

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Estudio de la unión de anticuerpos de suero de pacientes
pediátricos convalecientes de infecciones urinarias a
dominios superficiales de los ujieres FimD y PapC de
Escherichia coli uropatógena**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

CHRISTOPHER LAVALLE CHÁVEZ

DIRECTOR DE MEMORIA:
DR. FELIPE DEL CANTO FUENTES ¹

PROFESOR PATROCINANTE:
DR. CARLOS SANTIVIAGO CID ²

(1) Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

(2) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

SANTIAGO - CHILE
2023

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo. Mi familia merece una mención especial por su apoyo constante e incondicional, y por creer siempre en mí.

Quiero agradecer especialmente a mi tutor de tesis, Felipe Del Canto. Nuestras interacciones me han permitido adquirir conocimientos técnicos y teóricos, además de profundizar en conversaciones sobre temas más amplios que han enriquecido mi desarrollo tanto profesional como personal.

Estos procesos son oportunidades para evolucionar hacia nuestra mejor versión. Al concluir esta etapa, puedo decir con certeza que he crecido, no solo profesionalmente, sino también en lo personal. He tenido el privilegio de estar rodeado de personas excepcionales, y les estoy profundamente agradecido por haber sido parte de este viaje y por ayudarme a superarlo con éxito.

Esta tesis se realizó en el Programa de Microbiología y Micología del ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Felipe Del Canto Fuentes. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1200979, dirigido por el Dr. Felipe Del Canto Fuentes.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.1 Clasificación.....	1
1.1.2 Infecciones del tracto urinario por <i>E. coli</i> uropatógena	1
1.1.3 ITU y respuesta inmune	2
1.2 Las fimbrias.....	4
1.2.1 Clasificación de las fimbrias	5
1.2.2 Clasificación de las fimbrias CU	5
1.2.3 Fimbrias tipo 1 y tipo P	6
1.2.4 Ujieres FimD y PapC	9
1.3 Ujieres como blancos en el desarrollo de terapias o estrategias de prevención	10
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1 Materiales	15
4.2 Métodos.....	18
5. RESULTADOS	27
5.1 Expresión heteróloga de FimD y PapC en <i>E. coli</i> BL21 Δ ABCF.....	27
5.2 Anti-FimD _{dom-sup} reconoce los dominios superficiales de FimD en BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>fimD</i>	33
5.3 Los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC reconocen FimD expresada por BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>fimD</i> ...	35
5.4 Los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC son reactivos a QFimD _{dom-sup} y QFimD _{dom-sup}	39
6. DISCUSIÓN	41
6.1 Expresión recombinante de FimD y PapC en <i>E. coli</i> BL21 Δ ABCF.....	42
6.2 Anti-FimD _{dom-sup} reconoce los dominios superficiales de FimD en BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>fimD</i>	44
6.3 Los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC reconocen FimD producida por BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>fimD</i> ...	45
6.4 Los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC reconocen QFimD _{dom-sup} y QFimD _{dom-sup}	45
7. CONCLUSIONES	47
8. REFERENCIAS.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Loci codificantes y modelos de las fimbrias tipo 1 y P.	8
Figura 2. Ujieres FimD y PapC.	10
Figura 3. Disposición espacial de FimD y PapC y sus dominios superficiales.	13
Figura 4. Verificación del clonamiento de <i>fimD</i> y <i>papC</i> en <i>E. coli</i> BL21 Δ ABCF.	28
Figura 5. Verificación del clonamiento de <i>fimD</i> y <i>papC</i> en <i>E. coli</i> BL21 Δ ABCF.	30
Figura 6. Detección de FimD y PapC mediante WB en extractos totales bacterianos de las cepas BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>fimD</i> y BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>papC</i>	32
Figura 7. Detección de FimD y PapC con anticuerpos anti-FimD _{dom-sup} y anti-PapC _{dom-sup} en BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>fimD</i> y BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>papC</i> por citometría.	34
Figura 8. Detección de FimD con sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC en BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>fimD</i> por citometría de flujo.	38
Figura 9. Reactividad de los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC contra QFimD _{dom-sup} y QPapC _{dom-sup} mediante <i>dot blot</i>	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos usados en este estudio.....	15
Tabla 2. Bacterias y plásmidos utilizados en este estudio.	17
Tabla 3. Herramientas computacionales.....	17
Tabla 4. Partidores de PCR usados en este estudio.	21
Tabla 5. Mezcla de reacción para PCR.	21
Tabla 6. Programa de amplificación para PCR.	22
Tabla 7. Diseño experimental del ensayo de unión de los anticuerpos anti-FimD _{dom-sup} y anti-PapC _{dom-sup} a las proteínas FimD y PapC expresadas por BL21ΔABCF/pVB1- <i>fimD</i> y BL21ΔABCF/pVB1- <i>papC</i>	34
Tabla 8. Diseño experimental del ensayo de reactividad de los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC contra FimD expresada en BL21ΔABCF/pVB1- <i>fimD</i>	36

ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
Amp	ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
anti-FimD _{dom-sup}	anticuerpos dirigidos contra los dominios superficiales de FimD
anti-PapC _{dom-sup}	anticuerpos dirigidos contra los dominios superficiales de PapC
BSA	albúmina de suero bovino
BSA/T-TBS	T-TBS suplementado con BSA al 1%
C-terminal	carboxilo terminal
CU	chaperona – ujier
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxirribonucleótidos
DO _{600nm}	densidad óptica medida a 600 nanómetros
ex/em	excitación y emisión
ExPEC	<i>E. coli</i> patógena extraintestinal
FE	ficoeritrina
FimD _{dom-sup}	dominios superficiales de FimD
h	horas
IF	intensidad de fluorescencia
Ig	inmunoglobulina
IU	infección urinaria
KDa	kilodalton
LB	caldo de lisogenia
MCS	sitio de múltiple clonamiento
ME	membrana externa
min	minutos
mm	milímetros
mL	mililitros
mM	milimolar
ms	milisegundos
NBT/BCIP	nitroazul de tetrazolio y sal de p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato
N-terminal	amino terminal
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	suero fisiológico tamponado con fosfato
PCR	reacción en cadena de polimerasa
PapC _{dom-sup}	dominios superficiales de PapC
QFimD _{dom-sup}	proteína quimérica con los dominios superficiales de FimD
QPapC _{dom-sup}	proteína quimérica con los dominios superficiales de PapC
RPM	revoluciones por minuto
s	segundos
SDS	dodecilsulfato sódico
SOC	caldo superóptimo
TA	temperatura ambiente
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBS	solución salina tamponada con Tris
T-TBS	TBS suplementado con Tween-20 al 0,03%
UFC	unidades formadoras de colonia
μM	micromolar
μL	microlitros
UPEC	<i>E. coli</i> uropatógenas
V	voltios
x g	aceleración gravitacional
WB	<i>Western blot</i>

RESUMEN

Las fimbrias son filamentos proteicos multiméricos que se localizan en la superficie bacteriana y que cumplen una función esencial en la adherencia de estos microorganismos a los tejidos de su hospedero. La mayoría de las fimbrias en las bacterias Gram negativo son ensambladas por el sistema chaperona-ujier (CU) en el que básicamente operan una o más proteínas chaperonas y un ujier, proteína transmembrana que actúa como plataforma de ensamblaje de la fimbria en la membrana externa. La fimbria tipo 1 y la fimbria P son las fimbrias más representativas y más estudiadas en los sistemas CU, en las que operan las proteínas ujier FimD y PapC, respectivamente. Ambas fimbrias desempeñan un papel importante en la adherencia de cepas de *Escherichia coli* uropatógenas (UPEC), que constituyen la principal causa de infecciones del tracto urinario (ITU) en humanos a nivel comunitario, afectando principalmente a niños y adultos mayores.

Las fimbrias son estructuras determinantes en la patogenicidad bacteriana debido a la interacción que establecen con receptores en tejidos del hospedero y, al mismo tiempo, son determinantes de reconocimiento por parte del sistema inmunológico, particularmente por estar expuestas en la superficie bacteriana. En ese contexto, las subunidades estructurales fimbriales han sido los componentes más estudiados, en términos del reconocimiento por parte de anticuerpos y el efecto que esto conlleva en el desarrollo del ciclo patogénico. Sin embargo, las proteínas ujier tienen dominios expuestos a la superficie, que han sido mucho menos estudiados en estos aspectos. Dentro de los pocos antecedentes que existen, se ha demostrado que la proteína ujier YcbS de *Escherichia coli* une glicosaminoglicanos del hospedero y además es reconocida por anticuerpos en el contexto de una respuesta inmunológica. Esto daría cuenta de que los dominios superficiales de las proteínas ujier se encuentran accesibles y podrían representar puntos de unión con moléculas del hospedero. Por lo tanto, considerando la importancia de los sistemas fimbriales CU como factores de virulencia y como potenciales objetivos de terapias antivirulencia, resulta relevante profundizar en el estudio de la interacción de los ujieres con su organismo hospedero y, particularmente, estudiar el papel de los dominios superficiales.

En este trabajo, se estudió la interacción de los dominios superficiales de FimD y PapC con anticuerpos presentes en sueros de pacientes pediátricos convalecientes de ITU causadas por UPEC. Para ello, se diseñó un modelo de expresión heteróloga de cada proteína en *E. coli* BL21 Δ ABCF (cepa cuádruple mutante, carente de porinas OmpA, LamB, OmpC y OmpF, diseñada especialmente para la expresión de proteínas tipo porinas), utilizando el vector pVB1. Se corroboró la identidad de los genes clonados mediante PCR, digestión enzimática y secuenciación de los insertos en el sitio de múltiple clonamiento de pVB1. La presencia de FimD y PapC se determinó en primera instancia en extractos bacterianos totales, mediante *Western blot* (WB), utilizando anticuerpos dirigidos contra los dominios superficiales de cada

una de ellas. Estos anticuerpos fueron desarrollados previamente en conejos inmunizados con proteínas quiméricas sintéticas, que contenían los dominios más extensos de cada proteína, enlazados por *linkers*. Luego, se determinó la presencia de las proteínas en la membrana externa bacteriana mediante citometría de flujo, utilizando los mismos anticuerpos. Posteriormente, se determinó la reactividad de los anticuerpos contenidos en sueros de pacientes pediátricos convalecientes de ITU causadas por UPEC con los dominios superficiales de FimD y PapC de la cepa cuádruple mutante transformada con los plásmidos recombinantes con los respectivos genes mediante citometría de flujo.

Se corroboró el correcto clonamiento de los genes *fimD* y *papC* en pVB1 mediante PCR y digestiones enzimáticas, obteniéndose productos de los tamaños esperados en todos los casos. Además, de forma complementaria, se verificó la identidad de los insertos por secuenciación a partir de los vectores recombinantes. Se confirmó la expresión de FimD en extractos totales por WB y en superficie por reactividad del anticuerpo anti-FimD, la cual mostró una reactividad significativamente mayor en comparación con las cepas control (cepa con el vector pVB1 vacío y sin el vector). No ocurrió lo mismo con PapC, caso en el que no se observó diferencias significativas con respecto a los controles. A continuación, al evaluar la reactividad de los sueros de pacientes pediátricos convalecientes de ITU causadas por UPEC con el sistema de expresión heteróloga de FimD en *E. coli* BL21 Δ ABCF, se observó una reactividad significativamente mayor en comparación con los controles (cepa con el vector pVB1 vacío y sin el vector). Para complementar este estudio, especialmente en el caso de PapC, se evaluó la reactividad de los sueros de pacientes pediátricos con las proteínas quiméricas de FimD y PapC. Los resultados mostraron reactividad en ambos casos.

En base a la reactividad de los sueros de pacientes pediátricos convalecientes, tanto con la cepa que expresa FimD, como con las proteínas quiméricas de FimD y PapC, se puede concluir que existe una interacción de los dominios superficiales de dichos ujieres con anticuerpos presentes en sueros de pacientes pediátricos convalecientes de ITU. Estos hallazgos, sumados a otros antecedentes citados, no solo refuerzan la idea de que existe una interacción entre el hospedero y el patógeno a través de los ujieres, sino que, además, ésta se produce a través de los dominios superficiales de los ujieres. El efecto de esta interacción en la patogenicidad bacteriana y en el desarrollo de la respuesta inmune aún se debe dilucidar puesto que permitiría establecer a los dominios superficiales de FimD y PapC posible blanco terapéutico en el desarrollo de vacunas y fármacos contra la ITU causada por UPEC.

ABSTRACT

Study of serum antibody binding from convalescent pediatric patients with urinary tract infections to surface domains of FimD and PapC usher proteins in uropathogenic *Escherichia coli*

Fimbriae are multimeric protein filaments located on the bacterial surface that play an essential role in the adherence of these microorganisms to the tissues of their host. Most fimbriae in Gram-negative bacteria are assembled by the chaperone-usher (CU) system, which essentially consists of one or more chaperone proteins and an usher, a transmembrane protein that acts as an assembly platform for the fimbria in the outer membrane. Type 1 fimbria and P fimbria are the most representative and most studied fimbriae in the CU systems, in which the usher proteins FimD and PapC operate, respectively. Both fimbriae play an important role in the adherence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains, which are the main cause of community-acquired urinary tract infections (UTIs) in humans, mainly affecting children and older adults.

Fimbriae are determinant structures in bacterial pathogenicity due to the interaction they establish with receptors in host tissues and, at the same time, are recognition determinants by the immune system, particularly because they are exposed on the bacterial surface. In this context, fimbrial structural subunits have been the most studied components in terms of antibody recognition and the effect this has on the development of the pathogenic cycle. However, usher proteins have surface-exposed domains, which have been much less studied in these aspects. Among the few existing precedents, it has been shown that the usher protein YcbS of *Escherichia coli* binds host glycosaminoglycans and is also recognized by antibodies in the context of an immune response. This would indicate that the surface domains of the usher proteins are accessible and could represent binding points with host molecules. Therefore, considering the importance of CU fimbrial systems as virulence factors and as potential antivirulence therapy targets, it is relevant to delve into the study of the interaction of the ushers with their host organism and, particularly, to study the role of the surface domains.

In this study, the interaction of the surface domains of FimD and PapC with antibodies contained in sera from pediatric patients recovering from UTIs caused by UPEC was studied. For this, a heterologous expression model of each protein in *E. coli* BL21ΔABCF (a quadruple mutant strain, lacking the porins OmpA, LamB, OmpC, and OmpF, specially designed for the expression of porin-type proteins) was designed, using the pVB1 vector. The identity of the cloned genes was verified by PCR, enzymatic digestion, and sequencing of the inserts at the multiple cloning site of pVB1. The presence of FimD and PapC was initially determined in total bacterial extracts, by Western blot (WB), using antibodies

directed against the surface domains of each of them. These antibodies were previously developed in rabbits immunized with synthetic chimeric proteins, which contained the most extensive domains of each protein, linked by linkers. Then, the presence of the proteins at the bacterial surface was determined by flow cytometry, using the same antibodies. Subsequently, the reactivity of the antibodies contained in sera from pediatric patients recovering from UTIs caused by UPEC with the surface domains of FimD and PapC, expressed in the quadruple mutant strain was determined by flow cytometry.

The correct cloning of the *fimD* and *papC* genes in pVB1 was verified by PCR and enzymatic digestions, obtaining products of the expected sizes in all cases. In addition, the inserts of the recombinant vectors were sequenced as a complement. The expression of FimD in total extracts was confirmed by WB and on the surface by reactivity of the anti-FimD antibody, which showed significantly higher reactivity compared to control strains (strain with the empty pVB1 vector and without the vector). The same did not occur with PapC, in which no significant differences were observed compared to the controls. Next, when evaluating the reactivity of the sera from pediatric patients recovering from UTIs caused by UPEC with the heterologous expression system of FimD in *E. coli* BL21 Δ ABCF, significantly higher reactivity was observed compared to the controls (strain with the empty pVB1 vector and without the vector). To complement this study, especially in the case of PapC, the reactivity of the sera from pediatric patients with the chimeric proteins of FimD and PapC was evaluated. The results showed reactivity in both cases.

