionaron 5 µL del plásmido pCDV462 que contiene la secuencia del LEE y 80 µL de la pastilla resuspendida a una celda de electroporación para dar paso a la electroporación a 2500 volts. Las cepas electroporadas se resuspendieron en un tubo de reacción con 1 mL de LB para mantenerlas en agitación constante durante una hora a 37 °C. Luego de la agitación, nuevamente se centrifugaron a 10k rpm durante dos minutos y se decantó el contenido hasta dejar ~50 µL de cada transformante. Las alícuotas obtenidas finalmente se sembraron “overnight” en LB sólido con Cloranfenicol (Cm) 34 mg/mL. Finalmente las cepas transformantes del medio LB sólido fueron sembradas en 5 mL de LB líquido con Cm con la concentración antes mencionada. La expresión heteróloga de LEE en DH5α y MC4100 se evaluó mediante la obtención de proteínas secretadas al medio de cultivo, las cuales fueron concentradas y corridas en SDS-PAGE para su posterior caracterización.

5.4 Expresión heteróloga del SST3 y la proteína quimérica EspF-CYPBM3 en *E. coli* comensal MC4100

Las células competentes se prepararon de acuerdo al protocolo anteriormente mencionado para la expresión de la proteína quimérica EspF-CYPBM3 en EPEC WT y la expresión del SST3 en las cepas comensales DH5α y MC4100. Finalmente el protocolo se repitió para poder introducir el plásmido pCWOri-EspFCYPBM3 mediante electroporación. El medio de selección final contenía Cm y Amp a concentraciones de 34 y 200 mg/mL respectivamente. La expresión heteróloga de LEE y la proteína quimérica en MC4100 se evaluó mediante SDS-PAGE. Los controles utilizados se obtuvieron mediante la transformación de MC4100 con el plásmido que contiene la isla LEE y con la transformación de MC4100 con el plásmido que contiene el gen de la proteína quimérica.

5.5 Ensayos de secreción

La funcionalidad de secreción proteica de las cepas que expresan la isla de patogenicidad LEE y la proteína quimérica EspF-CYPBM3 se analizó en cultivos bacterianos realizados en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Deng *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2005). El perfil de secreción de las cepas que contienen el plásmido que codifica para la isla LEE se analizó mediante el cultivo de las bacterias en DMEM durante 6 horas a 37 °C con agitación con el inductor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), no hidrolizable por la β -galactosidasa, a una concentración de 0.05 mM, el cual permite la expresión de los genes regulados por el promotor *lac*. Posteriormente se centrifugó el medio de cultivo y a partir del sobrenadante, las proteínas secretadas fueron precipitadas con ácido tricloroacético al 10 % toda la noche a 4 °C. Las proteínas precipitadas se concentraron por centrifugación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 10 μ L de amortiguador SDS-PAGE 2X y 3 μ L de Tris básico (pH11) saturado para neutralizar los residuos de ácido tricloroacético. Las proteínas secretadas se analizaron por SDS-PAGE al 15%.

5.6 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

El análisis de las proteínas recombinantes se realizó en geles de poliacrilamida al 15 % con la metodología descrita por Laemmli (1970). La electroforesis se realizó con un amperaje constante de 20 mA, durante 2 horas. Los geles se tiñeron con agitación constante en azul de Coomassie con una temperatura de 30 °C durante 20 minutos. Finalmente los geles se destiñeron empleando una solución de metanol al 40 % y ácido acético glacial al 10 % para posteriormente visualizar los geles en transiluminador.

5.7 Evaluación de la actividad enzimática

La actividad enzimática de la proteína quimérica se realizó después de obtener las muestras provenientes de los sobrenadantes de los medios de cultivo DMEM. Los 20 mL de DMEM fueron adicionados con piridoxal, LB líquido pH 7.5, IPTG 0.05 mM y

ácido- δ -aminolevulínico (δ -ALA) 1 mM e inoculados con 400 μ L de cepa bacteriana. Los sobrenadantes se obtuvieron mediante centrifugación (13k rpm durante 10 minutos) al finalizar las 6 horas de incubación con temperatura de 37 °C y agitación constante de 200 rpm. Los sobrenadantes de las cepas cultivadas para la evaluación enzimática fueron EPEC/pEspF-CYPBM3, MC4100/pLEE, MC4100/pEspF-CYPBM3 y MC4100/pLEE/ pEspF-CYPBM3.

La medición de la actividad enzimática se monitoreó mediante el espectrofotómetro de Agilent Technologies modelo Cary 60 UV/Vis a una longitud de onda de 480 nm en un ensayo con tiempo de duración de 10 minutos para cada muestra. El sustrato utilizado como aceptor de electrones fue el 2-6 dimetoxifenol (DMF) de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO) a una concentración de 50 mM, como donador de electrones peróxido (H_2O_2) 6mM y el buffer utilizado Tris HCl 50 mM pH 8.0. El volumen total de la muestra sometida a la medición con el espectrofotómetro fue de 1 mL, por lo que las alícuotas de cada reactivo fueron de 890 μ L del buffer, 10 μ L de DMF y 5 μ L de H_2O_2 , mientras que el volumen de la muestra del sobrenadante empleado fue de 100 μ L. El blanco utilizado prescindió del sustrato, por lo que se preparó con Tris HCl pH 8.0 a la misma concentración pero con un volumen de 900 μ L, 5 μ L de H_2O_2 6mM y 100 μ L de la muestra que contiene a la enzima.

