

Proteasas en bazo de ratón Balb/c infectado con *Yersinia pseudotuberculosis*

*Proteases in Balb/C mouse spleen infected with *Yersinia pseudotuberculosis**

Flores Robles Donaciano

Unidad de Investigación Especializada en Microbiología, Universidad Autónoma de Guerrero, México

floresrd@hotmail.com

Poblete Mayo Argelia

Unidad de Investigación Especializada en Microbiología, Universidad Autónoma de Guerrero, México

argepoblete@hotmail.com

Sierra Martínez Pavel

Unidad de Investigación Especializada en Microbiología, Universidad Autónoma de Guerrero, México

pavelsierra6@hotmail.com

Román Galindo Aydee Citlalii

Unidad de Investigación Especializada en Microbiología, Universidad Autónoma de Guerrero, México

romanydee@gmail.com

Cárdenas Hernández Brian Eulalio

Unidad de Investigación Especializada en Microbiología, Universidad Autónoma de Guerrero, México

brianyohandsome@gmail.com

Resumen

Yersinia pseudotuberculosis es un patógeno bacteriano el cual secreta proteínas para manipular la maquinaria celular y evadir la respuesta inmune, inyectando proteasas en el citoplasma de la célula eucarionte. Para determinar el perfil de expresión de proteasa en el bazo, se infectaron ratones Balb/C a diferentes tiempos con *Y. pseudotuberculosis*, se extrajo el órgano a diferentes horas (5, 10, 15, 20, 30, 40, 48). Posteriormente, se obtuvo el extracto total para la realización del SDS-PAGE al 10% copolimerizado con albumina al 0.4 % se incubó a 37°C en buffer de acetato de sodio. Para detectar la actividad de gelatinasa el gel se tiñó con azul de Coomassie. El tipo de proteasa se determinó usando inhibidores de enzimas como: pepstatina, EDTA, 1-10 fenantrolina+EDTA, N- etilmaleimida, entre otras. Por lo que se logró determinar que en el bazo de ratón infectado por *Y. pseudotuberculosis* se expresan proteasas las cuales presentan PM de 150, 200 y 250.

Palabras claves: *Yersinia pseudotuberculosis*, proteasa, gelatinasa.

Abstract

Yersinia pseudotuberculosis is a bacterial pathogen that secretes proteins to manipulate cellular machinery and evade the immune response, injecting proteases into the cytoplasm of the eukaryotic cell. To determine the expression profile of proteases, the organ was removed at different times in the spleen of the Balb / c mouse infected with *Y. pseudotuberculosis* (5, 10, 15, 20, 30, 40, 48). The total extract was obtained for 10% SDS-PAGE copolymerization with 0.4% albumin and incubated at 37 ° C in sodium acetate buffer. For the gelatinase activity the gel was stained with Coomassie blue. The protease type was determined using enzyme inhibitors such as pepstatin, EDTA, 1-10 phenanthroline + EDTA, N-ethylmaleimide, among others. Therefore, it was possible to determine that proteases are present in the spleens of mice infected with *Y. pseudotuberculosis*, which have a PM of 150, 200 and 250.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, protease, gelatinase.

Fecha Recepción: Febrero 2017

Fecha Aceptación: Julio 2017

Introducción

Yersinia es una bacteria que pertenece al género de las enterobacterias, la cual contiene 11 especies, de ellas tres son patógenas para los seres humanos: *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*, que poseen el sistema de secreción tipo III compuesto por 25 proteínas (Bi *et al* (2012).), por lo que es utilizado en la interacción de la bacteria con la célula huésped para secretar proteasas las cuales son un grupo de enzimas que se han estudiado en procesos como la apoptosis, la proliferación, la migración celular entre otros. Catalizan el rompimiento del enlace peptídico liberando los aminoácidos de otras proteínas. Se ha demostrado que existen diversos patógenos bacterianos como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* los cuales secretan proteasas al medio extracelular, que son considerados marcadores de virulencia y patogenicidad. Se disemina a diversos órganos como: el hígado, pulmón y el bazo, en este último se lleva a cabo la presentación antigénica, si bien en dicho órgano se sabe que existen alteraciones en el perfil de proteínas fosforiladas cuando se presenta la enfermedad causada por *Yersinia*. El perfil de expresión de proteasas se desconoce durante el desarrollo de una enfermedad bacteriana. Por lo que el objetivo es conocer el perfil de proteasas y si existen alteraciones en la expresión de proteasas durante la pseudotuberculosis experimental.