Based on the reactivity of the sera from pediatric patients recovering, both with the strain expressing FimD and with the chimeric proteins of FimD and PapC, it can be concluded that there is an interaction of the surface domains of these ushers with antibodies present in sera from pediatric patients recovering from UTIs. These findings, combined with other cited precedents, not only reinforce the idea that there is an interaction between the host and the pathogen through the ushers, but also that this occurs through the surface domains of the ushers. The effect of this interaction on pathogenicity and cellular immunity still needs to be elucidated since it would allow establishing the surface domains of FimD and PapC as a possible therapeutic target in the development of vaccines and drugs against UTIs caused by UPEC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Como miembro de las bacterias Gram negativo, su envoltura celular está formada por una membrana citoplasmática interna, seguida de una pared celular que contiene una delgada capa de peptidoglicano y una membrana externa. El espacio contenido entre las membranas citoplasmática y externa se denomina espacio periplasmático. La superficie de la membrana externa de *E. coli* presenta diversas estructuras, como lipopolisacáridos, flagelos y fimbrias, que se extienden hacia el espacio extracelular. Estas estructuras desempeñan un papel fundamental en la interacción de la bacteria con su entorno, ya que facilitan su movilidad, la capacidad de adherirse a superficies y la evasión del sistema inmunológico del organismo hospedero (Murray *et al.*, 2020).

1.1.1 Clasificación

Las cepas de *E. coli* se pueden clasificar en 3 grupos según criterios genéticos y clínicos. Estos grupos incluyen cepas comensales, cepas patógenas intestinales y cepas patógenas extra-intestinales (ExPEC). Las cepas comensales componen la microbiota intestinal humana y tienen beneficios para el hospedero humano. Aunque pueden comportarse como patogénicas en condiciones como el detrimento del sistema inmunitario, esto es muy raro. Por otro lado, las cepas patógenas intestinales causan principalmente diarrea cuando son consumidas en alimentos o agua contaminada. Por último, las cepas patógenas ExPEC tienen características genéticas distintas, que les permiten afectar a una amplia variedad de órganos y tejidos (Andreu, 2005).

1.1.2 Infecciones del tracto urinario por *E. coli* uropatógena

Aunque las *E. coli* residen principalmente en el tracto gastrointestinal, pueden ocasionalmente migrar a otros nichos. Cuando se liberan en las heces, estas bacterias pueden llegar al perineo, una zona de piel entre la región anal y urogenital que sirve como reservorio de bacterias del tracto gastrointestinal. A partir de este lugar, pueden emigrar y ocasionar

infecciones del tracto urinario (ITU). Este fenómeno se observa con mayor frecuencia en mujeres, debido a la menor longitud de su uretra en comparación con la de los hombres (Hooton *et al.*, 2000).

Las *E. coli* capaces de producir ITU se denominan *E. coli* uropatógenas (UPEC) y se caracterizan por portar factores de virulencia que les permiten adherirse y colonizar el tracto urinario, eludir el sistema inmunológico y liberar toxinas (Chromek y Brauner, 2008).

Aunque las ITU pueden ser provocadas por una variedad de agentes patógenos, incluyendo bacterias Gram negativo, Gram positivo, algunos hongos y virus, el agente más frecuentemente implicado es UPEC. Esta bacteria es responsable de aproximadamente el 70% de los casos de ITU a nivel global. (Ronald, 2002; Mancuso *et al.*, 2023).

Desde un punto de vista clínico, las ITUs se categorizan como no complicadas o complicadas. Las ITU no complicadas suelen afectar a individuos saludables que no presentan anomalías estructurales o neurológicas en el tracto urinario (Hooton, 2012). Estas infecciones se dividen en ITU bajas (uretra y vejiga) e ITU altas (uréteres y riñones). Los cuadros clínicos más frecuentes son la cistitis (infección de la vejiga) y la pielonefritis (infección renal) (Hooton, 2012), las que a menudo afectan a mujeres, niños y pacientes de edad avanzada (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Por otro lado, las ITU complicadas suelen estar asociadas a factores que comprometen el tracto urinario o las defensas del hospedero, incluida la obstrucción urinaria, la retención urinaria causada por una enfermedad neurológica, la inmunosupresión, la insuficiencia renal, el trasplante renal, el embarazo y la presencia de cuerpos extraños como cálculos, catéteres permanentes u otros dispositivos de drenaje (Lichtenberger y Hooton, 2008).

1.1.3 ITU y respuesta inmune

La respuesta del ser humano contra las infecciones provocadas por agentes patógenos se conoce como respuesta inmunitaria (Rich *et al.*, 2019). La respuesta inmunitaria es un proceso dinámico que se inicia con una respuesta inespecífica (inmunidad innata) la que va

evolucionando hacia una respuesta más específica (inmunidad adaptativa) (Vivier y Malissen, 2005).

Durante la etapa inicial de una infección del tracto urinario, las UPEC entran en contacto con el hospedero por medio de fimbrias, las cuales se adhieren a los receptores del epitelio del tracto urinario. Después de establecer este contacto, al menos una fracción de las bacterias que colonizan el tejido logran resistir las condiciones del nuevo nicho, incluyendo el flujo direccionado de la orina, y son capaces de invadir las células epiteliales. En este escenario, algunas UPEC son reconocidas y este reconocimiento induce la exocitosis de estas vesículas, expulsándolas fuera de la célula hospedero, mientras que otras pueden formar colonias intracelulares, a partir de las cuales pueden liberarse para invadir células vecinas, iniciando un nuevo ciclo. Adicionalmente, pueden generar formas bacterianas quiescentes, las que pueden permanecer por períodos prolongados en capas más profundas del tejido (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Eventualmente, las UPEC que sobreviven a las condiciones del tracto urinario bajo, pueden ascender hacia el tracto urinario superior. En el riñón, las UPEC también se adhieren al epitelio utilizando fimbrias, las que incluso poseen la capacidad de modular la respuesta inmunitaria para disminuir la opsonización y eliminación de estas bacterias, lo que facilita su supervivencia y propagación (Lane y Mobley, 2007).

La inmunidad adaptativa es ejecutada primordialmente por un componente celular, en el que las células T juegan un rol central, y por un componente humoral, ejecutado por anticuerpos producidos inicialmente por células B. En el caso de la respuesta humoral, las células B poseen inmunoglobulinas de superficie que sirven como receptores de antígenos, incluyendo componentes superficiales de bacterias. Cuando estos antígenos son reconocidos por los anticuerpos de las células B, se desencadena la proliferación y diferenciación de las células B a células de memoria y células plasmáticas capaces de secretar anticuerpos solubles (Abbas *et al.*, 2018). Estos anticuerpos protegen al hospedero de tres formas principales. En primer lugar, neutralizan los factores de virulencia de los agentes patógenos, inhibiendo así su capacidad funcional. Por ejemplo, en el caso de las fimbrias bacterianas, se inhibiría su capacidad de mediar la adherencia a receptores en los tejidos del hospedero, interfiriendo con

el ciclo patogénico. En segundo lugar, opsonizan al agente patógeno, es decir, lo marcan para facilitar su reconocimiento y eliminación por parte de otras células inmunitarias. Finalmente, como tercera opción, activan el sistema del complemento, un componente del sistema inmunitario con efectores antimicrobianos, como el complejo de ataque a membranas (Kantele *et al.*, 2008).

1.2 Las fimbrias

Las fimbrias son organelos filamentosos que se encuentran en la superficie bacteriana y su función principal es la adherencia, ya sea a tejidos del hospedero, a otras bacterias o incluso a superficies inertes. Al mismo tiempo, al estar localizadas en la superficie y proyectarse al espacio extracelular, son blancos de reconocimiento por parte del sistema inmunológico. Estas estructuras proteicas multiméricas están formadas por una o más subunidades estructurales, siendo la subunidad principal la más abundante. En la mayoría de los casos, existen otras subunidades estructurales menos abundantes, conocidas como subunidades accesorias. La adhesina, que se encuentra en el extremo distal de la fimbria, es una de estas subunidades accesorias y es la que mayoritariamente establece las interacciones involucradas en la formación de microcolonias, *biofilms*, colonización de superficies y adherencia a células hospederas, mediante el reconocimiento de receptores. Las fimbrias constituyen uno de los factores de virulencia más importantes, particularmente en el caso de las cepas UPEC (Werneburg y Thanassi, 2018).

Las fimbrias tipo 1 y tipo P son dos de las fimbrias mejor caracterizadas en *E. coli*. Producidas por las cepas UPEC, ambas desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de cistitis y pielonefritis. Este papel crucial se atribuye en parte a la capacidad de sus adhesinas, FimH (fimbria tipo 1) y PapG (fimbria P), para adherirse a los receptores presentes en las células del tracto urinario inferior y superior, respectivamente (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

En este sentido, la adhesina FimH es capaz de unirse a las uroplaquinas (UP) manosiladas e integrinas $\alpha 1\beta 3$ de las células uroteliales (Hannan *et al.*, 2012). Esta unión activa las Rho GTPasas, que reorganizan el citoesqueleto de actina, permitiendo la invasión por parte de UPEC. Este mecanismo favorece la evasión de las defensas del hospedero y de fármacos

como los antibióticos (Martinez y Hultgren, 2002). Por otro lado, PapG es capaz de unirse a globosidos que contienen glicolípidos presentes en los riñones humanos, interacción que favorece el proceso infeccioso a ese nivel (Wright y Hultgren, 2006). PapG también es capaz de modular la respuesta inmune al inhibir el transporte de inmunoglobulinas al espacio urinario, permitiendo a las UPEC evadir este mecanismo clave de inmunidad (Marklund *et al.*, 1992).

1.2.1 Clasificación de las fimbrias

La extensa diversidad de fimbrias en las bacterias ha motivado el establecimiento de sistemas de clasificación, fundamentados en sus mecanismos de ensamblaje. En el caso de bacterias Gram negativo, este sistema ha permitido la clasificación de las fimbrias en cuatro grupos: las que se ensamblan por una vía dependiente del sistema chaperona/ujier (fimbrias CU), por nucleación/precipitación extracelular, las fimbrias tipo IV y las de fertilidad conjugativa (Nuccio y Bäumlner, 2007).

Las fimbrias CU son las más comunes en bacterias Gram negativo, se forman a partir de subunidades que comienzan su síntesis en el citoplasma, donde inicialmente poseen una secuencia señal que las dirige hacia una vía secretora ubicada en la membrana citoplasmática, para su transporte al periplasma (Lycklama y Driessen, 2012). Una vez en esta zona, se elimina la secuencia señal y se cataliza la formación de enlaces disulfuro en su estructura (Totsika *et al.*, 2009). Posteriormente, cada subunidad se une a una chaperona periplásmica que asiste en su correcto plegamiento, formando así el complejo subunidad-chaperona (Crespo *et al.*, 2012), el cual migra hacia un dominio periplásmico del ujier que desplaza a la chaperona del complejo, dando inicio a la polimerización fimbrial a través del canal interno del propio ujier (Sauer *et al.*, 2002). Este proceso es iterativo y da prioridad al crecimiento a partir de la subunidad adhesina, que se despliega en primer lugar, seguida por el resto de las subunidades fimbriales (Werneburg y Thanassi, 2018).

1.2.2 Clasificación de las fimbrias CU

Los loci de las fimbrias CU se caracterizan por organizarse en su mayor parte en operones. Cada uno de estos loci codifica como mínimo la subunidad estructural principal, una

chaperona y un ujier. No es raro que los operones fimbriales incluyan genes adicionales que codifican subunidades estructurales, proteínas de ensamblaje o regulatorias (**Figura 1A**). En todos los loci de fimbrias CU conocidos hasta hoy, los genes de los ujieres son los únicos que se han encontrado en una sola copia. Ello ha facilitado la clasificación de las fimbrias CU en base al alineamiento y análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas del ujier. En este contexto, se ha establecido un esquema de clasificación de las fimbrias CU en el que se identifican hasta seis clados fimbriales distintos: α , β , γ (subclados γ_1 , γ_2 , γ_3 y γ_4), k , π y σ . De estos, los clados γ_1 y π han sido los que mayoritariamente han recibido atención, ya que contienen las fimbrias 1 y P, respectivamente (Nuccio y Bäumlner, 2007).

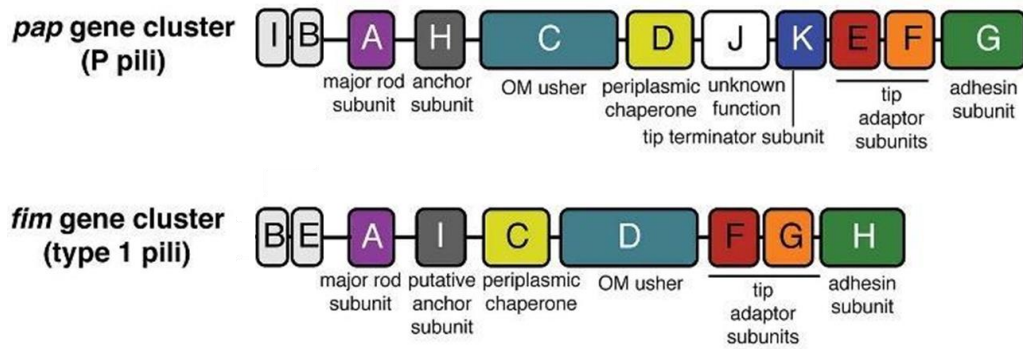
1.2.3 Fimbrias tipo 1 y tipo P

Las fimbrias tipo 1 y P se han utilizado como modelos de investigación para entender el ensamblaje y la funcionalidad de las fimbrias CU. Ambas estructuras han demostrado ser fundamentales en la adherencia de las UPEC durante el desarrollo de las ITU (Werneburg y Thanassi, 2018).

Las fimbrias tipo 1 juegan un papel crucial en la colonización del tracto urinario por UPEC y en la progresión de la cistitis (Abraham *et al.*, 1988). Son codificadas por el operón *fimBEAICDFGH* (**Figura 1A**). Los genes *fimB* y *fimE* se encuentran en la región río arriba de los genes del sistema CU (*fimAICDFGH*) y codifican recombinasas que regulan la expresión del locus. Desde el punto de vista estructural, la fimbria tipo 1 consta de varios componentes. FimA es la subunidad principal, que forma un eje helicoidal rígido que se incrusta en la membrana externa de la bacteria. FimF y FimG son subunidades adaptadoras que ayudan a la formación y funcionamiento de la fimbria. FimH es la adhesina, un componente que se encuentra en la punta de la fimbria y facilita la adherencia de la bacteria al hospedero (**Figura 1B**). FimC es la chaperona, que participa en el proceso de ensamblaje, ayudando en el correcto plegamiento de las subunidades que formarán la fimbria, en el periplasma. FimD es la proteína ujier, que cataliza la formación de las interacciones entre subunidades en el periplasma. Por último, FimI es un componente cuyo papel aún no está completamente claro. Sin embargo, se cree que podría tener un rol en el ensamblaje de la fimbria (Werneburg y Thanassi, 2018).

Las fimbrias tipo P desempeñan un papel crucial en la colonización de los riñones por las UPEC y en la progresión hacia la pielonefritis (Roberts *et al.*, 1994). Estas fimbrias están codificadas por el operón *papIBAHCDJKEFG* (**Figura 1A**). En este operón se encuentran los genes *papI* y *papB* que codifican las proteínas PapI y PapB, los cuales controlan la expresión del locus. Estructuralmente, la fimbria tipo P está compuesta por diferentes subunidades. PapA es la subunidad principal del pilus, formando un eje fimbrial helicoidal rígido. PapK, PapE y PapF son subunidades accesorias adaptadoras que contribuyen a la formación y funcionamiento de la fimbria. PapG es la adhesina, una proteína que se encuentra en la punta del pilus y facilita la adherencia de la bacteria al hospedero. PapH es una subunidad que determina la finalización del ensamblaje de la fimbria (**Figura 1B**). PapD actúa como chaperona, asistiendo en el correcto plegamiento de las proteínas que forman la fimbria, mientras que PapC es el ujier, que cataliza la formación de las interacciones entre subunidades durante el ensamblaje. Finalmente, la función de PapJ no está completamente esclarecida. Sin embargo, se piensa que podría estar implicada en mantener la integridad de la fibra del pilus durante el ensamblaje (Werneburg y Thanassi, 2018).