5.8 Ensayos de infección de células epiteliales HeLa con la cepa MC4100/pLEE/pEspFCYP-BM3

Los ensayos de infección bacteriana sobre células HeLa se llevaron a cabo para determinar si la proteína EspF-CYPBM3 es translocada al interior de las células epiteliales a través del SST3. La translocación eficiente y la actividad enzimática de la proteína se determinó mediante la infección de células HeLa con la bacteria comensal MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3 con inductor (IPTG 50 μ M) y con el sustrato fluorescente 7-benziloxi-4-trifluorometilcoumarin (BFC) el cual es excitado en la longitud del verde fluorescente a los 395 nm y emite a los 509 nm. Las monocapas celulares de adenocarcinoma de cérvix HeLa se emplearon para su infección con bacterias

comensales de *E. coli* (MC4100) transformadas con el plásmido que contiene la isla de patogenicidad LEE (pLEE) y el plásmido de la proteína quimérica (pEspF-CYPBM3). Los tres cultivos celulares utilizados como controles fueron la línea celular HeLa sin infección, células HeLa con el sustrato fluorescente BFC y células HeLa con BFC infectada con la bacteria comensal MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3 sin el inductor IPTG (no produce la proteína quimérica).

Las alícuotas de la cepa utilizada para el ensayo se obtuvieron a partir de medios cultivo "overnight" LB de 10 mL con antibiótico. Los antibióticos correspondientes fueron Cm 34 mg/mL y Amp 200 mg/mL para MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3. Los cultivos "over-night" LB, se centrifugaron durante 10 minutos a 5k rpm para después resuspender la pastilla celular en 10 mL de DMEM con IPTG 50 μ M y δ -ALA 1 mM y la otra pastilla solamente en 10 mL de DMEM. Después de dos horas de incubación a 37 °C y 200 rpm, los cultivos bacterianos fueron medidos con el espectrofotómetro modelo Cary 60 UV/Vis de Agilent Technologies a 600 nm para calcular la Densidad Óptica (DO) y así obtener dos "Multiplicity Of Infection" (MOI) de 1×10^6 para la infección de la línea celular.

La línea celular HeLa se cultivó en caja petri en 10 mL de medio de cultivo RPMI adicionado con suero fetal bovino (BFS) al 10%, antibiótico y antimicótico al 1%, L-glutamina al 1% y bicarbonato de sodio al 1% hasta obtener una confluencia del 80-90% con humedad relativa del 5% de CO₂ y a una temperatura de 37 °C como condiciones de cultivo. El RPMI se retiró para realizar un lavado con 5 mL de PBS y después se adicionaron 500 μ L de tripsina EDTA para su incubación en las condiciones de cultivo previamente descritas durante dos minutos. Pasado el tiempo de incubación con tripsina, se recuperaron las células en un tubo falcon de 15 mL con 10 mL de RPMI para su centrifugación durante 5 minutos a 2500 rpm a 4 °C. Centrifugado el RPMI con HeLa, el pellet obtenido se resuspendió con 10 mL de RPMI para determinar el número de células presentes en una muestra de 10 μ L. Posteriormente se cultivaron 500 000 células HeLa en 5 mL de RPMI en caja Petri de 60 mm para su incubación a 37 °C con

5 % de CO₂ durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas de incubación de la línea celular HeLa, se eliminó el RPMI y se adicionaron 2 mL del cultivo bacteriano de la cepa MC4100/LEE/EspF-CYPBM3 y 2 mL de RPMI para permitir un tiempo de infección de 4 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Después de las 4 horas de infección, se removió el medio y se lavaron las cajas 4 veces con 5 mL de PBS. Se retiró el PBS y se adicionaron a cada caja 4 mL de RPMI con 5 µL de BFC a una concentración final de 0.0125 mM para ser incubada durante 30 minutos a 37 °C con 5 % de CO₂. Posterior a la incubación, se retiraron 2 mL de medio y se adicionaron 2 mL de RPMI con 5 µL de H₂O₂ [3 mM] para incubarlos en las mismas condiciones de humedad relativa y temperatura durante 10 minutos. Después se removió el medio y se lavó 3 veces con PBS y se agregaron 4 mL de RPMI para incubar nuevamente a 37 °C con 5% de CO₂. Posteriormente se lavaron con 5 mL de PBS para tripsinizar las células con 500 µL de tripsina EDTA. Las células se recuperaron y resuspendieron con 10 mL de RPMI para su centrifugación a 4 °C a 2500 rpm durante 5 minutos. Finalmente se descartó el sobrenadante para resuspender el pellet con 50 µL de RPMI y realizar un frotis celular por goteo en un cubreobjetos para fluorescencia de 0.17 micrómetros de espesor. El frotis celular se dejó secar durante 10 minutos a 37 °C con 5 % de CO₂ y se fijó con etanol al 70 % para su posterior observación en el microscopio confocal LMS-50 Carl Zeiss con objetivo 40x.

6. Resultados

6.1 Expresión de la proteína quimérica EspF-CYPBM3 en EPEC WT

La construcción de la proteína quimérica EspF-CYPBM3, la cual se compone de los primeros 20 aminoácidos de la proteína efectora de EPEC EspF más la secuencia aminoacídica completa de la CYPBM3 de *B. megaterium*, fue demostrada mediante su expresión en EPEC. Dicha expresión se muestra en la Figura 8. Los extractos proteicos totales (Figura 8A) muestran en el carril 10 a EPEC silvestre transformada con el vector pEspF-CYPBM3 que contiene el gen que codifica para la proteína quimérica. La banda que representa la expresión de la proteína de interés se ubica alrededor de los 50 kDa.