Vía de transmisión de *Yersinia pseudotuberculosis*

La ruta habitual de adquisición de *Y. pseudotuberculosis* es a través de alimentos y agua contaminada. El inicio de la patogénesis comienza con la colonización del tracto intestinal en particular en el intestino delgado y el colon. (Bottone 1997). En consecuencia, la mayor parte de los efectos patológicos y manifestaciones clínicas ocurren en estos sitios del sistema digestivo, después de esto *Yersinia* debe atravesar el lumen intestinal, fijarse y penetrar la barrera de moco que recubre las células epiteliales de la mucosa y eventualmente adherirse a las células intestinales.

Debido a que los fagocitos infectados con la bacteria pueden propagarse a través del torrente sanguíneo, *Yersinia* es capaz de llegar hacia el hígado, pulmón y bazo. (Autenrieth, 1996; Wuorela, 1999).

Factores de virulencia

a) Proteínas de adhesión, intervienen en el paso inicial de la invasión de la mucosa intestinal, se ha demostrado que tres proteínas permiten la unión a las células epiteliales. La invasina, por si misma, es el determinante principal, ya que promueve la entrada de bacterias a la célula. YadA es una proteína, codificada por el plásmido pYV, que ha sido descrita como el principal componente para la adhesión, siendo esencial para la inducción de la enfermedad (inflamación y necrosis en el hígado). Después de la invasión, YadA predomina en el tejido infectado y es necesario para la persistencia, supervivencia y replicación en placas de Peyer, además de que se le ha atribuido que participa en el proceso de invasión. La tercera proteína, Ail, está correlacionada con el factor de virulencia. Una vez que la adhesión se ha establecido entre *Yersinia* y su célula blanco, participan los efectores Yops, en dos grupos de proteínas para realizar diferentes funciones, éstas son responsables de la capacidad de *Yersinia* para difundirse en las placas de Peyer e invadir tejidos, difundiéndose por la vía linfática, hasta llegar a los ganglios linfáticos hígado y bazo. (Rosa del Carmen Rocha Gracia et al. 2004)

Proteínas Yops

Las Yops que forman dos grupos distintos de proteínas. Algunas son efectores intracelulares que se liberan dentro de la célula a través del inyectisoma hasta el citosol de la célula eucarionte. Cuando *Yersinia* se adhiere a la superficie del macrófago se activa el SSTT-Ysc (sistema de secreción tipo III), y posteriormente se ensamblan las proteínas que forman el inyectisoma como pueden ser YscC, W, D, R, S, T, U, V, J (Leung et al., 1990).

Estas proteínas Yops forman adhesiones que desencadenan importantes procesos entre ellos la fagocitosis mediada por integrinas $\beta 1$. YopH al desfosforilar a estas proteínas inhibe la fagocitosis bacteriana mediada por integrinas $\beta 1$ por parte de las células huésped en etapas tempranas de la infección. Su actividad anti-fagocítica es esencial para la virulencia de *Yersinia* ya que las cepas que carecen de YopH son ingeridas de manera eficiente por las células fagocitadas del huésped. (Thinwa, 2014)

Se ha demostrado que cuatro de los seis efectores (YopH, YopE, YopT, YopO), inhiben al citoesqueleto desestabilizando las vías de señalización. Contribuyen a la resistencia patogénica de *Yersinia*; ya que son capaces de sobrevivir a la fagocitosis por macrófagos y

neutrófilos (Fábrega, 2012). La función de YopM es formar un complejo con las cinasas Rsk y Pkn, lo cual no se sabe si contribuye a la patogénesis bacteriana. (La Rock et al, 2012)

YopH es una importante tirosina fosfatasa, su función principal es antifagocítica, se lleva a cabo por la desfosforilación de sus sustratos. (Aepfelbacher, 2004). Otra proteína YpkA/YopO tiene diferentes funciones que se llevan a cabo en bacterias; como una cinasa inactiva, cuando se inyecta en la célula huésped, es activada al unirse con actina. (Navarro et al., 2007)

YopE actúa como proteína activadora de GTPasas. YopE es muy específica ya que afecta selectivamente vías de señalización mediadas por Rac y se ha visto que sus efectos abarcan la inhibición de la fagocitosis, la formación de poros; así como la inhibición de la producción de IL- 1 β . (Prehna et al., 2006). YopT es una cisteína proteasa que tiene como objetivo principal la eliminación del grupo isopenoide del C-terminal de las Rho, Rac y Cdc42. (Aepfelbacher et al, 2003; Trosky et al, 2008)

YopP/J tiene un dominio con actividad de acetilasa, inhibe a las proteínas cinasas activadas por mitógenos y la activación de NF- κ mediada por IKK, que impide la expresión de genes proinflamatorios y la supervivencia celular. (Prehna et al, 2006)

En modelos de infección bacteriana *in vitro* se ha demostrado en células Hela, macrófagos, fibroblastos entre otras sufren alteraciones en su perfil de proteínas durante el proceso infeccioso secretando proteasas (Kakhniashvili y cols., 2004, Owen y Campbell, 1999).