A



B

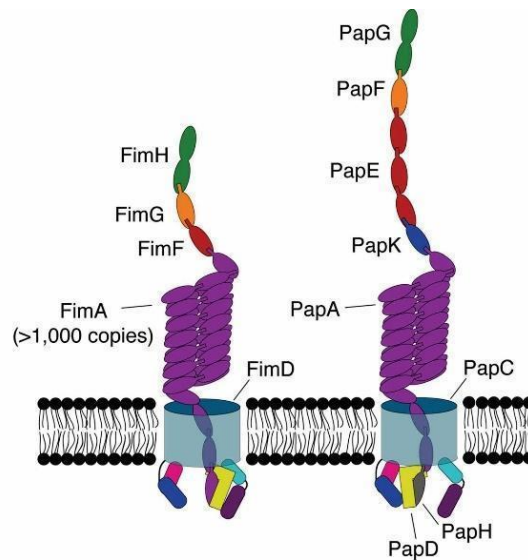


Figura 1. Loci codificantes y modelos de las fimbrias tipo 1 y P. (A) Las fimbrias tipo 1 y P son codificadas por los operones *fimBEAICDFGH* y *papIBAHCDJKEFG*, respectivamente. Estos codifican las subunidades estructurales y la maquinaria de ensamblaje, cuya expresión depende de una región reguladora ubicada río arriba. (B) Las fimbrias tipo 1 y P (de izquierda a derecha) se componen de subunidades principales (FimA y PapA, respectivamente) que forman un eje helicoidal rígido sobre el cual se estructura la fimbria, que incluye además subunidades accesorias (FimF y FimG en las fimbrias tipo 1 y PapK, PapE y PapF en las fimbrias P) y adhesinas en sus extremos distales (FimH y PapG, respectivamente) (Modificado de Werneburg y Thanassi, 2018).

1.2.4 Ujieres FimD y PapC

Las proteínas ujier son proteínas transmembrana que facilitan la formación de las fimbrias en la superficie bacteriana. Se caracterizan por su estructura de barril beta y están compuestas por múltiples dominios, cada uno con funciones específicas en el proceso de ensamblaje de las fimbrias (Volkan *et al.*, 2013).

Los ujieres FimD y PapC (**Figura 2**) son componentes clave de las fimbrias tipo 1 y P, respectivamente. Ambos comparten una identidad del 31% y una similitud del 43% a nivel de secuencia aminoacídica. A pesar de las diferencias en sus secuencias, exhiben una notable similitud estructural y emplean un mecanismo de ensamblaje parecido. Durante el ensamblaje de la fimbria, el complejo subunidad estructural-chaperona formado previamente se une al dominio N-terminal del ujier, localizado en el periplasma (Omattage *et al.*, 2018). Posteriormente, el dominio C del ujier, también periplasmático, desplaza a la chaperona del complejo y se une a la subunidad estructural, liberando así el dominio N-terminal del ujier. La unión de la subunidad al dominio C-terminal del ujier activa a este último y provoca la apertura de su lumen, el cual hasta ese punto había permanecido cerrado. La liberación del dominio N-terminal del ujier posibilita la incorporación de un nuevo complejo subunidad-chaperona. Este es un proceso iterativo que facilita la polimerización de la fimbria. La fimbria recién formada emerge a través del lumen del ujier, marcando el final de este ciclo de ensamblaje (Omattage *et al.*, 2018).

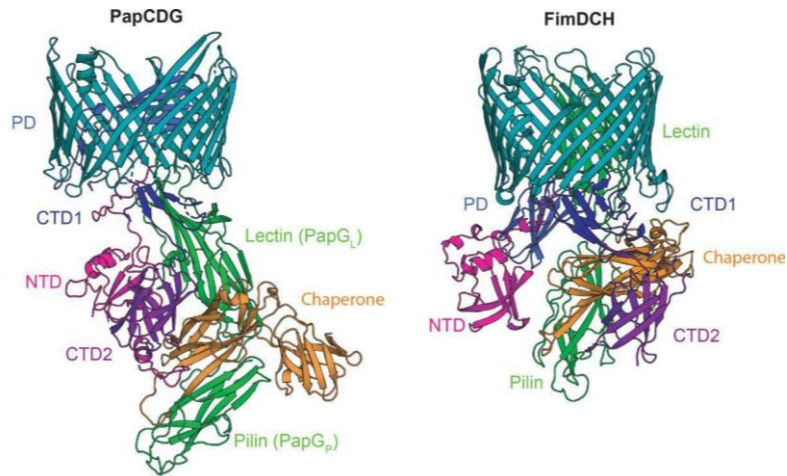


Figura 2. Ujieres FimD y PapC. Los ujieres (FimD y PapC), las chaperonas (FimC y PapD) y las adhesinas/pilinas (FimH y PapG) se muestran de mismo color en ambos modelos. Además, se muestran los dominios C- y N-terminal (CTD y NTD), importantes en el proceso de ensamblaje (Omattage *et al.*, 2018).

Los ujieres son proteínas fundamentales para el ensamblaje de las fimbrias. En línea con esto, estudios de mutación en *fimD* y *papC* confirman que estos ujieres son indispensables para la síntesis de las fimbrias tipo 1 y P, respectivamente. La eliminación de *fimD* resulta en un fenotipo sin fimbrias (Klemm y Christiansen, 1990) y, análogamente, se observó que una mutación por inserción en *papC* suprime la síntesis de fimbrias tipo P (Norgren *et al.*, 1984).

1.3 Ujieres como blancos en el desarrollo de terapias o estrategias de prevención

Las fimbrias desempeñan un papel esencial en la patogenicidad bacteriana, lo que las convierte en blancos idóneos para el desarrollo de terapias anti-virulencia, particularmente anti-adherencia. En este sentido, los estudios se han enfocado principalmente en la exploración o creación de moléculas inhibitoras que puedan interrumpir el ensamblaje de las fimbrias o bien bloquear su capacidad de adherencia (Pinkner *et al.*, 2006).

Las vacunas representan una estrategia importante en este contexto, particularmente por representar estrategias de prevención. En este escenario, las fimbrias, por su exposición superficial, se han propuesto como candidatos idóneos para el desarrollo de este tipo de formulaciones. A pesar de que los intentos por desarrollar vacunas contra fimbrias completas no han sido exitosos, las vacunas orientadas hacia las adhesinas fimbriales han mostrado

resultados significativamente mejores (Langermann *et al.*, 2000). Esta eficacia se debe en gran medida a que la vacunación con subunidades adhesinas, como FimH, promueve la producción de anticuerpos capaces de bloquear la colonización mediada por éstas. Sin embargo, se han registrado casos en los que estos anticuerpos han aumentado la unión de FimH a su receptor (Tchesnokova *et al.*, 2011).

Además del uso de adhesinas para la vacunación, se ha explorado la aplicación de proteínas recombinantes generadas mediante tecnología de fusión. Éstas incluyen antígenos que han demostrado potenciar la respuesta inmune y proporcionar mayor protección. Dichos antígenos o biomoléculas, conocidos como quimeras o proteínas de fusión, representan una alternativa prometedora en el desarrollo de vacunas (Poggio *et al.*, 2006). Los primeros estudios relacionados al uso de proteínas quiméricas como vacunas fueron abordados por Thankavel y colaboradores, quienes diseñaron proteínas quiméricas que incorporan los dominios superficiales de unión de la adhesina FimH a las células epiteliales de la vejiga. Descubrieron que los anticuerpos que se dirigían contra estos dominios superficiales de unión eran capaces de bloquear de manera efectiva la adherencia bacteriana mediada por las fimbrias tipo 1 a las células epiteliales de la vejiga (Thankavel *et al.*, 1997).

El desarrollo de estrategias contra las fimbrias ha estado enfocado primordialmente en sus adhesinas u otras subunidades estructurales superficiales. Esto tiene sentido, ya que las fimbrias y sus adhesinas están expuestas y se proyectan al espacio extracelular. En contraste, las chaperonas y los ujieres no serían tan accesibles, ya que las primeras se encuentran localizadas en el periplasma y los ujieres solo tienen algunos dominios superficiales que estarían expuestos. Por lo demás, algunas bacterias como UPEC pueden producir estructuras adicionales que podrían cubrir estos dominios superficiales, como polisacáridos mucosos (Sarkar *et al.*, 2014). A pesar de esto, existen estudios que sugieren la interacción directa entre los dominios superficiales de los ujieres y moléculas del hospedero. En la investigación de Hsiao y colaboradores, se realizó un análisis sistemático de las interacciones entre los glicosaminoglicanos (polisacáridos extracelulares humanos) y el proteoma microbiano de una cepa de *E. coli* comensal. Este análisis reveló múltiples proteínas capaces de interactuar con los glicosaminoglicanos, destacando particularmente la interacción entre el ujier YcbS y

heparina. Este estudio sugiere que YcbS podría desempeñar un papel de adhesina al establecer una interacción directa con el hospedero (Hsiao *et al.*, 2016). Por otro lado, el trabajo realizado por Roy *et al.* agrega más evidencia a este enfoque. En un modelo de ratón infectado con *E. coli* enterotoxigénica, demostraron que el sistema inmunológico responde a múltiples proteínas de la superficie bacteriana, incluyendo el mismo ujier YcbS (Roy *et al.*, 2010).

Estos hallazgos sugieren que los ujieres podrían tener un papel crucial en la interacción con el hospedero, más allá de lo que se asumía inicialmente. Los ujieres, a través de sus dominios superficiales, podrían ser objetivos atractivos, no solo porque podrían interactuar directamente con moléculas del hospedero, sino porque constituyen el poro a través del cual las fimbrias emergen. Sumado a esto, debido a la mayor conservación de los ujieres en comparación con la mayoría de las subunidades estructurales, el desarrollo de un número acotado de formulaciones con dominios superficiales podría ser útil ante una gama de distintos linajes patogénicos que producen dichas proteínas. Esto tendría un gran valor ante el desafío de desarrollar formulaciones con amplio rango de cobertura (Nuccio y Bäumlér, 2007).

En investigaciones previas, no publicadas, de nuestro grupo de investigación, se diseñaron proteínas quiméricas con los dominios superficiales de FimD y de PapC (**Figura 3**) (QFimD_{dom-sup} y QPapC_{dom-sup}), una quimera para cada ujier (la información relacionada a las secuencias y cantidad de dominios superficiales incluidas en cada quimera no se publica en este escrito por ser potencialmente protegible). Estas quimeras se utilizaron para inmunizar conejos y desarrollar anticuerpos que reconocen FimD_{dom-sup} y PapC_{dom-sup} (Genscript, Nueva Jersey, USA). Con estas construcciones disponibles, y todos los antecedentes mencionados en este trabajo de Memoria de Título, evaluamos si los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes convalecientes de infecciones por UPEC pueden reconocer los FimD_{dom-sup} y PapC_{dom-sup}. Para ello, se diseñó un modelo de expresión heteróloga para cada ujier en la cepa *E. coli* BL21ΔABCF (cepa cuádruple mutante, carente de porinas OmpA, LamB, OmpC y OmpF, diseñada especialmente para la expresión de proteínas tipo porinas). Se comprobó la presencia de FimD_{dom-sup} y PapC_{dom-sup} al analizar su reactividad con los anticuerpos dirigidos

a estos dominios, desarrollados previamente, con el fin de corroborar su exposición a la superficie. Posteriormente, se evaluó la reactividad entre el suero de pacientes pediátricos convalecientes de infecciones por UPEC y los modelos de expresión heteróloga.

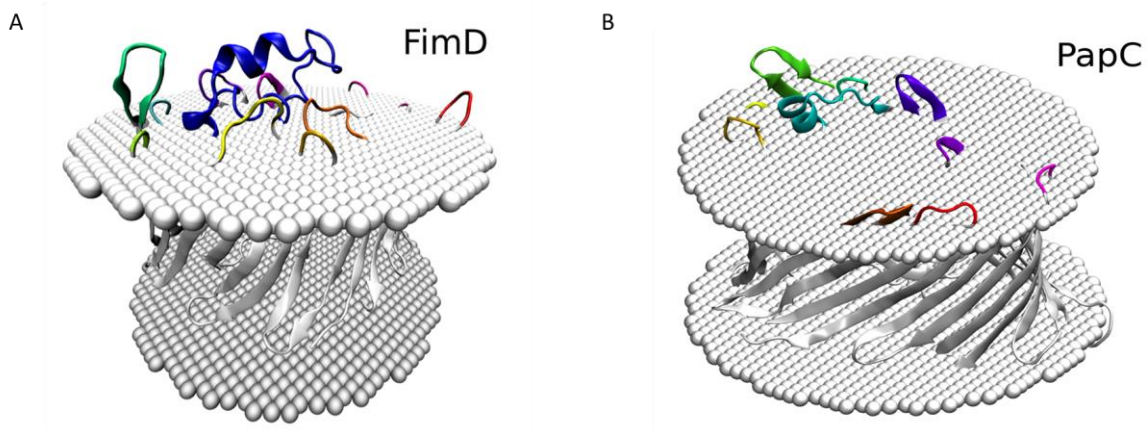


Figura 3. Disposición espacial de FimD y PapC y sus dominios superficiales. En A y B se muestra el modelamiento computacional de los ujieres FimD y PapC en una bicapa lipídica. Se indican con colores distintos, los diversos FimD_{dom-sup} y PapC_{dom-sup} (Del Canto *et al.*, sin publicar).

2. HIPÓTESIS

La expresión recombinante de las proteínas ujier FimD y PapC de *Escherichia coli* uropatogénica, en la cepa *Escherichia coli* BL21 Δ ABCF, permite la exposición de sus respectivos dominios de superficie, los que son reconocidos por anticuerpos policlonales diseñados contra estos dominios y por anticuerpos presentes en sueros de pacientes pediátricos convalecientes de infecciones urinarias por *Escherichia coli* uropatogénica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Expresar las proteínas FimD y PapC en la cepa *E. coli* BL21 Δ ABCF para ensayar sobre ella la unión de anticuerpos policlonales dirigidos contra sus dominios superficiales y de anticuerpos presentes en suero de pacientes pediátricos convalecientes de infecciones urinarias por *E. coli* uropatógena.

3.2 Objetivos específicos

1. Expresar *fimD* y *papC* en la cepa de *E. coli* BL21 Δ ABCF.
2. Determinar si existe unión de anticuerpos policlonales dirigidos contra los dominios de superficie de FimD y PapC en el modelo recombinante.
3. Determinar si existe unión de anticuerpos presentes en sueros de pacientes convalecientes de *E. coli* uropatógena contra dominios de superficie de FimD y PapC en el modelo recombinante.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Tabla 1. Reactivos usados en este estudio.

Reactivo	Marca
Agar bacteriológico	BD DIFCO
Agua grado biología molecular	CYTIVA
Ampicilina	Sigma-Aldrich
Azul de Coomassie G 250	Merck
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich
Beta mercaptoetanol	Winkler
Albúmina sérica de bovino (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromuro de etidio	Sigma-Aldrich
Caldo LB (Fórmula Lennox)	BD DIFCO
4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Desoxinucleótidos (dNTPs)	Thermo Scientific
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Thermo Scientific
Kit de extracción de ADN desde geles y mezclas	Omega Bio-Tek
<i>Buffer</i> de digestión enzimática <i>Fast Digest</i>	Thermo Scientific
<i>FastDigest KpnI</i>	Thermo Scientific
<i>FastDigest NdeI</i>	Thermo Scientific
Taq ADN polimerasa <i>GoTaq G2 Flexi</i>	Promega
<i>GoTaq Flexi buffer 5X</i>	Promega
Glutaraldehído	Calbiochem
Glicerol	Winkler

<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific
Estándar de ADN 1 Kb <i>Plus</i>	Invitrogen
<i>Buffer</i> fosfato salino (PBS)	Winkler
<i>QuantiFluor</i> ® <i>dsADN System</i>	Promega
Rojo Ponceau	Merck
Dodecil sulfato sódico (SDS)	Merck
T4 ADN ligasa	Invitrogen
T4 ADN ligasa <i>buffer</i>	Invitrogen
Tris	Calbiochem
Tween-20	Baker
Tritón X-100	Winkler
Sistema de purificación de ADN genómico <i>Wizard Genomic</i>	Promega
Sistema de purificación de plásmidos <i>Wizard Plus SV</i>	Promega
<i>Zenon</i> ™ <i>Rabbit IgG R-phycoerythrin</i>	Thermo Scientific
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	Merck
Membrana de nitrocelulosa	Sigma-Aldrich
Solución de sustrato NBT/BCIP	Thermo Scientific
Filtro de membrana con poros de 0,025 µm de diámetro	Merck
TEMED	Merck

Tabla 2. Bacterias y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas	Características	Referencia
UPEC CFT073	Cepa de UPEC prototipo, aislada desde caso de urosepsis.	Mobley <i>et al.</i> , 1990
BL21 Δ ABCF	<i>E. coli</i> BL21 cuádruple mutante, carente de proteínas OmpA, LamB, OmpC y OmpF.	Meuskens <i>et al.</i> , 2017
BL21 Δ ABCF/pVB1	BL21 Δ ABCF transformada con pVB1 vacío.	Este trabajo
BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>fimD</i>	BL21 Δ ABCF transformada con pVB1- <i>fimD</i> .	Este trabajo
BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>papC</i>	BL21 Δ ABCF transformada con pVB1- <i>papC</i> .	Este trabajo
pVB1	Vector de expresión. Tiene un promotor inducible por la adición de ácido tuólico al medio de cultivo, un origen de replicación <i>oriV</i> , un sitio de clonación múltiple (MCS) y un gen <i>bla</i> que confiere resistencia a ampicilina. También incluye un terminador, un origen de transferencia (<i>oriT</i>), y los genes <i>trfA</i> , que codifica una proteína reguladora del número de copias, y <i>xylS</i> , factor transcripcional activado por ácido tuólico.	Coloma-Rivero <i>et al.</i> , 2020
pVB1- <i>fimD</i>	gen <i>fimD</i> clonado en el plásmido pVB1.	Este trabajo
pVB1- <i>papC</i>	gen <i>papC</i> clonado en el plásmido pVB1.	Este trabajo

Tabla 3. Herramientas computacionales.