Por otro lado, se demostró que la proteína quimérica es reconocida como sustrato para su translocación a través del SST3 de EPEC. Mediante el análisis del perfil de proteínas secretadas obtenidas de cultivos de EPEC transformada con el plásmido que codifica para la proteína quimérica (pEspF-CYPBM3), se determinó la presencia de la proteína quimérica en sobrenadantes de cultivo. La cepa control utilizada EPEC WT está en el carril C y EPEC silvestre con el vector vacío pCWOri se encuentra del carril 1 al 3 (Figura 8A). Las proteínas secretadas (Figura 8B) muestran en el carril 10 que la proteína quimérica es secretada eficientemente por la EPEC mutante al medio de cultivo. El cuarto carril pertenece a la transformante EPEC/pEspF-CYPBM3. Los carriles 1 a 4 fueron obtenidos a partir de medios de cultivo sin la adición del inductor IPTG. Las cepas control EPEC/pOri tratadas con IPTG 1 mM en el medio de cultivo se encuentran del carril 7 al 9.

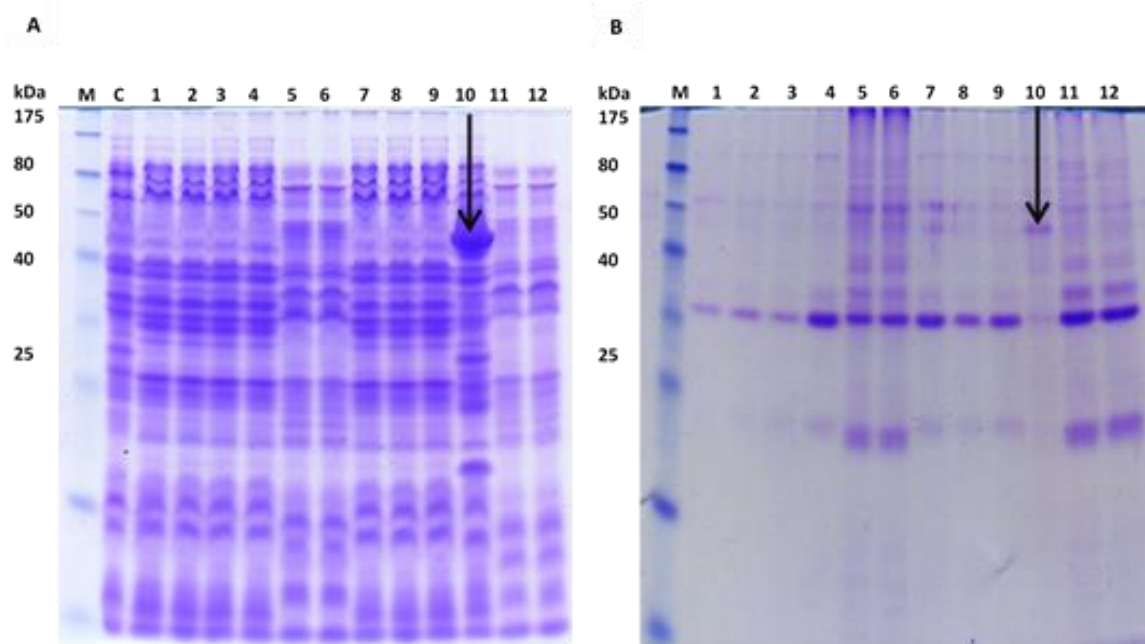


Figura 8. SDS-PAGE al 15% de expresión heteróloga de la proteína quimérica en EPEC WT. El carril 10 muestra la sobreexpresión de EspF-CYPBM3 en A (Extractos proteicos totales) y su secreción al medio de cultivo en B (Proteínas secretadas). Tinción con Coomassie.

6.2 Expresión heteróloga del SST3 y las proteínas quiméricas en *E. coli* comensal MC4100

Después de demostrar que la proteína quimérica era reconocida como sustrato del SST3 de EPEC, nos dimos a la tarea de expresarla heterológamente en una cepa comensal de *E. coli* MC4100 que a su vez transformamos con el plásmido que contiene toda la secuencia del LEE de EPEC. La Figura 9 muestra gel de poliacrilamida al 15% de los extractos totales (A) y de las proteínas secretadas al medio extracelular (B). Los extractos totales en A muestran con flechas la expresión de la proteína quimérica en las cepas EPEC/EspF-CYPBM3 (3), MC4100/EspF-CYPBM3 (4) y MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3 (6). El gel de las proteínas secretadas muestra que los controles negativos EPEC (1), MC4100 (2), MC4100/pEspF-CYPBM3 (4) y MC4100/pLEE (5), no presentan secreción de la proteína quimérica (Figura 9B). Mientras que el control positivo (EPEC/pEspF-CYPBM3) (3) y MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3 (6) que expresan el SST3 y la proteína quimérica, muestran la secreción eficiente de EspF-CYPBM3 al medio extracelular (Figura 9B).