Programa	Versión	Referencia
ImageJ	1.51j8	Schneider <i>et al.</i> , 2012
Clustal Omega	1.2	Sievers <i>et al.</i> , 2011
FlowJo	10.8	BD, 2023
R	4.2.2	R Core Team, 2013
Chromas	2.6.6	https://technelysium.com.au/wp/chromas/

4.2 Métodos

4.2.1 Clonamiento de *fimD* y *papC* en pVB1

Se extrajo ADNg de la cepa prototipo UPEC CFT073 (**Tabla 2**), utilizando un sistema comercial (*Wizard Genomic ADN Purification Kit*) y siguiendo las instrucciones del fabricante. En paralelo, se purificó el vector plasmidial pVB1 (**Tabla 2**) a partir de *E. coli* DH5α previamente transformada con dicho vector (colección Laboratorio de Enteropatógenos, Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile), utilizando un sistema comercial (*Wizard Plus SV minipreps ADN purification system*). La extracción de material genético, en ambos casos, se verificó mediante separación por electroforesis (45 min a 90 V para ADNg y 90 min a 90 V para el plásmido) en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 0,5X y visualizando las bandas de ADN bajo luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio por 20 min. El material genético extraído se almacenó a -20 °C hasta su próximo uso.

Los genes *fimD* y *papC* fueron amplificados por PCR estándar desde el ADNg de UPEC CFT073 usando los partidores mostrados en la **Tabla 4**. Los partidores generaron amplicones con sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción *NdeI* y *KpnI* en los extremos 5' y 3' de cada gen, respectivamente. Las concentraciones de las mezclas de PCR se muestran en la **Tabla 5**. El programa de amplificación, incluyendo las temperaturas y tiempos de cada paso, así como el número de ciclos, se muestra en la **Tabla 6**. Los productos de la PCR se verificaron mediante electroforesis (30 min a 115 V) en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 0,5X y visualizando las bandas de ADN bajo luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio por 20 min.

Los amplicones de *fimD* y *papC* fueron purificados utilizando un sistema comercial (*Omega - E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit V-spin*), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La eficacia de la purificación se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa. Después, *fimD*, *papC* y pVB1 fueron sometidos a digestión enzimática doble (*NdeI* y *KpnI*) de forma independiente. La mezcla de digestión consistió en 2 µL *FastDigest NdeI* + 2 µL *FastDigest KpnI* + 4 µL 10X *FastDigest green buffer* + 32 µL *fimD/papC/pVB1* (aproximadamente 2 µg) por un periodo de 12 h a 37 °C y posterior inactivación enzimática durante 5 min a 80

°C. A continuación, la mezcla de digestión fue purificada utilizando un sistema comercial (*Omega - E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit V-spin*). Los genes *fimD* y *papC* fueron ligados al vector pVB1 utilizando ADN T4 ligasa, con la siguiente mezcla de reacción: 2 µL pVB1 (aproximadamente 100 ng) + 4 µL *T4 ADN Ligase Buffer* + 1 µL ADN ligasa + 13 µL *fimD/papC* (aproximadamente 300 ng), incubando por 1 h a 25 °C. Como control, se preparó una mezcla en ausencia de los genes (*fimD/papC*), la que se procesó en paralelo, siguiendo exactamente el mismo procedimiento. Finalmente, la mezcla de ligación fue dializada con filtros de nitrocelulosa con poros de 0,025 µm de diámetro, en placas Petri con agua grado biología molecular, por 20 min, y almacenada a 4 °C hasta la electroporación.

Por otro lado, un preinóculo de BL21ΔABCF cultivado toda la noche en caldo LB (16-20 h, 30 °C, agitación a 200 RPM) fue diluido 1:100 en caldo LB y cultivado (30 °C, 200 RPM) hasta alcanzar fase exponencial media ($DO_{600nm} \sim 0,5$). La suspensión fue centrifugada (10.000 x g, 2 min, 4 °C) y se recuperó el sedimento, el cual fue lavado hasta 3 veces con agua grado biología molecular a 4 °C, centrifugado, resuspendido en glicerol 10% y reservado a -80 °C hasta su próximo uso. A la suspensión bacteriana del paso anterior se le agregó la mezcla de ligación dializada y se transfirió toda esta mezcla a una cubeta de electroporación, para someter a pulso eléctrico de 2500 V (4 – 5 ms). Seguido, se recuperó la mezcla en medio SOC por 2 h a 30 °C, posteriormente, se sembró en placas de agar LB conteniendo Amp 100 µg/mL, para incubarse por 16-20 h a 37 °C.

Múltiples colonias se seleccionaron y respaldaron, por subcultivo, en agar LB conteniendo Amp 100 µg/mL. Aproximadamente 10 colonias bacterianas fueron utilizadas para verificar el clonamiento. Para ello, se obtuvo un lisado bacteriano por suspensión de cada colonia en 200 µl de Tritón X-100 al 0,5% e incubación a 100 °C durante 10 min. El lisado se centrifugó a 10.000 x g durante 8 min y, a partir del sobrenadante, se realizó una PCR de confirmación (mezcla de reacción y condiciones de amplificación en **Tabla 5** y **Tabla 6**, respectivamente) para verificar la presencia de los insertos (genes *fimD* y *papC*) utilizando partidores que reconocen los extremos del MCS de pVB1 (**Tabla 4**). De las colonias positivas al PCR, se purificó el plásmido recombinante utilizando un sistema comercial (*Wizard Plus SV minipreps ADN purification system*). El plásmido recombinante purificado se sometió a PCR,

digestión doble (como en los pasos anteriores) y secuenciación por método de Sanger. La identidad de los plásmidos de las bacterias transformadas (BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD*, BL21 Δ ABCF/pVB1-*papC*) se confirmó por secuenciación Sanger y alineamiento con sus respectivas secuencias de referencia de la cepa UPEC CFT073 (código de acceso GeneBank CP051263.1). Estas bacterias se almacenaron a -80 °C en suspensiones en caldo LB conteniendo glicerol 50%.

Tabla 4. Partidores de PCR usados en este estudio.

Segmento por amplificar	Orientación del partidor	Secuencia 5' - 3'
<i>fimD</i>	Directo	AGCCATATGTCATATCTGAATTAAAGACTTTAC
<i>fimD</i>	Reverso	AGCGGTACCTTAACGACATTCAGCTGATAGC
<i>papC</i>	Directo	AGCCATATGAAAGACAGAATACCTTTTGCAG
<i>papC</i>	Reverso	AGCGGTACCTTATTTCTGAGGCGTACAGGG
pVB1-MCS	Directo	GATAGGGATAAGTCCAGCCT
pVB1-MCS	Reverso	CGGTGGATGACCTTTTGAAT

Tabla 5. Mezcla de reacción para PCR.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
<i>Buffer 5X</i>	5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,5	0,2 mM
Partidor 1 (10 μM)	1	0,4 μM
Partidor 2 (10 μM)	1	0,4 μM
<i>GoTaq ADN Polymerase</i> (5 U/ μL)	0,125	0,025 U/ μL
ADN	1	-
H ₂ O libre de nucleasas	14,875	-
Total	25	-

Tabla 6. Programa de amplificación para PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)	Ciclos	Etapa
94	5:00	1	Desnaturación
94	00:30	30	Desnaturación
*	00:30		Hibridación
72	2:00		Extensión
72	10:00	1	Extensión

*Temperaturas de hibridación *fimD*: 56 °C, *papC*: 59 °C, pVB1-MCS: 54 °C

4.2.2 Inducción de la expresión de *fimD* y *papC* clonados en pVB1

Se cultivó un preinóculo de las bacterias transformadas (BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD* o BL21 Δ ABCF/pVB1-*papC*) en caldo LB conteniendo Amp 100 μ g/mL, durante aproximadamente 16 h a 30 °C y en agitación a 200 RPM. Este preinóculo fue diluido (1:100) y cultivado en caldo LB conteniendo Amp 100 μ g/mL a 30 °C bajo agitación a 200 RPM hasta alcanzar fase exponencial media ($DO_{600nm} \sim 0,5$). Finalmente, se indujo la expresión de los genes *fimD* y *papC* adicionando ácido toluico 200 mM e incubando el cultivo durante 2 h a 30 °C en agitación a 200 RPM. Como control, se siguió el mismo procedimiento para las cepas BL21 Δ ABCF y BL21 Δ ABCF/pVB1.

4.2.3 Detección de FimD y PapC en extractos totales mediante WB

Habiéndose inducido la expresión de las bacterias transformadas, se tomó un volumen conteniendo aproximadamente 4×10^8 UFC, se centrifugó a 10.000 x g por 2 min a temperatura ambiente (TA) y se descartó el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en 160 μ L de PBS y se adicionó 40 μ L de tampón Laemmli 5X (0,125 M Tris HCl pH 6,8, glicerol 50%, SDS 5%, beta mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,05%). La suspensión se hirvió por 10 min y se centrifugó a 12.000 x g por 5 min a TA. Un volumen de 10 μ L del sobrenadante (extracto total) fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE). Se utilizaron dos geles, cargados con el mismo grupo de muestras, y la electroforesis transcurrió en una solución tampón (25 mM Tris, 190 mM glicina y 0,1% SDS) a voltaje constante en 2 tiempos (30 min a 60 V y 2 h a 100V). Uno de los geles fue teñido con una solución de azul Coomassie G-250 y luego desteñido con múltiples lavados con agua. El segundo gel fue sometido a electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa por 1 h a 100 V usando un *buffer* de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol), dentro del sistema Mini Trans-Blot cell de Bio-Rad. Una vez terminada la transferencia, los sitios de unión no específica de la membrana se bloquearon con BSA 1% en T-TBS, durante 16-20 h a 4 °C. Se realizó tres lavados con T-TBS de 5 min cada uno. Luego, la membrana fue incubada con anticuerpos policlonales dirigidos contra los dominios superficiales de FimD (anti-FimD_{dom-sup}) o de PapC (anti-PapC_{dom-sup}), en una dilución 1:1.000 en BSA 1% en T-TBS por 1 h a TA. Los anticuerpos

policlonales anti-FimD_{dom-sup} y anti-PapC_{dom-sup} fueron obtenidos solicitando el servicio de producción a la empresa especializada Genscript (Servicio PolyExpress™). Estos fueron desarrollados en conejos, los que fueron inmunizados con proteínas quiméricas conteniendo regiones representativas de los dominios superficiales de cada proteína, FimD o PapC, por separado (QFimD_{dom-sup} y QPapC_{dom-sup}, respectivamente). Los anticuerpos fueron purificados a partir del suero de los animales, mediante cromatografía de afinidad al antígeno. Posteriormente, las membranas fueron lavadas en tres ocasiones con T-TBS durante 5 min por cada lavado, y se incubó con el anticuerpo secundario, IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch), en una dilución de 1:1000 en BSA 1% en T-TBS, por 1 h a TA. Se realizó tres lavados con T-TBS y un lavado adicional con agua destilada para finalmente revelar la presencia de bandas inmunoreactivas adicionando 5 mL de una solución de sustrato de cloruro de nitroazul de tetrazolio y sal de p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato (NBT/BCIP) por 5 min.

4.2.3 Detección de FimD y PapC mediante citometría de flujo

Se realizó la detección de la expresión heteróloga de FimD_{dom-sup} y PapC_{dom-sup} en BL21ΔABCF mediante citometría de flujo, utilizando los anticuerpos anti-FimD_{dom-sup} y anti-PapC_{dom-sup} sobre bacterias completas, no permeabilizadas. Para ello se tomó dos alícuotas conteniendo por separado aproximadamente 4×10^8 UFC del cultivo de BL21ΔABCF/pVB1-*fimD* y BL21ΔABCF/pVB1-*papC* inducidos y fijados con glutaraldehído 2,5% en PBS durante 20 min a TA. Luego de tres lavados con PBS se incubó con BSA 1% en PBS durante 16-20 h a 4 °C y después se lavó 3 veces con PBS. La suspensión bacteriana en PBS se incubó con los anticuerpos anti-FimD_{dom-sup} o anti-PapC_{dom-sup}, los que fueron conjugados previamente con ficoeritrina (FE) mediante un sistema comercial (*Zenon™ Rabbit IgG R-phycoerythrin*). Se lavó 3 veces con PBS, se incubó con DAPI 1 µg/mL por 30 min, se lavó nuevamente 3 veces con PBS y se realizó el análisis por citometría de flujo en un citómetro BD LSR Fortessa X-20, perteneciente a la Red de Equipamiento Científico Avanzado (REDECA) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las condiciones de estos ensayos fueron establecidas previamente realizando

lecturas mediante fluorimetría, utilizando un multilector de placas (BioTek™ Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader, datos no mostrados).

Por otro lado, se determinó si las proteínas FimD y PapC, expresadas de forma recombinante en BL21 Δ ABCF, eran reconocidas por anticuerpos contenidos en sueros de pacientes pediátricos convalecientes de infecciones urinarias por *Escherichia coli*. Las muestras de suero fueron obtenidas de pacientes que acudieron al Servicio de Urgencia del Hospital de Niños Dr. Roberto del Río entre 2021 y 2022 (Procedimientos aprobados por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Proyecto 078-2020) y fueron colectadas entre uno y tres meses después de diagnosticada la infección. Al igual que en el caso anterior, la determinación del reconocimiento se realizó mediante citometría de flujo. Para ello, se tomó dos alícuotas conteniendo, por separado, aproximadamente 4×10^8 UFC del cultivo de BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD* o de BL21 Δ ABCF/pVB1-*papC*, inducidos y fijados con glutaraldehído 2,5% en PBS durante 20 min a TA. Luego de tres lavados con PBS se incubó con BSA 1% en PBS durante 16-20 h a 4 °C y después se lavó 3 veces con PBS. Posteriormente, las suspensiones bacterianas en PBS se incubaron por 1 h a TA con los sueros humanos inactivados (inactivación del complemento por tratamiento a 56 °C por 30 min), diluidos 1:1000 (en una solución de BSA 1% en PBS). Se lavó 3 veces con PBS y se incubó por 1 h a TA con un anticuerpo secundario, anti-IgG humano desarrollado en cabra, conjugado con ficoeritrina (FE, Invitrogen 12-4998-82), diluido 1:1000 (BSA 1% en PBS). Se lavaron las suspensiones 3 veces con PBS, se incubaron con DAPI 1 μ g/mL por 30 min y, finalmente se lavaron 3 veces con PBS para realizar el análisis por citometría de flujo.

4.2.4 Estudio de la reactividad de los FimD_{dom-sup} y PapC_{dom-sup} con suero humano mediante dot blot

Se instaló una membrana de nitrocelulosa humedecida con agua destilada en un dispositivo de dot-blot (*Bio Dot apparatus*) y sus agujeros fueron cargados con 1000, 500 o 100 ng de QFimD_{dom-sup} (0,299 μ g/ μ L) y QPapC_{dom-sup} (1 μ g/ μ L), previamente cuantificadas por método de Bradford. Se incubó por 5 min a TA, se drenaron los agujeros utilizando una bomba de vacío y se lavó la membrana con agua, una vez, para luego incubar con rojo Ponceau,

obteniéndose una visualización preliminar de las muestras en la membrana. Se lavó una vez por 1 min, a TA, con agua, hasta remover la tinción. Luego, se lavó la membrana con TBS-T en agitación durante 10 min, 3 veces, y se incubó con BSA 1% en T-TBS por 16-20 h a 4 °C. Se incubó con 20 µL de suero humano (concentración de proteína no normalizada) inactivado por calor por 1 h. Posteriormente, se lavó la membrana con TBS-T en agitación, durante 10 min, 3 veces. Se incubó, por 1 h a TA, con un anticuerpo secundario, anti-IgG humano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch 109-055-008), diluido 1:1000 en BSA 1% en TBS-T. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-T con agitación durante 10 min. Se lavó la membrana con agua destilada para finalmente revelar la presencia de muestras inmunoreactivas agregando 5 mL de una solución de sustratos de NBT/BCIP e incubando por 5 min a TA.

4.2.5 Análisis de datos

Se cuantificó la intensidad de los puntos en el *dot blot* con el software ImageJ (**Tabla 3**). El alineamiento de las secuencias derivadas de la secuenciación por método de Sanger se realizó con Clustal Omega (**Tabla 3**). Los datos de citometría de flujo fueron analizados con el software FlowJo (**Tabla 3**). Los gráficos de columnas apiladas, histogramas, gráficos de densidad acumulada, gráfico de violín, gráfico de cajas y bigotes, análisis de correlación, ANOVA y post-tests, se realizaron utilizando R. Los valores de intensidad de fluorescencia fueron escalados por un factor de 10^{-6} previo al ANOVA. Las líneas de código personalizadas en R (**Tabla 3**) quedan disponibles en el repositorio de GitHub (<https://github.com/lavalle17>).

5. RESULTADOS

5.1 Expresión heteróloga de FimD y PapC en *E. coli* BL21 Δ ABCF

Para lograr la expresión heteróloga de FimD y PapC en *E. coli* BL21 Δ ABCF, se amplificaron los genes *fimD* y *papC* a partir de ADN_g de la cepa *E. coli* UPEC CFT073, mediante PCR estándar. El vector de expresión pVB1 y los amplicones fueron digeridos y posteriormente ligados. Seguido, la cepa *E. coli* BL21 Δ ABCF fue transformada con las mezclas de ligación. La transformación resultó en numerosas colonias que portan plásmidos recombinantes. Se estudió la presencia de los insertos *fimD* y *papC* en el vector plasmidial mediante PCR a partir de lisados bacterianos utilizando partidores que hibridan con las secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del MCS de pVB1. Los amplicones, correspondientes a cada una de las colonias analizadas, fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa donde se distinguió bandas cercanas a los tamaños esperados para las colonias positivas (longitud genes: *fimD* 2637 bp, *papC* 2511 bp, bandas esperadas alrededor de los 3000 bp, considerando amplificación de secuencias flanqueantes) (**Figuras 4A y 4B**, para *fimD* y *papC*, respectivamente). Se ejecutó el mismo análisis con los vectores recombinantes purificados de las colonias positivas del paso anterior y, como resultado, se observaron las bandas de los tamaños esperados en la mayoría de los casos analizados (vectores recombinantes positivos) (**Figura 4C**).

Adicionalmente, se verificó el clonamiento mediante digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *KpnI*. Para ello, los vectores recombinantes purificados a partir de las colonias positivas, seleccionadas del análisis anterior, fueron digeridos con estas enzimas. El análisis por electroforesis de los fragmentos digeridos muestra bandas ubicadas en 3 distintos tamaños aproximados: 3000, 7000 y 10000 pb, que corresponden a los insertos (*fimD* o *papC*), al vector lineal vacío (longitud 6762 bp) y al vector recombinante digerido parcialmente, respectivamente (**Figura 4D**).

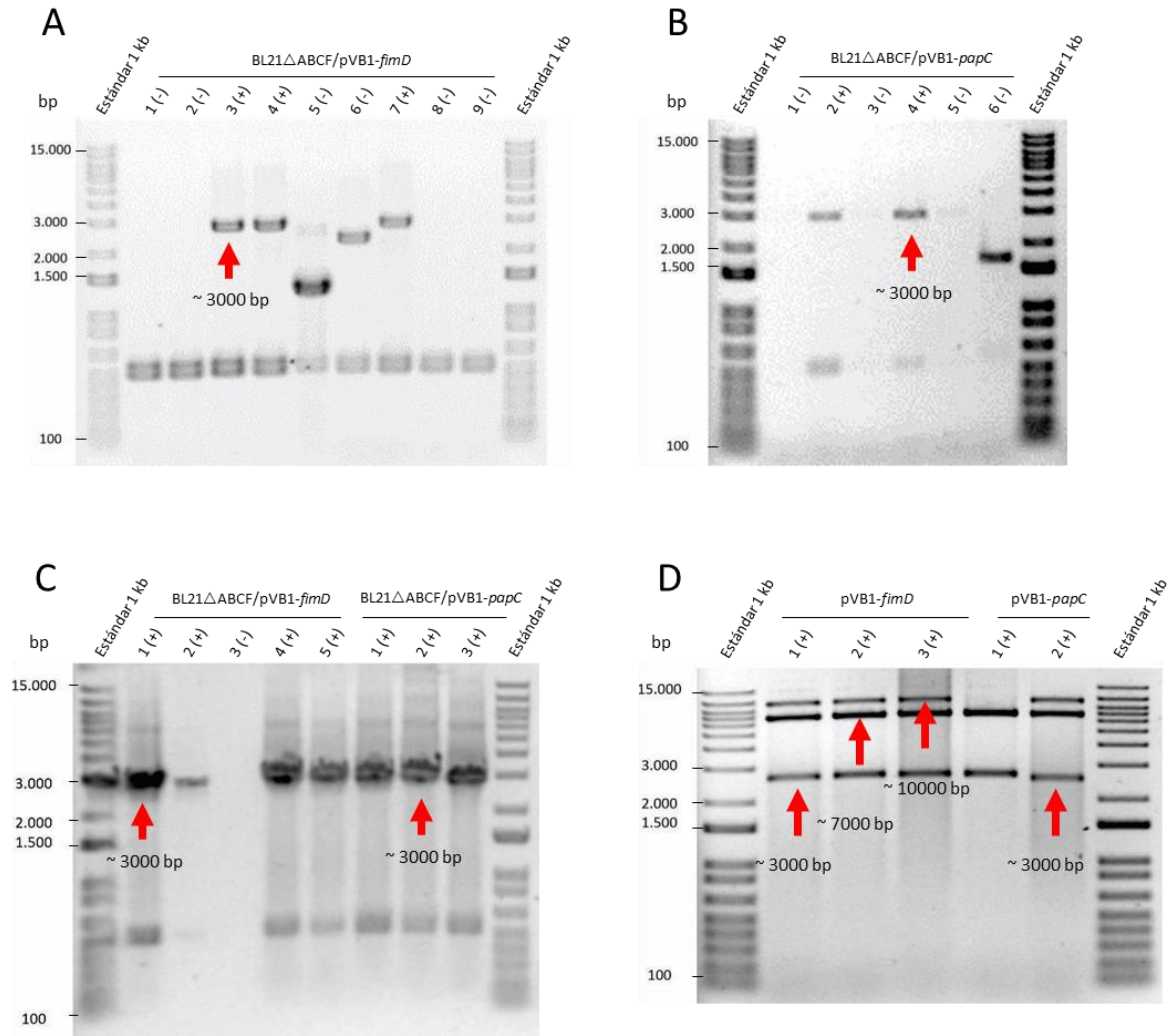


Figura 4. Verificación del clonamiento de *fimD* y *papC* en *E. coli* BL21ΔABCF. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de los lisados de las colonias BL21ΔABCF/pVB1-*fimD* y BL21ΔABCF/pVB1-*papC* para confirmar los insertos *fimD* y *papC*, respectivamente, utilizando partidores que flanquean los extremos 5' y 3' del sitio de múltiple clonamiento, (A) y (B). Se muestran bandas de ~3000 pb, valor cercano a los tamaños de *fimD* y *papC* (~2600 y ~2500 pb) sumados con los ~300 pb que hay en total entre el sitio de restricción donde se insertaron *fimD* y *papC* y las regiones de alineamiento de cada uno de los partidores. Un análisis similar se realizó a partir de los vectores plasmidiales recombinantes purificados (C). Al igual que en el ensayo anterior, se muestran bandas de ~3000 pb. Para continuar con el análisis, se hizo una electroforesis en gel de agarosa de la mezcla de digestión de los vectores plasmidiales recombinantes purificados con las enzimas de restricción *NdeI* y *KpnI* (D). Se muestran bandas de ~3000, ~7000 y ~10000 pb, estos son tamaños cercanos a *fimD* (~2600 pb), *papC* (~2500 pb), pVB1 (~6700 pb), pVB1-*fimD* (~9300 pb) y pVB1-*papC* (~9200 pb). Las flechas rojas señalan los valores aproximados de las bandas. Como referencia de tamaño se utilizó el Estándar de ADN 1 Kb *Plus* (Invitrogen). El control negativo de todas las reacciones de PCR corresponde a la amplificación sin ADN (solo agua), resultados no mostrados. El control negativo de la digestión enzimática corresponde a la digestión de pVB1 vacío, resultados no mostrados.

Como última instancia de verificación del clonamiento, se secuenciaron los insertos clonados en el MCS de los vectores recombinantes, por el método Sanger. Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias de los genes *fimD* y *papC* de la cepa UPEC CFT073 (código de acceso GeneBank CP051263.1) (**Figuras 5A y 5B**).

A

```

TCATGAACATATGTCATATCTGAATTTAAGACTTTACCAGCGAAACACACAGTGCCTTGCA 120
-----ATGTCATATCTGAATTTAAGACTTTACCAGCGAAACACACAGTGCCTTGCA 50
*****

TATTCGTAAGCATCGTTTGGCTGGTTTTTTTTGTCCGGCTCTTTGTTGCCCTGTGCTTTTGC 180
TATTCGTAAGCATCGTTTGGCTGGTTTTTTTTGTCCGGCTCTTTGTTGCCCTGTGCTTTTGC 110
*****

CGCACAGGCACCTTTGTCTATGCGCAACTCTATTTAACCCGCGTTTTTATAGCGGATGA 240
CGCACAGGCACCTTTGTCTATGCGCAACTCTATTTAACCCGCGTTTTTATAGCGGATGA 170
*****

TCCCCAGGCTGTGGCTGATTATCGCGTTTTGAGAATGGGT----- 281
TCCCCAGGCTGTGGCTGATTATCGCGTTTTGAGAATGGGCAAGAATTACCGCCAGGGAC 230
*****

```

B

```

GGAGTCATGAACATATGAAAGACAGAATACCTTTTGCAGTCAACAATATTACCTGTGTGA 60
-----ATGAAAGACAGAATACCTTTTGCAGTCAACAATATTACCTGTGTGA 46
*****

TATTGTTGTCTCTGTTTTGTAACGCAGCCAGTGCCTTGAGTTTAATACAGATGACTTG 120
TATTGTTGTCTCTGTTTTGTAACGCAGCCAGTGCCTTGAGTTTAATACAGATGACTTG 106
*****

ACGCGGCGGACAAGAAAAATTTGACTTCACCCGTTTTTTCAGAAAGCCGGTTATGTTCTGC 180
ACGCGGCGGACAAGAAAAATTTGACTTCACCCGTTTTTTCAGAAAGCCGGTTATGTTCTGC 166
*****

CGGGCAATATCTTCTGGATGTGATTGTTAACGGGCAAAGTATTCTCCGCATCGTTAC 240
CGGGCAATATCTTCTGGATGTGATTGTTAACGGGCAAAGTATTCTCCGCATCGTTAC 226
*****

AGATTTTCATTGTTGAACCTCAGTCGTAGGAGATAAGGCAGAAAAAAATTTGCCACAGG 300
AGATTTTCATTGTTGAACCTCAGTCGTAGGAGATAAGGCAGAAAAAAATTTGCCACAGG 286
*****

CCTGTCTGACCTCAGATATGGTCAGACTGATGGGTTAACAGCAGAATCTCTGGATAAAG 360
CCTGTCTGACCTCAGATATGGTCAGACTGATGGGTTAACAGCAGAATCTCTGGATAAAG 346
*****

TTGTTTACTGGCATGATGGTCAGTGTGCGGATTTTCATGGGTTGCCGGGAGTGGATATTC 420
TTGTTTACTGGCATGATGGTCAGTGTGCGGATTTTCATGGGTTGCCGGGAGTGGATATTC 406
*****

GTCCTGATACCGSAGCGGGCGTATTACGCATCAATATGCCGAGGCTGGCTTGAGTATT 480
GTCCTGATACCGSAGCGGGCGTATTACGCATCAATATGCCGAGGCTGGCTTGAGTATT 466
*****

CTGATGCCACCTGGCTGCTCCCTCACGCTGGGACGACGGCATTCCCGACTGATGCTGG 540
CTGATGCCACCTGGCTGCTCCCTCACGCTGGGACGACGGCATTCCCGACTGATGCTGG 526
*****

ATTATAACCTCAACGGGACGGTTTTCCCGTAATTATCAGGGAGGAGACTCTCAT----- 593
ATTATAACCTCAACGGGACGGTTTTCCCGTAATTATCAGGGAGGAGACTCTCATAGTTCA 586
*****

```

Figura 5. Verificación del clonamiento de *fimD* y *papC* en *E. coli* BL21ΔABC_F. Se obtuvo la secuencia de los insertos en los vectores recombinantes pVB1-*fimD* y pVB1-*papC*. Las secuencias obtenidas (mostradas en la primera fila del alineamiento) se alinearon con *fimD* y *papC* de la cepa UPEC CFT073 (código de acceso *GeneBank* CP051263.1) (segunda fila del alineamiento) (**A** y **B**). Los números al final de las filas indican la posición relativa para cada secuencia, los asteriscos o espacios indican concordancia o discordancia en el alineamiento, respectivamente. De las secuencias alineadas, solo *papC* (**B**), muestra una discordancia con su secuencia de referencia (flecha roja). Las secuencias fueron depuradas analizando sus electroferogramas con el software Chromas (**Tabla 3**).

Habiéndose confirmado que los genes *fimD* y *papC* fueron clonados en el vector pVB1 (pVB1-*fimD* y pVB1-*papC*, respectivamente), y que la cepa *E. coli* BL21 Δ ABCF fue transformada exitosamente de forma independiente con cada uno de estos vectores (cepas BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD* y BL21 Δ ABCF/pVB1-*papC*, respectivamente), se indujo la expresión de estos genes. Para saber si existen diferencias entre los perfiles proteómicos de las cepas transformadas con los plásmidos recombinantes respecto a sus controles (cepa sin transformar y transformada con el vector vacío), todas bajo inducción con ácido tuólico, se hizo una separación por SDS-PAGE de los extractos totales de cada cepa y los geles derivados de esta se tiñeron con azul de Coomassie (**Figura 6A**). No se observaron diferencias notables en los perfiles de migración, ni de intensidad. Para confirmar la expresión de *fimD* y *papC*, se hizo un análisis mediante WB a partir de los mismos extractos totales, previamente separados por SDS-PAGE. Se revelaron bandas inmunoreactivas de aproximadamente 15 kDa en los controles positivos de FimD y PapC (QFimD_{dom-sup} y QPapC_{dom-sup}, 11,9 kDa y 11,4 respectivamente). También se revelaron bandas de aproximadamente 100 kDa en los extractos totales bacterianos de las cepas transformadas con los vectores recombinantes (**Figuras 6B y 6C**). Estos valores son cercanos a los de FimD y PapC (95,5 kDa y 91,5 kDa, respectivamente) según la base de datos UniProt.