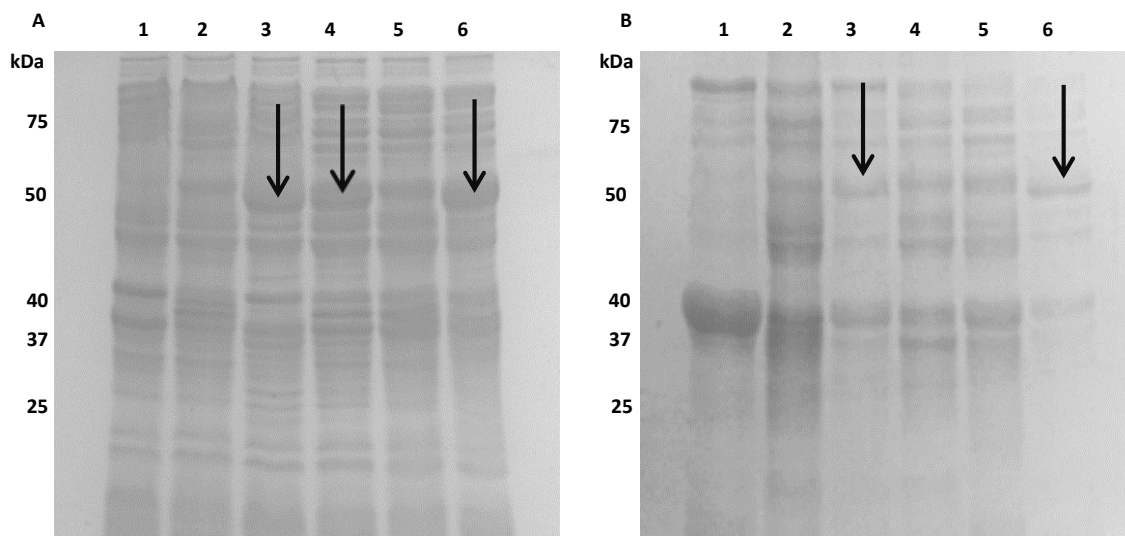


Figura 9. SDS-PAGE al 15% de expresión heteróloga de LEE y proteína quimérica. A: Extractos proteicos totales. B: Proteínas secretadas al medio extracelular. 1: EPEC; 2: MC4100; 3: EPEC/pEspF-CYPBM3; 4: MC4100/pEspF-CYPBM3; 5: MC4100/pLEE; 6: MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3. Tinción con Coomassie.

6.3 Evaluación de la actividad enzimática

La actividad enzimática obtenida mediante espectrofotometría a 480 nm con un tiempo de duración de 10 minutos por muestra, presenta diferencias de aproximadamente 0.1 Unidades de Densidad Óptica (UDO) entre las muestras control que no deben tener actividad enzimática y las dos muestras que poseen a la proteína quimérica. La Figura 10 muestra la actividad de las proteínas que son secretadas al medio extracelular por las transformantes EPEC/pEspF-CYPBM3 y por MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3, las cuales mostraron una absorbancia de 0.23 y 0.22 UDO a 480 nm, respectivamente. Los controles negativos MC4100/pLEE, MC4100/pEspF-CYPBM3 y el blanco, los cuales no producen y/o no secretan la proteína quimérica al medio extracelular, alcanzaron una absorbancia de 0.12, 0.11 y 0.08 UDO a 480 nm, respectivamente.

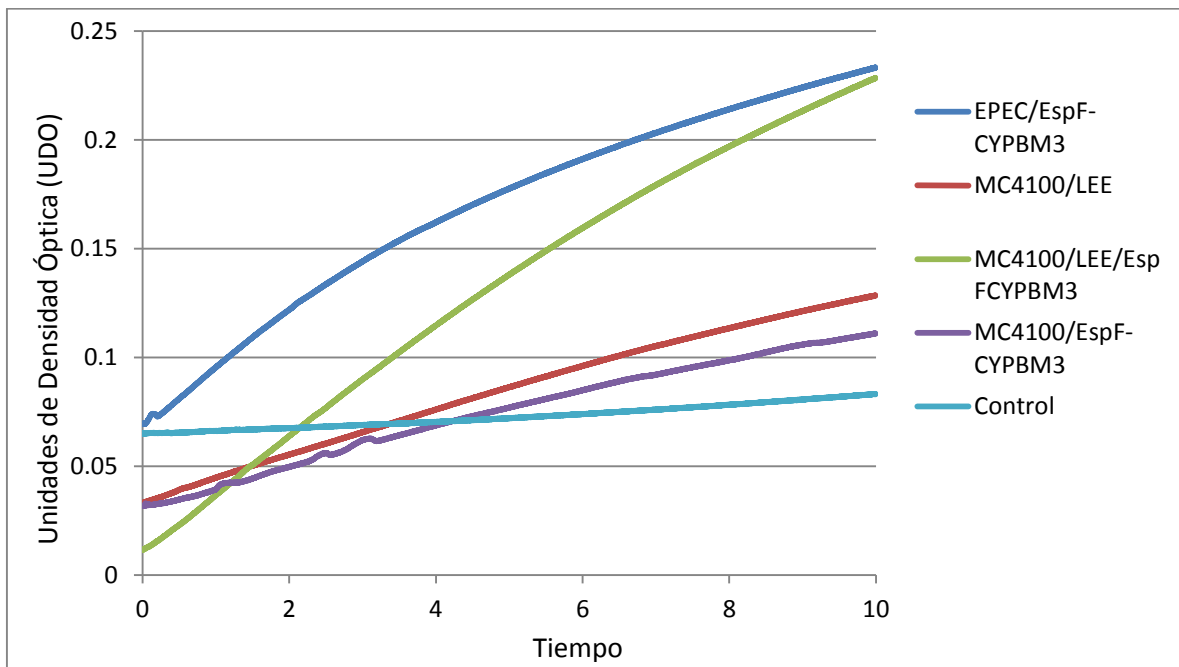


Figura 10. Actividad enzimática de la proteína quimérica EspF-CYPBM3. La figura muestra que la proteína secretada al medio extracelular por EPEC /EspF-CYPBM3 (línea azul) y MC4100 /LEE /EspF-CYPBM3 (línea verde), presenta actividad en comparación a las cepas control utilizadas durante la medición de la actividad enzimática.

6.4 Ensayos de infección de células epiteliales HeLa con la cepa MC4100/pLEE/pEspFCYP-BM3

Al demostrar la eficiente translocación de la proteína quimérica EspF-CYPBM3 al medio de cultivo mediante el SST3 de EPEC expresado en MC4100, aunado a que dicha proteína quimérica mantenía su actividad enzimática, como se demostró en el apartado anterior, nos dimos a la tarea de realizar ensayos de infección en células HeLa, a fin de demostrar la eficiente translocación de EspF-CYPBM3 a estas células epiteliales en cultivo. Para demostrar la translocación de EspF-CYPBM3 al interior de células HeLa, se utilizó el sustrato fluorogénico BFC, el cual al ser transformado por la CYPBM3 modificada, emitirá fluorescencia al interior de las células infectadas.

Las imágenes de la Figura 11 obtenidas a partir de microscopía confocal, muestran a las células cancerígenas HeLa con el sustrato fluorescente BFC sin ser expuestas a infección bacteriana (A); células HeLa expuestas al fluoróforo BFC infectadas con la

cepa MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3 sin inducción, esto es, que no produce la proteína quimérica EspF-CYPBM3 (B); finalmente se muestra la fluorescencia de las células HeLa infectadas con la cepa inducida MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3 (C).

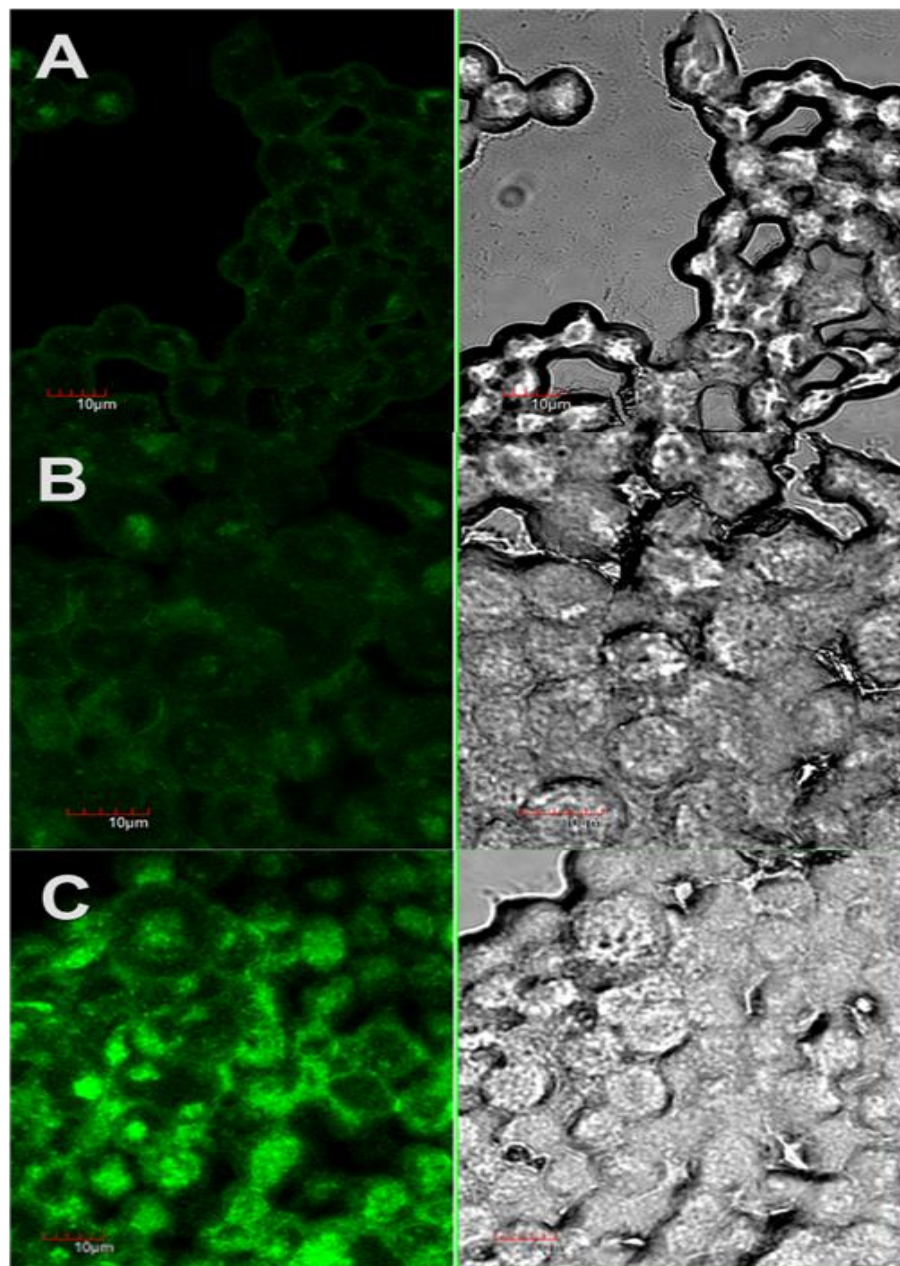


Figura 11. Microscopía confocal de cultivos de células HeLa que muestran el aumento de la fluorescencia producido por la transformación del sustrato BFC mediado por la proteína quimérica EspF-CYPBM3 translocada eficientemente al interior celular mediante la infección con la cepa comensal MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3. x40.