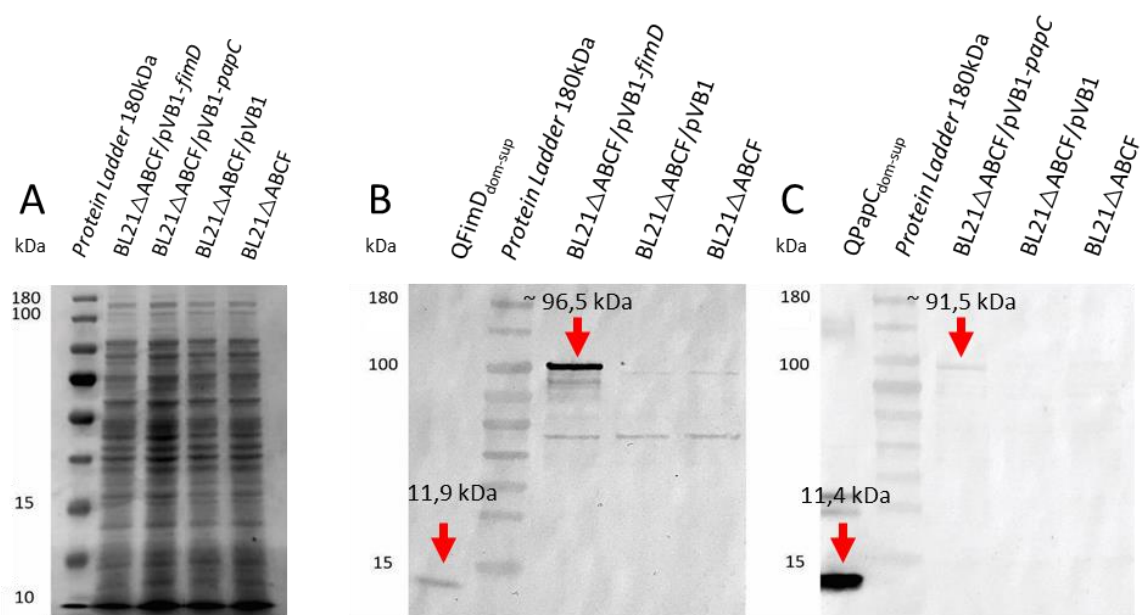


Figura 6. Detección de FimD y PapC mediante WB en extractos totales bacterianos de las cepas BL21ΔABCF/pVB1-*fimD* y BL21ΔABCF/pVB1-*papC*. Para evaluar la expresión de *fimD* y *papC*, los extractos totales de las cepas indicadas inducidas fueron analizados por electroforesis y WB. (A) SDS-PAGE de extractos totales de las cepas indicadas. (B y C) Detección de FimD y PapC (95,5 kDa y 91,5 kDa, respectivamente) por WB sobre extractos totales de las cepas indicadas, utilizando anticuerpos anti-FimD_{dom-sup} y anti-PapC_{dom-sup}. Las proteínas QFimD_{dom-sup} y QPapC_{dom-sup} fueron usadas como control positivo, estas poseen tamaños teóricos de 11,9 kDa y 11,4 kDa, respectivamente. Como marcador de peso molecular se utilizó *PageRuler Prestained Protein Ladder* 180 kDa (Thermo Scientific).

5.2 Anti-FimD_{dom-sup} reconoce los dominios superficiales de FimD en BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD*

Para evaluar la exposición de los dominios superficiales de FimD y PapC en el modelo recombinante, se utilizaron los anticuerpos anti-FimD_{dom-sup} y anti-PapC_{dom-sup} para detectar cada proteína en las cepas BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD* y BL21 Δ ABCF/pVB1-*papC*, respectivamente (**Tabla 7**). En cada caso, los anticuerpos conjugados previamente con FE se incubaron con las cepas fijadas post-inducción de la expresión de *fimD* y *papC*, respectivamente. La unión fue detectada y cuantificada por citometría de flujo. Se preprocesaron los datos recopilados para seleccionar grupos homogéneos de bacterias en base a su tamaño y complejidad (*gating*). Usando estos datos, se crearon histogramas de la intensidad de fluorescencia emitida por cada bacteria (**Figuras 7A y 7C**). En los histogramas, un desplazamiento de la distribución hacia valores superiores en comparación de sus controles indica la unión preferente de los anticuerpos a las cepas recombinantes. El desplazamiento de la dispersión de “R1 FimD” en el experimento “R1” respecto a sus controles “R1 pVB1” y “R1 BL21” confirma la unión preferente de anti-FimD_{dom-sup} a los dominios superficiales de FimD (**Figura 7A**). No se observó lo mismo con el experimento “R2”, donde no existe un desplazamiento de la distribución de “R2 PapC” respecto a sus controles “R2 pVB1” y “R2 BL21” (**Figura 7C**). Para mejorar la visualización del cambio de la distribución, con los mismos datos preprocesados se generaron gráficos de distribución acumulada de la intensidad de fluorescencia de cada bacteria (**Figuras 7B y 7D**). El desplazamiento de la distribución en “R1” se confirmó (**Figura 7B**), no así para “R2” (**Figura 7D**).

Tabla 7. Diseño experimental del ensayo de unión de los anticuerpos anti-FimD_{dom-sup} y anti-PapC_{dom-sup} a las proteínas FimD y PapC expresadas por BL21ΔABCF/pVB1-*fimD* y BL21ΔABCF/pVB1-*papC*.

Experimento	Anticuerpo	Cepa	Condición	Abreviación
R1	anti-FimD _{dom-sup}	BL21ΔABCF/pVB1- <i>fimD</i>	estudio	R1 FimD
R1	anti-FimD _{dom-sup}	BL21ΔABCF/pVB1	control	R1 pVB1
R1	anti-FimD _{dom-sup}	BL21ΔABCF	control	R1 BL21
R2	anti-PapC _{dom-sup}	BL21ΔABCF/pVB1- <i>papC</i>	estudio	R2 PapC
R2	anti-PapC _{dom-sup}	BL21ΔABCF/pVB1	control	R2 pVB1
R2	anti-PapC _{dom-sup}	BL21ΔABCF	control	R2 BL21

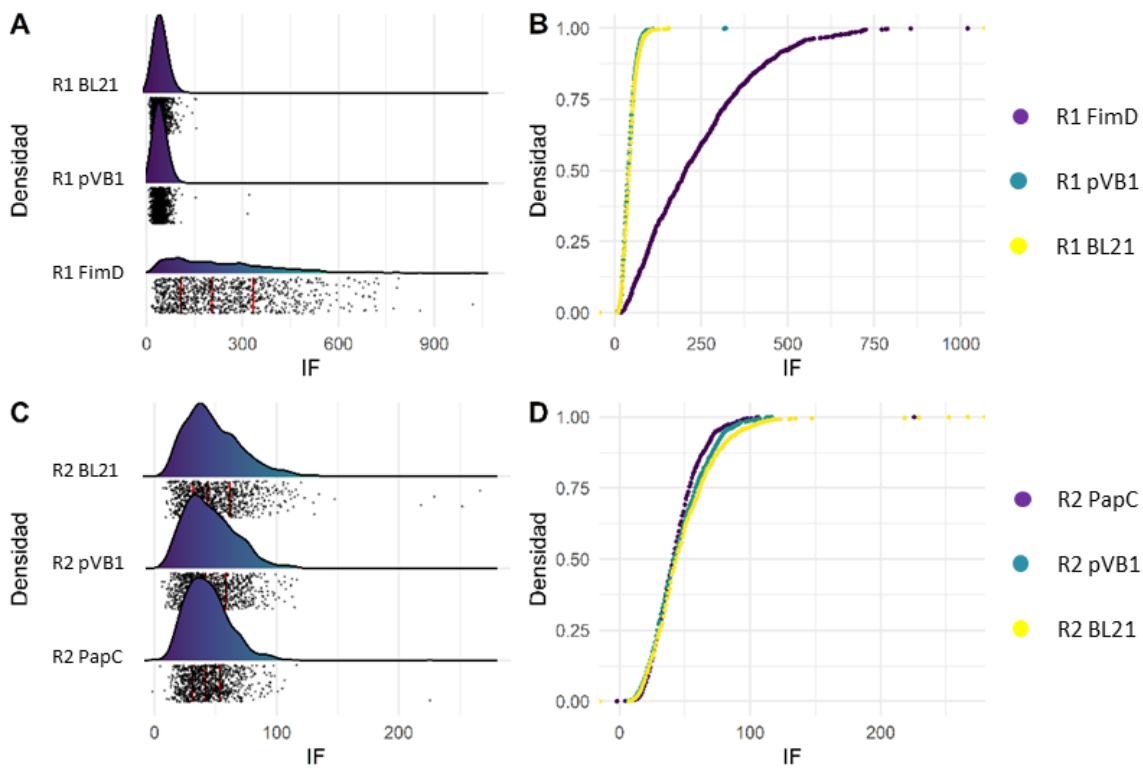


Figura 7. Detección de FimD y PapC con anticuerpos anti-FimD_{dom-sup} y anti-PapC_{dom-sup} en BL21ΔABCF/pVB1-*fimD* y BL21ΔABCF/pVB1-*papC* por citometría. Histogramas de la intensidad de fluorescencia emitida por BL21ΔABCF/pVB1-*fimD* (R1 FimD) (A) y BL21ΔABCF/pVB1-*papC* (R2 PapC) (C) junto a sus respectivos controles (BL21ΔABCF/pVB1 y BL21ΔABCF), durante el proceso de detección con anticuerpos anti-FimD_{dom-sup} o anti-PapC_{dom-sup} conjugados con FE. Gráficos de distribución acumulada de la intensidad de fluorescencia de las cepas BL21ΔABCF/pVB1-*fimD* (B) y BL21ΔABCF/pVB1-*papC* (D).

5.3 Los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC reconocen FimD expresada por BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD*

La importancia de los ensayos de unión de anti-FimD_{dom-sup} y anti-PapC_{dom-sup} a FimD_{dom-sup} y PapC_{dom-sup}, respectivamente, radica en que de esta forma se puede asegurar que dichos dominios superficiales efectivamente se encuentran en las cepas recombinantes o al menos su expresión se distingue de sus controles. Solo así es posible distinguir si en los sueros de pacientes convalecientes de ITU, causada por UPEC, existen anticuerpos capaces de unirse a los dominios superficiales de los ujieres estudiados. Debido a que los ensayos de citometría previos no demuestran la expresión de PapC_{dom-sup} en BL21 Δ ABCF/pVB1-*papC* que se distinga de sus controles, solo BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD* fue usado en los análisis posteriores. Los sueros de pacientes convalecientes de ITU, causada por UPEC, se incubaron con las cepas BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD*, BL21 Δ ABCF/pVB1 y BL21 Δ ABCF (**Tabla 8**). Los anticuerpos presentes en el suero humano fueron detectados con anticuerpos anti-IgG humano, conjugados con FE, cuya señal se detectó y cuantificó mediante citometría de flujo. Los datos fueron preprocesados como en el ensayo previo (sección 5.2) y se generaron histogramas. Se observa un cambio en la dispersión de los datos de intensidad de fluorescencia de BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD* (FimD), en los tres experimentos independientes (E1, 2 y 3) respecto a sus controles (pVB1 y BL21) (**Figuras 8A, 8C y 8E**). Con los datos preprocesados se generaron gráficos de distribución acumulada de la intensidad de fluorescencia (**Figuras 8B, 8D y 8F**). En estos gráficos se puede evidenciar un desplazamiento de la distribución acumulada. Para poder evaluar la significancia estadística de las diferencias observadas, los datos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA con corrección Welch y un post-test Games-Howell. Se encontraron diferencias significativas de “FimD” en comparación con sus controles “pVB1” y “BL21” ($p\text{-value} < 0,1$) (**Figura 8G**). Estas diferencias indican una unión preferente de los anticuerpos de sueros de pacientes convalecientes de ITU causado por UPEC a los dominios superficiales de FimD en BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD*.

Tabla 8. Diseño experimental del ensayo de reactividad de los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC contra FimD expresada en BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD*.

Experimentos	Ensayo	Cepa	Condición	Abreviación
E1, E2, E3	suero humano	BL21 Δ ABCF/pVB1- <i>fimD</i>	estudio	FimD
E1, E2, E3	suero humano	BL21 Δ ABCF/pVB1	control	pVB1
E1, E2, E3	suero humano	BL21 Δ ABCF	control	BL21

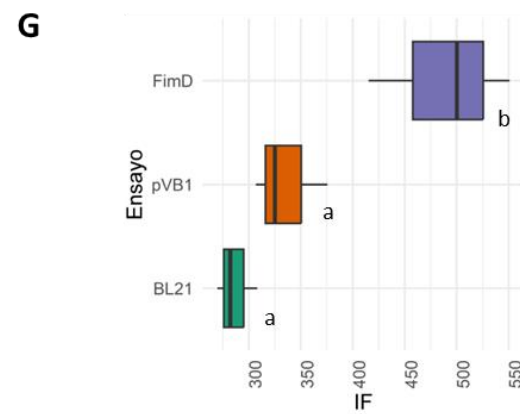
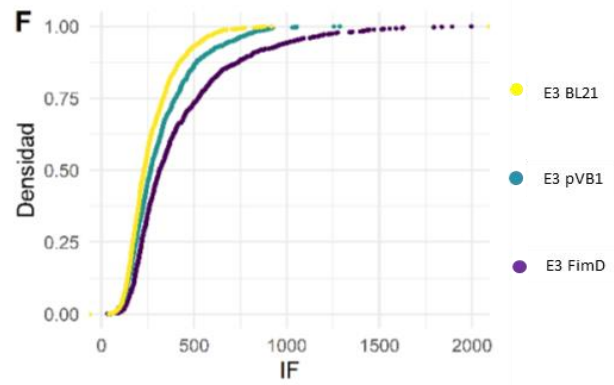
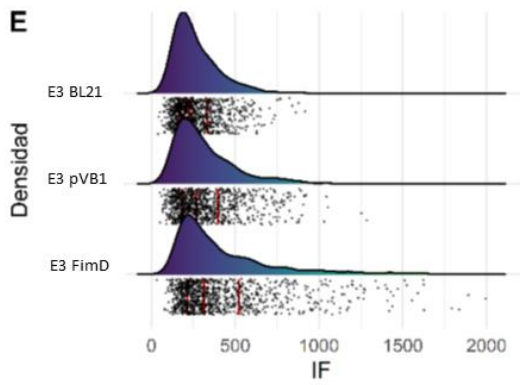
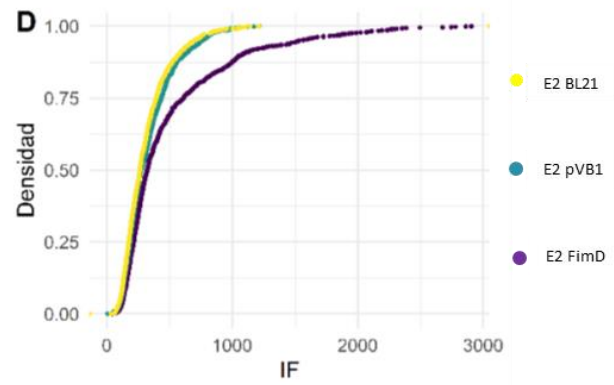
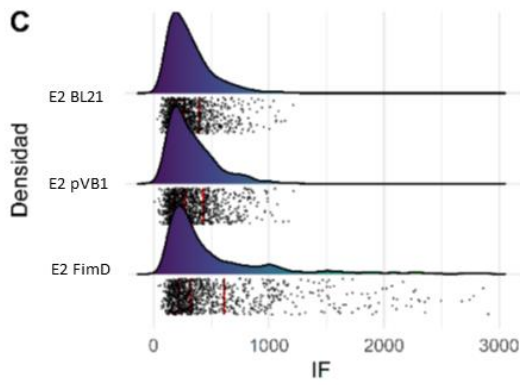
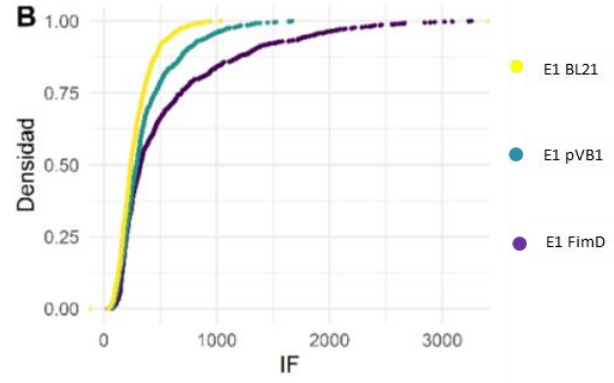
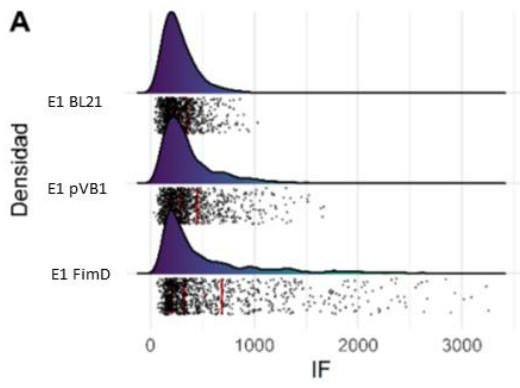


Figura 8. Detección de FimD con sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC en BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD* por citometría de flujo. Histogramas de la intensidad de fluorescencia emitida por BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD* junto a sus respectivos controles (BL21 Δ ABCF/pVB1 y BL21 Δ ABCF) (**A**, **C** y **E**) en reacción con anticuerpos contenidos en sueros de pacientes pediátricos convalecientes de ITU. En base a esta información, se generaron gráficos de distribución acumulada de la intensidad de fluorescencia de la cepa BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD* (**B**, **D** y **F**) que permiten distinguir el desplazamiento de su distribución respecto a sus controles. Para evaluar la diferencia de la intensidad de fluorescencia emitida por BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD* en comparación con sus controles, los datos fueron normalizados mediante su transformación a raíz cuadrada, se representaron con un gráfico de cajas y bigotes (**G**) y se analizaron mediante prueba de ANOVA aplicando una corrección de Welch y un post-test GamesHowell para datos normales heterocedásticos. Las diferencias significativas se indican con letras distintas (a ó b, *p-value* < 0,1).