7. Discusión

Blanco-Toribio *et al.* demostraron en 2010 que mediante la fusión de los primeros 20 aminoácidos del efector EspF de la cepa de EHEC a nanoanticuerpos, era posible su reconocimiento y exportación a través del SST3. Por otro lado, McDaniel y Kaper en 1997 lograron expresar heterológicamente el SST3 funcional de EPEC en una cepa comensal de *E. coli* al demostrar que la información contenida en el LEE es suficiente para producir y secretar a la proteína EspB en los sobrenadantes de los medios de cultivo. Debido a que el SST3 se considera funcional al secretar al medio de cultivo a la proteína EspB se confirmó que se logró expresar el SST3 a partir del cósmido pCDV462 (obsequio de James Kaper) en MC4100. Los resultados de los trabajos previamente mencionados nos motivaron a comprobar si era posible la co-expresión de la isla de patogenicidad LEE de EPEC (por lo tanto del SST3) y la proteína quimérica EspF-CYPBM3 en una cepa *E. coli* comensal (MC4100).

La construcción de la proteína quimérica EspF-CYPBM3 se realizó de manera eficiente y se comprobó mediante secuenciación. Además, la proteína quimérica se logró expresar mediante la adición del inductor IPTG al medio de cultivo de EPEC/pEspF-CYPBM3, de la cepa comensal MC4100/pEspF-CYPBM3, así como de la doble transformante MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3, como se observa en los geles de poliacrilamida (Figuras 8 y 9).

El reconocimiento de la proteína quimérica EspF-CYPBM3 como sustrato para la secreción mediado por el SST3 de EPEC se demostró al encontrar a la proteína quimérica en sobrenadantes de cultivos bacterianos de las cepas EPEC/pEspF-CYPBM3 y MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3. En la cepa utilizada como control (MC4100/pEspF-CYPBM3) la cual produce la proteína quimérica, mostró que al carecer del SST3, produce la proteína quimérica pero no puede secretarla al medio de cultivo (Figura 9). Este hallazgo comprueba que la secreción de la proteína quimérica es específica a través del SST3. Por otro lado, se demostró que la proteína quimérica

secretada a medio de cultivo a través del SST3, mantiene actividad enzimática (Figura 10).

Si bien la actividad catalítica de las muestras de sobrenadantes de cultivo, donde se encuentra la proteína quimérica secretada a través del SST3 en EPEC y en la cepa comensal MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3 es baja respecto a valores obtenidos en ensayos con la proteína pura, se confirma que la proteína EspF-CYPBM3 se produce y se secreta a través del SST3 expresados de manera heteróloga. Además se demuestra que por lo menos un porcentaje de la proteína se mantiene activa (Figura 10). Cabe mencionar que esta enzima requiere de condiciones específicas para obtener su máxima capacidad catalítica (buffer de fosfatos, pH 7.5, presencia de H₂O₂, etc.). La evaluación de la actividad directamente de los sobrenadantes de los diferentes cultivos puede reducir de manera importante su actividad, por lo que esperamos que la actividad catalítica de la proteína quimérica translocada a las células cancerosas mantenga una actividad igual o mayor a la encontrada en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos.

El ensayo fluorimétrico realizado sobre células HeLa infectadas con MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3 muestra un aumento considerable en la fluorescencia sobre la línea celular que fue infectada por la bacteria comensal MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3 inducida con IPTG (Figura 11). La mayor fluorescencia de esta línea celular infectada con la cepa inducida sobre los controles utilizados demuestra que el SST3 expresado por la cepa de *E. coli* comensal MC4100 es funcional, ya que el aumento de la fluorescencia al interior celular indica una translocación eficiente de la proteína quimérica EspF-CYPBM3 al interior de la célula HeLa y el reconocimiento del sustrato fluorescente BFC realizado por esta proteína quimérica. La emisión de fluorescencia presente en los cultivos control, si bien es bajo, se puede explicar por el hecho de que las células HeLa, al igual que otras células humanas sanas, expresan diferentes familias de citocromos como los CYP1A1, 1A2 y 1B1 (Devlin, 2006; Gallego-Fernández, 2011), las cuales también pueden reconocer y transformar el BFC.

Considerando los resultados anteriores, en este trabajo se logró construir, expresar, secretar y translocar eficientemente a la proteína quimérica EspF-CYPBM3 a través del SST3 de EPEC mediante la expresión heteróloga en una cepa comensal de *E. coli* MC4100. La proteína translocada a células HeLa mantuvo su capacidad catalítica, pues fue capaz de transformar el sustrato fluorogénico BFC al interior celular. El avance alcanzado, nos permite continuar con la posibilidad de utilizar este sistema de expresión para la entrega de esta enzima a células de cáncer de colon para hacer más eficiente la transformación de pro-fármacos anticancerígenos en terapias dirigidas para combatir este tipo de cáncer.

8. Conclusiones

La proteína quimérica EspF-CYPBM3 que tiene fusionados los primeros 20 aminoácidos del efector EspF a la CYPBM3 se logró expresar de manera heteróloga en EPEC y MC4100.

La exportación de la proteína EspF-CYPBM3 al medio de cultivo se logró mediante los SST3 de EPEC WT y de la cepa comensal MC4100/LEE/EspF-CYPBM3.

La proteína EspF-CYPBM3 secretada al medio de cultivo a través del SST3 de EPEC conserva su actividad enzimática.

Se demostró la eficiente translocación de la proteína quimérica EspF-CYPBM3 a través del SST3 de EPEC a partir de la cepa comensal MC4100 a células epiteliales HeLa.

9. Perspectivas

Llevar a cabo ensayos de infección de células de cáncer de colon con la cepa MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3 a fin de determinar si la proteína EspF-CYPBM3 activa de manera eficiente a pro-fármacos anticancerígenos para así poder inducir la apoptosis de las células cancerosas.

Construir y evaluar otras proteínas quiméricas con actividad pro-apoptótica para su entrega a células cancerosas a través de la infección con MC4100/pLEE/pEspF-CYPBM3.

Evaluar la infección de ratones modelo de cáncer de colon con las cepas que producen la proteína quimérica y determinar su efecto *in vivo*.

Lista de Referencias

- Andrade, A., Pardo, J. P., Espinosa, N., Perez-Hernandez, G. and Gonzalez-Pedrajo, B. (2007). Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Archives of Biochemistry and biophysics*. 468,121-127. doi: 10.1016/j.abb.2007.09.020
- Blanco-Toribio, A., Muyldermans, S., Frankel, G. and Fernández, L.A. (2010). Direct Injection of Functional Single-Domain Antibodies from *E. coli* into Human Cells. *PLOS One* 5 (12), e15227. doi:10.1371/journal.pone.0015227
- Bockler, A. J., Deane, J. E., Veenendaal, K. J., Roversi, P., Hodgkinson, J. L., Johnson, S and Lea, S. M. (2008). What´s the point of the type III secretion system needle? *PNAS* 105(18), 6507-6513. doi: 10.1073/pnas.0708344105.
- Chen, H. D., and Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Review* 29 (1), 83-98. doi: 10.1016/j.femsre.2004.07.002
- Clarke, S.C., Haigh, R.D., Freestone, P.P., and Williams, P.H. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (3), 365-378. doi: 10.1128/CMR.16.3.365-378.2003
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nature reviews. Microbiology*, 4, 811-825 doi:10.1038/nrmicro1526
- Danielson P. (2002). The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism* 3 (37), 561-597. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1389200023337054>
- Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J. and Attree, I. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* Cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but, ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infection and Immunity*. 68(5), 2916-2924. doi: 10.1128/IAI.68.5.2916-2924.2000
- Damstem, M. C., Vugt-Lussenburg, B. M., Zeldenthuis, T., Vlieger, J. S., Commandeur, J. N. and Vermeulen, N. P. (2008). Application of drug metabolizing mutants of cytochrome P450 BM3 (CYP102A1) as biocatalysts for the generation of reactive metabolites. *Chemico-Biological Interactions* 171, 96-107. doi: 10.1016/j.cbi.2007.09.007
- Dean, P., Maresca, M. and Kenny, B. (2005). EPEC'S weapons of mass subversion. *Current opinion in microbiology*, 8(1), 28-34. doi: 10.1016/j.mib.2004.12.010
- De Mot, R. & Parret, A. H. A. (2002). A novel class of self-sufficient cytochrome P450 monooxygenases in prokaryotes. *Trends in Microbiology*, 10 (11), 502–508. doi: 10.1016/S0966-842X(02)02458-7

- Deng, W., Li, Y., Hardwidge, P.R., Frey, E.A., Pfuetzner, R.A., Lee, S., Gruenheid, S., Strynacka, N.C., Puente, J.L., and Finlay, B.B. (2005). Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infection and immunity* 73(4), 2135-2146. doi: 10.1128/IAI.73.4.2135-2146.2005
- Devlin, T. M. (2006). *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas*. (4^a. ed.). España, Editorial Reverté.
- Di Nardo, G. and Gilardi, G. (2012). Optimization of the bacterial cytochrome P450 BM3 system for the production of human drug metabolites. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (12), 15901-15924. doi: 10.3390/ijms131215901
- Donato, M. T., Jiménez, N. Castell, J. V. and Gómez-Lechón, J. (2004). Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug metabolism and disposition*. 32 (7), 699-706 doi: 10.1124/dmd.32.7.699
- Elliott, S.J., Wainwright, L.A., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Deng, Y.K., Lai, L.C., McNamara, B.P., Sonnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1998). The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Molecular Microbiology* 28 (1), 1-4. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00783.x
- Epaulard, O., Toussaint, B., Quenee, L., Derouazi, M., Bosco, N., Villiers, C., Le Berre, R., Benoit, G., Didier, F., Crombez, L., Marche, P. and Polack, B. (2006). Antitumor Immunotherapy via Antigen Delivery from a Live Attenuated Genetically Engineered *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System-Based Vector. *Molecular Therapy* 14 (3), 656-661. doi: 10.1016/j.ymthe.2006.06.011
- Gallego-Fernández, A. (2011). Aspectos fundamentales del citocromo P450. Recuperado el 07 de abril de 2014: http://instituto-roche.es/publicaciones/153/Aspectos_fundamentales_del_Citocromo_P450
- García, J., Santana, Z., Zamalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G. y Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Vaccinmonitor* 22 (2), 30-39. Recuperado el 19 de agosto de 2014 de, <http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/vaccinmonitor/vm2013/a14.pdf>
- Garmendia, J., Frankel, G., and Crepin, V.F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity* 73 (5), 2573-2585. doi: 10.1128/IAI.73.5.2573-2585.2005
- Guengerich, F. P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research Toxicology*. 14 (6), 611-650 doi: 10.1021/tx0002583