5.4 Los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC son reactivos a QFimD_{dom-sup} y QPapC_{dom-sup}

Como se mencionó anteriormente, con los ensayos de citometría no se logró demostrar que PapC_{dom-sup} se expresa en BL21 Δ ABCF/pVB1-*papC* o que, al menos, su expresión se distingue de sus controles. Por ello, no se evaluó la unión de los anticuerpos de los sueros de pacientes convalecientes de ITU, causada por UPEC, a BL21 Δ ABCF/pVB1-*papC*. En este sentido, para complementar este estudio, se evaluó la reactividad de los sueros contra las proteínas quiméricas purificadas, QFimD_{dom-sup} y QPapC_{dom-sup} mediante *dot blot*. La intensidad de coloración de los puntos del *dot blot* se cuantificó por densitometría y, con estos datos, se generaron gráficos de violín para cada caso (QFimD_{dom-sup}, **Figura 9B** y QPapC_{dom-sup}, **Figura 9D**). Se observó una reactividad particularmente intensa a concentraciones elevadas de QPapC_{dom-sup}. Para conocer la asociación entre la intensidad de coloración (que se entiende como la unión antígeno anticuerpo) y la cantidad de quimera, se realizó un análisis de correlación de Pearson. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron 0,5 y 0,8 para QFimD_{dom-sup} y QPapC_{dom-sup}, respectivamente. Este último valor da cuenta de una asociación positiva fuerte entre la intensidad de coloración, entendido como la capacidad de unión antígeno anticuerpo, y la cantidad de QPapC_{dom-sup}.

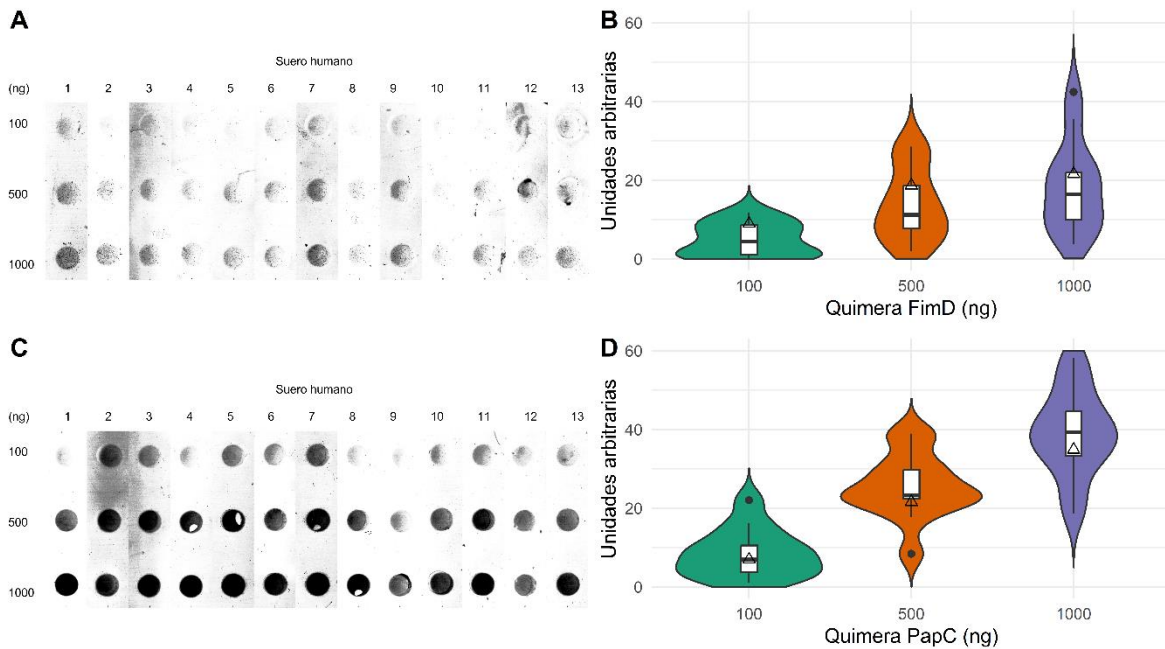


Figura 9. Reactividad de los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC contra QFimD_{dom-sup} y QPapC_{dom-sup} mediante dot blot. Se evaluó la reactividad de varias muestras de suero humano contra QFimD_{dom-sup} (A) y QPapC_{dom-sup} (C) utilizando la técnica de dot blot. Las quimeras se inmovilizaron en una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con el suero humano correspondiente. En cada fila se cargaron 3 cantidades distintas de quimera (100, 500 y 1000 ng). Cada columna fue incubada con sueros de un paciente convaleciente de UPEC distinto, con excepción de la columna 13, que es una mezcla de todos los sueros previos. Para analizar la correlación entre intensidad de color y las cantidades de quimera probadas, se cuantificó la intensidad de coloración usando el programa ImageJ (Tabla 3) y se representó con graficos de violín (B y D). Las unidades arbitrarias se refieren a la intensidad de color de los puntos en la membrana de nitrocelulosa.

6. DISCUSIÓN

Las ITU, predominantemente causadas por UPEC, afectan de manera significativa a niños y adultos mayores. Particularmente en pacientes pediátricos constituyen una de las infecciones más frecuentes. Se estima que aproximadamente el 8-10% de las niñas y el 2-3% de los niños tendrá un cuadro de ITU antes de los 7 años de edad (Rodríguez y Fernández, 2014). Además, entre un tercio y la mitad de ellos se estima que tendrán al menos una recurrencia (Tewary y Narchi, 2015). En términos de los factores de virulencia de UPEC, los apéndices bacterianos conocidos como fimbrias tipo 1 y P juegan un papel crucial en la adherencia de estas bacterias durante el proceso de infección, lo que ha llevado a su investigación para el desarrollo de medicamentos. En este sentido, los ujieres han sido estudiados principalmente por su función en el ensamblaje de las fimbrias mediante sus dominios periplásmicos (Psonis y Thanassi, 2019). Sin embargo, otros dominios del ujier, como sus dominios superficiales no han recibido la misma atención, aun considerando que estos dominios constituyen la estructura del poro que permite la salida de las subunidades de las fimbrias. El estudio de estos dominios superficiales resulta particularmente interesante considerando el hecho de que la unión de anticuerpos dirigidos a estos dominios podría bloquear el crecimiento de la fimbria e interrumpir su ensamblaje. Sin embargo, no se sabe si existe algún tipo de restricción en el acceso a dichos dominios. Existen algunos antecedentes que sugieren que los dominios superficiales de los ujieres podrían ser accesibles considerando la capacidad de los ujieres de unirse a moléculas superficiales de su hospedero, como la heparina (Hsiao *et al.*, 2016). Sumado a esto, se ha demostrado que algunos ujieres en bacterias completas pueden ser reconocidos por anticuerpos como parte de una respuesta inmune serológica (Roy *et al.*, 2010). En base a estos antecedentes, en este estudio se buscó diseñar y validar modelos biológicos que expresen heterológamente los dominios superficiales de los ujieres FimD y PapC para poder ensayar sobre ellos la unión de anticuerpos presentes en sueros de pacientes pediátricos convalecientes de infecciones del tracto urinario causada por UPEC. De esta forma se buscó conocer si los dominios superficiales de los ujieres FimD y PapC se encuentran verdaderamente expuestos en la superficie y constituyen blancos de anticuerpos dirigidos y derivados de la respuesta inmune de pacientes convalecientes.

6.1 Expresión recombinante de FimD y PapC en *E. coli* BL21ΔABCF

FimD y PapC son proteínas de estructura beta barril que poseen dominios que se proyectan hacia la superficie de las *E. coli* (Omattage *et al.*, 2018). Para evaluar la accesibilidad de anticuerpos dirigidos contra los dominios superficiales y derivados de la respuesta inmune de pacientes convalecientes de ITU causadas por UPEC, se transformó la cepa de *E. coli* BL21ΔABCF con el vector de expresión pVB1 clonado con *fimD* y *papC*, respectivamente. Para validar el clonamiento se analizaron por electroforesis en gel de agarosa los amplicones de lisados de las colonias transformadas y los vectores clonados purificados usando partidores que se alinean en regiones que flanquean el MCS. Se distinguen bandas de tamaños cercanos a los 3000 pb (**Figuras 4A y 4B**, para *fimD* y *papC*, respectivamente). Este tamaño es coherente al considerar la suma de los tamaños teóricos aproximados de *fimD* y *papC* (2600 y 2500 pb) y la distancia de 300 pb (2900 y 2800 pb) que separa las regiones de alineamiento de los partidores y el sitio de restricción. El análisis con los vectores plasmidiales recombinantes purificados de las cepas que lograron superar el análisis previo, permite distinguir bandas de aproximadamente 3000 pb como en el análisis previo (**Figura 4C**). Seguido, los vectores clonados purificados de colonias que superaron los controles previos fueron analizados mediante digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *KpnI*. El análisis por electroforesis de los fragmentos digeridos muestra bandas ubicadas en 3 distintos tamaños aproximados: 3000, 7000 y 10000 pb. Estos tamaños son coherentes con los tamaños teóricos aproximados de *fimD* (2600 pb), *papC* (2500 pb), pVB1 (6700 pb), pVB1-*fimD* (9300 pb) y pVB1-*papC* (9200 pb) (**Figura 4D**). Para complementar el análisis de los vectores clonados, pVB1-*fimD* y pVB1-*papC* fueron secuenciados mediante el método Sanger con los partidores usados en los pasos previos. Las secuencias derivadas de cada vector fueron alineadas con los genes *fimD* y *papC* de la cepa UPEC CFT073 (código de acceso GeneBank CP051263.1) (**Figura 5A y 5B**, respectivamente). El alineamiento con *fimD* es perfecto a diferencia de *papC* que muestra un par discordante. Esto se podría explicar, en parte, por el hecho de que la *Taq* polimerasa (usada en este trabajo) puede inducir errores asociados a su fidelidad principalmente asociada a la ausencia de la actividad exonucleasa 3'-5', función que permite corregir errores de incorporación de nucleótidos mal emparejados (Potapov y Ong, 2017).

La inducción de expresión y producción recombinante de este tipo de proteínas, con su correcta exposición en la superficie, no es un proceso trivial, debido a que pueden poner en riesgo la estabilidad de la membrana (Meuskens *et al.*, 2017). Por este motivo se decidió utilizar la cepa cuádruple mutante BL21 Δ ABCF, la que fue diseñada para expresar proteínas tipo porina (Meuskens *et al.*, 2017). Procurando favorecer la expresión de los ujieres en la membrana externa, por sobre la formación de cuerpos de inclusión, se buscó una inducción controlada, a una temperatura de 30 °C, con el desafío de alcanzar un nivel lo suficientemente abundante para detectar la presencia de las proteínas recombinantes en comparación con los controles experimentales. Los perfiles proteicos de los extractos totales de los modelos de expresión heteróloga, después de la inducción (**Figura 6A**) no mostraron bandas teñidas exacerbadamente en los tamaños esperados para FimD y PapC (95.5 kDa y 91.5 kDa, respectivamente), lo que puede sugerir que no existe expresión de dichos genes, que sus niveles de expresión no se destacan respecto a los demás o que debido a la formación de cuerpos de inclusión, dichas proteínas no lograron solubilizarse después del tratamiento con el *buffer* Laemmli a 100 °C. Para conocer si los genes se expresan a nivel de proteína, se hizo un análisis mediante WB. Así, se observó la expresión de FimD (**Figura 6B**) y PapC (**Figura 6C**). Sin embargo, la banda de PapC es más tenue en comparación a FimD, lo que da cuenta de una expresión inferior a su contraparte. Es importante mencionar que los análisis seguidos de este, requieren que la expresión de *fimD* y *papC* sean lo más elevadas posibles con el objetivo de que los anticuerpos dirigidos a estos dominios o los contenidos en sueros de pacientes convalecientes, no solo sean capaces de unirse a sus blancos, si no que sean capaces de generar una señal significativa respecto a sus controles, de no ser así, la posible unión antígeno anticuerpo podría ser indistinguible del ruido de los controles. Aumentar la expresión de los insertos clonados se puede abordar de múltiples formas (Fakruddin *et al.*, 2013). Por un lado, se ha propuesto que mutar ciertos nucleótidos río abajo o arriba de la secuencia Shine-Dalgarno puede mejorar la eficiencia de la traducción mediante la supresión de estructuras secundarias de ARNm (Ramesh *et al.*, 1994). Por otro lado, el número de copias del vector usado también podría tener efectos en la expresión y traducción de los ujieres clonados. pVB1 es un vector de bajo número de copias y su uso se justifica con el

objetivo de prevenir una sobreexpresión que afecte la estabilidad de la membrana externa. A pesar de ello, en el trabajo de Meuskens *et al.* (2017) se muestran antecedentes sobre la sobreexpresión de proteínas de membrana externa con un vector de alto número de copias. La estabilidad y eficiencia del ARNm también es un problema que puede ser citado. Con el objetivo de crear ARNm más estable se ha propuesto la adición de secuencias de ADN en el extremo distal de los genes clonados (Wong y Chang, 1986). La formación de cuerpos de inclusión también ha sido un problema abordado. El protocolo inicial de este trabajo contemplaba la inducción de la expresión durante toda la noche a 37 °C, sin embargo, bajo estas condiciones no fue posible detectar la presencia de FimD ni de PapC por WB. Finalmente, se decidió reducir la temperatura y tiempo de inducción a 30 °C y 3h, así fue posible mejorar la expresión de FimD, más no de PapC. Reducir la temperatura y los tiempos de inducción, han demostrado, reducir la formación de agregados insolubles (Itakura *et al.*, 1977). De esta forma, evaluar otros tiempos y temperaturas durante la inducción podrían mejorar la producción de PapC.

6.2 Anti-FimD_{dom-sup} reconoce los dominios superficiales de FimD en BL21ΔABCF/pVB1-*fimD*

El análisis de WB previo, demostró la expresión de FimD y PapC con el uso de anticuerpos anti-FimD_{dom-sup} y anti-PapC_{dom-sup}; sin embargo, debido a que este experimento se realizó sobre extractos totales, no se pueden sacar conclusiones respecto de la localización de los ujieres. Por ello es que estos anticuerpos fueron usados directamente sobre las cepas recombinantes fijadas. El desplazamiento de la distribución del histograma de intensidad de fluorescencia de BL21ΔABCF/pVB1-*fimD* respecto a sus controles (**Figura 7A**) no solo confirma los resultados de ensayo de WB (**Figura 6B**), sino que también da cuenta de la exposición de los dominios superficiales de FimD. Cabe señalar que el gen *fimD* es transversal en cepas de *E. coli*, estando presente en la gran mayoría de ellas, sean cepas de laboratorio, comensales o patogénicas (Palomino *et al.*, 2011). De acuerdo a los resultados obtenidos, la cepa *E. coli* BL21ΔABCF, si bien posee el locus *fim* en su genoma, no es capaz de generar una señal que eclipse a su contraparte transformada. Por el contrario, (**Figura 6C**), los niveles de expresión de PapC fueron insuficientes para distinguir su señal respecto a sus

controles. Esto se evidencia al no haber un desplazamiento de distribución de intensidad de fluorescencia respecto a sus controles (**Figura 7C**). Dado que los resultados de la secuenciación sugieren una clonación correcta para *fimD* y *papC*, es probable que sea necesario ajustar las condiciones de inducción de la expresión de *papC* para favorecer la producción de proteína, que se exporte y localice en la membrana externa.

6.3 Los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC reconocen FimD producida por BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD*

De acuerdo a los resultados obtenidos de la detección de FimD con el suero de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC, se puede concluir que existen anticuerpos en el suero de los pacientes que son capaces de unirse a los dominios superficiales de FimD. Esta unión se justifica por la diferencia significativa de intensidad de fluorescencia de BL21 Δ ABCF/pVB1-*fimD* respecto a sus controles (**Figura 8G**). Se debe mencionar que el título de anticuerpos no fue determinado en este estudio. El título de anticuerpos se pudo haber determinado mediante ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Montero *et al.*, 2014), con el objetivo de estandarizar la cantidad de anticuerpos usados y realizar ensayos cuantitativos. Estos experimentos se realizarán dentro de los próximos meses en nuestro laboratorio, como parte del progreso en la línea de investigación. Es importante mencionar que no se usó el modelo de expresión heteróloga de PapC con los sueros de pacientes debido a que la señal de los anticuerpos dirigidos a los dominios superficiales no fue significativa respecto a sus controles. Por otro lado, los suero humanos suelen contener anticuerpos capaces de detectar múltiples antígenos superficiales de *E. coli* (Montero *et al.*, 2014), esto de por sí podría generar ruido que obstaculice la detección de señales significativas.

6.4 Los sueros de pacientes convalecientes de ITU causada por UPEC reconocen QFimD_{dom-sup} y QFimD_{dom-sup}

Debido a las limitaciones mencionadas previamente asociadas a la expresión de *papC*, se realizaron ensayos de *dot blot* con distintas cantidades de proteínas quiméricas FimD y PapC. Los resultados indicaron que los sueros de distintos pacientes son reactivos con las QFimD_{dom-sup} y QPapC_{dom-sup}; sin embargo, la reactividad es mayor cuando se trata de PapC.

Esto puede explicarse debido a que las infecciones que progresan hacia el tracto urinario superior pueden generar una respuesta humoral contra el agente infeccioso, mientras que las infecciones limitadas al tracto urinario inferior no logran inducir una respuesta humoral prominente (Ratner *et al.*, 1981). Entonces, se podría pensar que durante la pielonefritis, los factores clásicamente asociados a esta infección, como los componentes del sistema de la fimbria tipo P, entre ellos PapC, son detectados por el sistema inmune. Se puede seguir la misma lógica para FimD, para la cual habría una respuesta humoral limitada en un cuadro de cistitis, debido a que el rol de la fimbria tipo 1 se ha planteado más bien en el epitelio vesical. En base a los estudios de Ratner *et al.*, también se podría desprender que, debido a la incapacidad de respuesta humoral en el tracto urinario inferior, los dominios superficiales de FimD no serían idóneos como blanco de ataque (Ratner *et al.*, 1981). Sin embargo, en estudios con modelos de cistitis y pielonefritis causados por UPEC en ratones, se demostró que las infecciones contenidas en la vejiga no provocan respuestas de anticuerpos significativas, a menos que ya se haya establecido la inmunidad primaria (Chan *et al.*, 2013).

En esencia, el hallazgo fundamental de este estudio es la identificación de los dominios superficiales de FimD y PapC como regiones inmunogénicas producidas durante la infección por UPEC. A pesar de los extensos estudios dirigidos a la identificación de proteínas de superficie en UPEC (Walters y Mobley, 2009), estos dominios no se habían caracterizado previamente como inmunogénicos. Este tipo de investigación es de crucial importancia dado que la detección de componentes expuestos en la superficie de la membrana externa puede impulsar significativamente el avance en el desarrollo de vacunas, formulaciones de inmunización pasiva u otros tipos de terapias anti-virulencia. Este enfoque permite centrarse en partes de la proteína que están expuestas y que son reconocidas por el sistema inmunológico del hospedero, optimizando así la efectividad de la respuesta inmunológica (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2006).

Considerando los antecedentes presentados, es esencial determinar en futuros estudios si la inmunización de ratones con proteínas quiméricas, que incorporan dominios de superficie seleccionados de las proteínas ujier FimD y PapC, confiere protección contra la infección por UPEC.

7. CONCLUSIONES

- I. Se logró el clonamiento de *fimD* y *papC* en el vector pVB1 y su expresión recombinante en la cepa de *E. coli* BL21 Δ ABCF.
- II. La expresión de *fimD* en BL21 Δ ABCF resultó en la exposición de sus dominios superficiales, los que fueron detectados por anticuerpos dirigidos hacia estos dominios.
- III. Los dominios superficiales de FimD son reconocidos por anticuerpos presentes en sueros de pacientes pediátricos convalecientes de ITU causada por UPEC.
- IV. Los anticuerpos de suero de pacientes convalecientes de ITU por UPEC mostraron reactividad frente a quimeras conteniendo dominios superficiales de FimD y PapC.

8. REFERENCIAS

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2018).** *Inmunología celular y molecular.* (pp. 251-274), Elsevier
- Abraham, S. N., Sun, D., Dale, J. B., & Beachey, E. H. (1988).** Conservation of the D-mannose-adhesion protein among type 1 fimbriated members of the family Enterobacteriaceae. *Nature*, 336(6200), 682–684.
- Andreu, A. (2005).** Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 23, 15-21.
- Chan, C. Y., John, A. L. S., & Abraham, S. N. (2013).** Mast cell interleukin-10 drives localized tolerance in chronic bladder infection. *Immunity*, 38(2), 349-359.
- Chromek, M., & Brauner, A. (2008).** Antimicrobial mechanisms of the urinary tract. *Journal of molecular medicine*, 86(1), 37-47.
- Coloma-Rivero, R. F., Gómez, L., Álvarez, F., Saitz, W., Del Canto, F., Céspedes, S., Vidal, R., & Oñate, A. A. (2020).** The Role of the Flagellar Protein FlgJ in the Virulence of *Brucella abortus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 178.
- Crespo, M. D., Puorger, C., Schärer, M. A., Eidam, O., Grütter, M. G., Capitani, G., & Glockshuber, R. (2012).** Quality control of disulfide bond formation in pilus subunits by the chaperone FimC. *Nature chemical biology*, 8(8), 707–713.
- Fakruddin, M., Mohammad Mazumdar, R., Bin Mannan, K. S., Chowdhury, A., & Hossain, M. (2013).** Critical factors affecting the success of cloning, expression, and mass production of enzymes by recombinant *E. coli*. *International Scholarly Research Notices*, 2013, 590587.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015).** Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews. Microbiology*, 13(5), 269–284.
- Hannan, T. J., Totsika, M., Mansfield, K. J., Moore, K. H., Schembri, M. A., & Hultgren, S. J. (2012).** Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS microbiology reviews*, 36(3), 616–648.
- Hooton, T. M. (2012).** Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection. *The New England journal of medicine*, 366(11), 1028–1037.
- Hooton, T. M., Scholes, D., Stapleton, A. E., Roberts, P. L., Winter, C., Gupta, K., Samadpour, M., & Stamm, W. E. (2000).** A prospective study of asymptomatic bacteriuria in sexually active young women. *The New England Journal of Medicine*, 343(14), 992–997.
- Hsiao, F. S., Sutandy, F. R., Syu, G. D., Chen, Y. W., Lin, J. M., & Chen, C. S. (2016).** Systematic protein interactome analysis of glycosaminoglycans revealed YcbS as a novel bacterial virulence factor. *Scientific reports*, 6, 28425.
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., & Boyer, H. W. (1977).** Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, 198(4321), 1056-1063.
- Kantele, A., Palkola, N., Arvilommi, H., Honkinen, O., Jahnukainen, T., Mertsola, J., & Kantele, J. M. (2008).** Local immune response to upper urinary tract infections in children. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(3), 412-417

- Klemm, P.**, & Christiansen, G. (1990). The *fimD* gene is required for cell surface localization of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Molecular & general genetics*, 220(2), 334–338.
- Lane, M. C.**, & Mobley, H. L. (2007). Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney International*, 72(1), 19–25
- Langermann, S.**, Möllby, R., Burlein, J. E., Palaszynski, S. R., Auguste, C. G., DeFusco, A., Strouse, R., Schenerman, M. A., Hultgren, S. J., Pinkner, J. S., Winberg, J., Guldevall, L., Söderhäll, M., Ishikawa, K., Normark, S., & Koenig, S. (2000). Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of infectious diseases*, 181(2), 774–778.
- Lichtenberger, P.**, & Hooton, T. M. (2008). Complicated urinary tract infections. *Current infectious disease reports*, 10(6), 499–504.
- Lycklama A Nijeholt, J. A.**, & Driessen, A. J. (2012). The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1592), 1016–1028.
- Mancuso, G.**, Midiri, A., Gerace, E., Marra, M., Zummo, S., & Biondo, C. (2023). Urinary Tract Infections: The Current Scenario and Future Prospects. *Pathogens*, 12(4), 623.
- Marklund, B. I.**, Tennent, J. M., Garcia, E., Hamers, A., Båga, M., Lindberg, F., Gaastra, W., & Normark, S. (1992). Horizontal gene transfer of the *Escherichia coli pap* and *prs* pili operons as a mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties. *Molecular microbiology*, 6(16), 2225–2242.
- Martinez, J. J.**, & Hultgren, S. J. (2002). Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology*, 4(1), 19–28.
- Meuskens, I.**, Michalik, M., Chauhan, N., Linke, D., & Leo, J. C. (2017). A new strain collection for improved expression of outer membrane proteins. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 464.
- Mobley, H. L.**, Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockatell, C. V., Jones, B. D., & Warren, J. W. (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infection and immunity*, 58(5), 1281–1289.
- Montero, D.**, Orellana, P., Gutiérrez, D., Araya, D., Salazar, J. C., Prado, V., Oñate, A., Del Canto, F., & Vidal, R. (2014). Immunoproteomic analysis to identify Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outer membrane proteins expressed during human infection. *Infection and immunity*, 82(11), 4767–4777.
- Murray, P. R.**, Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020). *Medical microbiology*, 105–356.
- Norgren, M.**, Normark, S., Lark, D., O'Hanley, P., Schoolnik, G., Falkow, S., Svanborg-Edén, C., Båga, M., & Uhlin, B. E. (1984). Mutations in *E. coli* cistrons affecting adhesion to human cells do not abolish Pap pili fiber formation. *The EMBO journal*, 3(5), 1159–1165.
- Nuccio, S. P.**, & Bäumlér, A. J. (2007). Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(4), 551–575.
- Omattage, N. S.**, Deng, Z., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Almqvist, F., Yuan, P., & Hultgren, S. J. (2018). Structural basis for usher activation and intramolecular subunit transfer in P pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *Nature microbiology*, 3(12), 1362–1368.
- Palomino, C.**, Marín, E., & Fernández, L. Á. (2011). The fimbrial usher FimD follows the SurA-BamB pathway for its assembly in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 193(19), 5222–5230.

- Psonis, J. J.**, & Thanassi, D. G. (2019). Therapeutic Approaches Targeting the Assembly and Function of Chaperone-Usher Pili. *EcoSal Plus*, 8(2), 10.1128/ecosalplus.ESP-0033-2018.
- Pinkner, J. S.**, Remaut, H., Buelens, F., Miller, E., Aberg, V., Pemberton, N., Hedenström, M., Larsson, A., Seed, P., Waksman, G., Hultgren, S. J., & Almqvist, F. (2006). Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), 17897–17902.
- Poggio, T. V.**, La Torre, J. L., & Scodeller, E. A. (2006). Intranasal immunization with a recombinant truncated FimH adhesin adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides protects mice against uropathogenic *Escherichia coli* challenge. *Canadian journal of microbiology*, 52(11), 1093–1102.
- Potapov, V.**, & Ong, J. L. (2017). Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing. *PLoS one*, 12(1), e0169774.
- Ramesh, V.**, De, A., & Nagaraja, V. (1994). Engineering hyperexpression of bacteriophage Mu C protein by removal of secondary structure at the translation initiation region. *Protein Engineering, Design and Selection*, 7(8), 1053-1057.
- Rastogi, R. P.**, Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of nucleic acids*, 2010, 592980.
- Ratner, J. J.**, Thomas, V. L., Sanford, B. A., & Forland, M. (1981). Bacteria-specific antibody in the urine of patients with acute pyelonephritis and cystitis. *Journal of Infectious Diseases*, 143(3), 404-412.
- Rich, R. R.**, Fleisher, T. A., Shearer, W. T., Schroeder, H. W., Frew, A. J., Weyand, C. M. (2019). *Clinical Immunology (Fifth Edition)*. (pp. 3-17), Elsevier.
- Roberts, J. A.**, Marklund, B. I., Ilver, D., Haslam, D., Kaack, M. B., Baskin, G., Louis, M., Möllby, R., Winberg, J., & Normark, S. (1994). The Gal(alpha 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 11889–11893.
- Rodríguez-Ortega, M. J.**, Norais, N., Bensi, G., Liberatori, S., Capo, S., Mora, M., Scarselli, M., Doro, F., Ferrari, G., Garaguso, I., Maggi, T., Neumann, A., Covre, A., Telford, J. L., & Grandi, G. (2006). Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nature biotechnology*, 24(2), 191–197.
- Rodríguez, J. D. G.**, & Fernández, L. R. (2014). Infección de vías urinarias en la infancia. *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Pediatría*, 1, 91-108.
- Ronald A.** (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *The American journal of medicine*, 113(Supplement 1A), 14S–19S.
- Roy, K.**, Bartels, S., Qadri, F., & Fleckenstein, J. M. (2010). Enterotoxigenic *Escherichia coli* elicits immune responses to multiple surface proteins. *Infection and immunity*, 78(7), 3027–3035.
- Sarkar, S.**, Ulett, G. C., Totsika, M., Phan, M. D., & Schembri, M. A. (2014). Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS one*, 9(4), e94786.
- Sauer, F. G.**, Pinkner, J. S., Waksman, G., & Hultgren, S. J. (2002). Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation. *Cell*, 111(4), 543-551.
- Schneider, C. A.**, Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671–675.

- Sievers, F.**, Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7, 539.
- Tchesnokova, V.**, Aprikian, P., Kisiela, D., Gowey, S., Korotkova, N., Thomas, W., & Sokurenko, E. (2011). Type 1 fimbrial adhesin FimH elicits an immune response that enhances cell adhesion of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 79(10), 3895–3904.
- Tewary, K.**, & Narchi, H. (2015). Recurrent urinary tract infections in children: Preventive interventions other than prophylactic antibiotics. *World journal of methodology*, 5(2), 13–19.
- Thankavel, K.**, Madison, B., Ikeda, T., Malaviya, R., Shah, A. H., Arumugam, P. M., & Abraham, S. N. (1997). Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *The Journal of clinical investigation*, 100(5), 1123–1136.
- Totsika, M.**, Heras, B., Wurpel, D. J., & Schembri, M. A. (2009). Characterization of two homologous disulfide bond systems involved in virulence factor biogenesis in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Journal of bacteriology*, 191(12), 3901–3908.
- Vivier, E.**, & Malissen, B. (2005). Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunology*, 6, 17–21
- Volkan, E.**, Kalas, V., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Henderson, N. S., Pham, T., Waksman, G., Delcour, A. H., Thanassi, D. G., & Hultgren, S. J. (2013). Molecular basis of usher pore gating in *Escherichia coli* pilus biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), 20741–20746.
- Walters, M. S.**, & Mobley, H. L. (2009). Identification of uropathogenic *Escherichia coli* surface proteins by shotgun proteomics. *Journal of microbiological methods*, 78(2), 131–135.
- Werneburg, G. T.**, & Thanassi, D. G. (2018). Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus*, 8(1). doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2017.
- Wong, H. C.**, & Chang, S. (1986). Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(10), 3233-3237.
- Wright, K. J.**, & Hultgren, S. J. (2006). Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. *Future microbiology*, 1(1), 75–87.