- Halim-Hegazy, Wael A., Xu Xin, Metelitsa, Leonid and Hensel, Michael. (2012). Evaluation of *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effector Protein as Carriers for Heterologous Vaccine Antigens. *Infection and Immunity*. 80 (3), 1193 doi: 10.1128/IAI.06056-11
- Huerta-Saquero, A., Oropeza, R. y Calva, E. (2011). Bacterias que causan diarrea a los bebés... El caso de la *Escherichia coli* enteropatógena. Recuperado el 12 de septiembre de 2013 de, <http://www.acmor.org.mx/?q=content/bacterias-que-causan-diarrea-los-bebés-el-caso-de-la-escherichia-coli-enteropatógena>
- Lara, A. R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería química* 10 (2), 209-223. Recuperado el 20 de agosto 2014 de, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382011000200006&script=sci_arttext
- Lussenburg, B. M. A., Babel, L. C., Vermeulen, N. P. E. and Commandeur J. N. M. (2005). Evaluation of alkoxyresorufins as fluorescent substrates for cytochrome P450 BM3 and site-directed mutants. *Analytical biochemistry*. 341(1), 148-155 doi: 10.1016/j.ab.2005.02.025
- McDaniel, T. K. and Kaper, J. B. (1997). A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Molecular Microbiology*. 23 (2), 399-407 doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.2311591.x
- Molina-López, José. (2011). Patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica. Recuperado el 15 de julio de 2014 de, <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
- Monjarás-Feria, J., García-Gómez, E., Espinoza, N., Minamino, T., Namba, K. and González-Pedrajo, B. (2012). Role of EscP (Orf16) in injectisome biogenesis and regulation of type III protein secretion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2012, 194 (22), 6029. doi: 10.1128/JB.01215-12.
- Munro, A. W., Leys, D. G., McLean, K. J., Marshall, K. R., Ost, T. W. B., Daff, S., Miles, C. S., Chapman, S. K., Lysek, D. A., Moser, C. C., Page, C. C. and Dutton P. L. (2002). P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome. *Trends in Biochemical Sciences*. 27(2002), 250-257 doi: 10.1016/S0968-0004(02)02086-8
- Mueller, C. A., Broz, P. and Cornelis, G. R. (2008). The type III secretion system tip complex and translocon. *Molecular Microbiology*. 68(5), 1085-1095 doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06237.x
- Murray, G. I. (2000). The role of cytochrome P450 in tumour development and pregression and its potential in therapy. *The Journal of Pathology*. 192 (4), 419-426 doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH750>3.0.CO;2-0

- Nataro, J. P. and Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (1): 142-201. Recuperado el 10 de enero de 2014 de, <http://cmr.asm.org/content/11/1/142>
- Nebert, D. W., and Russell, D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*. (30)9340, 1155-1162. doi: 10.1016/S0140-6736(02)11203-7
- Orellana, M. y Guajardo, V. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev. Med. Chile* 132 (1), 85-94. Recuperado el 22 de julio de 2014 de, http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872004000100014&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Poulos, T. and Johnson, E. (2005). Structures of cytochrome P450 enzymes en: Ortíz de Montellano, P. (Ed.) *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry* 87-111 Editorial Kluwer Academic/Plenum Publishers
- Russman, H., Shams, H., Poblete, F., Fu, Y., Galan, J. and Donis, R. (1998). Delivery of Epitopes by the *Salmonella* Type III Secretion System for Vaccine Development. *Science*. 281(5376), 565-568. doi: 10.1126/science.281.5376.565
- Salazar O., Cirino, P. C. and Arnold, F. H. (2003). Thermostabilization of a cytochrome P450 peroxygenase. *Chemical Biochemistry* (4), 891-893. doi: 10.1002/cbic.200300660
- Saier, M. H. (2006). Protein secretion systems in Gram-negative bacteria. Gram-negative bacteria possess many protein secretion-membrane insertion systems that apparently evolved independently. *Microbe* 1, 414-419.
- Strynadka, N. (2011). Fern Ness Science Illustration. Recuperado 18 de Abril de 2013 de <http://www.ferness.com/science-01.html>
- Tamano, K., Katayama, E., Toyotome, T. and Sasakawa, C. (2002). Shigella Spa32 is an essential secretory protein for functional type III secretion machinery and uniformity of its needle length. *Journal of Bacteriology* 184(5), 1244-1252. doi: 10.1128/JB.184.5.1244-1252.2002
- Thanassi, D. G. and Hultgren, S. J. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Current Opinion in Cell Biology* 12 (4), 420-430. doi: 10.1016/S0955-0674(00)00111-3
- Thomas, N. A., Deng, W., Puente, J. L., Frey, E. A., Yip, C. K., Strynadka, N.C. and Finlay, B. B. (2005). CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE and non-LEE encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 57 (6), 1762-1779. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04802.x
- Tseng, T., Tyler, B. and Setubal, J. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology* 9, 1-9. doi: 10.1186/1471-2180-9-S1-S2

- Vanina, R. (2012). Cytochrome P450 BM3 as versatile biocatalytic tool in drug development. Recuperado el 18 de julio de 2014 de, https://www.tipharma.com/fileadmin/user_upload/Theses/PDF/Vanina_Rea_D2-201.pdf
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J. y Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública Mex.* 49 (5), 376-386. Recuperado el 28 de febrero de 2014 de, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342007000500008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Vidal-Limón, A., Águila, S., Ayala, M., Batista, C. & Vazquez-Duhalt, R. (2013). Peroxidase activity stabilization of cytochrome P450_{BM3} by rational analysis of intramolecular electron transfer. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 122 12-26. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2013.01.009
- Young-Jin, C. and Sanghee, K. (2003). Discovery of cytochrome P450 1B1 inhibitors as new promising anti-cancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23 (6):657-668. doi: 10.1002/med.10050