Proteasas

Las proteasas también conocidas como enzimas proteolíticas tienen funciones como degradar las uniones peptídicas de las proteínas por hidrólisis, estas pueden estar ancladas a la membrana plasmática, unida a receptores de membrana y soluble en el interior de las células, entre otras localizaciones. (Owen y Campbell, 1999), participan en la regulación de procesos celulares importantes y fundamentales en procesos biológicos, tales como la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, componentes del complemento, factores de coagulación, inmunoglobulinas y mediadores proinflamatorios, desempeñando así un papel importante en la regulación de la concentración y constante regularidad de la actividad de

las proteasas al medio extracelular, en la modificación y reparación tisular, fibrinólisis, coagulación, salida celular, penetración hacia las barreras, inflamación y defensa del huésped contra alguna infección bacteriana (Owen, 2008; Chang y Werb, 2001; Jenning *et al*, 2009).

Metodología

1.- Modelo animal y cepa bacteriana

En el presente trabajo se utilizaron ratones machos de la cepa balb/c de 4-6 semanas de edad, clínicamente sanos. Para el proceso de infección se utilizó la cepa NTCT8315 *de Yersinia pseudotuberculosis* utilizando 100,000 UFC.

2.- infección de ratón

Se realizó un pre cultivo de la cepa bacteriana en 10 mL de caldo soya tripticaseína incubando a 37°C durante 18 horas, posteriormente se adicionaron 100µL del pre cultivo a 50mL de CST y se incubó a 37°C por 3.5 horas en agitación, se obtuvieron 1×10^5 UFC/mL, las cuales se utilizaron para infectar los ratones por vía intraperitoneal para posteriormente sacrificarlos durante diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 30, 40 y 48 h).

3.- Extracción del bazo

Al término de los intervalos de infección los ratones se sedaron con cloroformo para poder así extraer el bazo, el cual fue lavado con PBS estéril pH 7.4 del cual 0.9 gramos del órgano se maceraron con 3 ml de buffer de lisis en un mortero a 4°C, el extracto se sometió a 1 minuto de vortex por 3 minutos de descanso en hielo (el proceso fue repetido 5 veces), para asegurar la liberación de todas las proteínas presentes, posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. La calidad del extracto total proteico se probó con electroforesis SDS/PAGE.

4.-SDS-PAGE al 10%

Para analizar la calidad del extracto proteico, 50 µg se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10 %, cabe mencionar que la concentración proteica se estandarizo haciendo una curva estándar con BSA, cuantificando la concentración proteica por el método

de Bradford. El gel se corrió a 80 volts durante 40 minutos y 100 volts durante 60 minutos. Al término de este tiempo el gel se tiñó con azul de Coomassie durante una hora y se destiño para visualizar el perfil de proteínas.

5.- Actividad peptidolítica

A partir de los extractos proteicos obtenidos del bazo de ratón infectado, se determinó el patrón de proteasas usando geles de sustrato (acrilamida copolimerizada con gelatina al 0.4%), posteriormente se realizó la electroforesis con 50 µg de proteína total, incubando el gel toda la noche a 37°C en 0.1 M de buffer de fosfato de sodio pH de 6.5 y con Tween 20. Para la observación de la actividad en gelatinasa se tiño el gel con azul de Coomassie. Por otro lado, se analizó el efecto del pH sobre la actividad enzimática usando buffer de citrato con pH 4-6 y en 0.1 M tris/HCL buffer en el rango pH 7-9.

RESULTADOS

Perfil proteico del bazo.

Para determinar el perfil de proteínas totales, en el bazo del ratón Balb/c, así como la calidad biológica de los extractos proteicos se extrajo el órgano y se obtuvo el homogenado, el cual se sometió a electroforesis, cargando diferentes concentraciones de proteína (figura 1), donde se observa que no existe degradación proteica y que la calidad del extracto es idónea para realizar los ensayos posteriores.

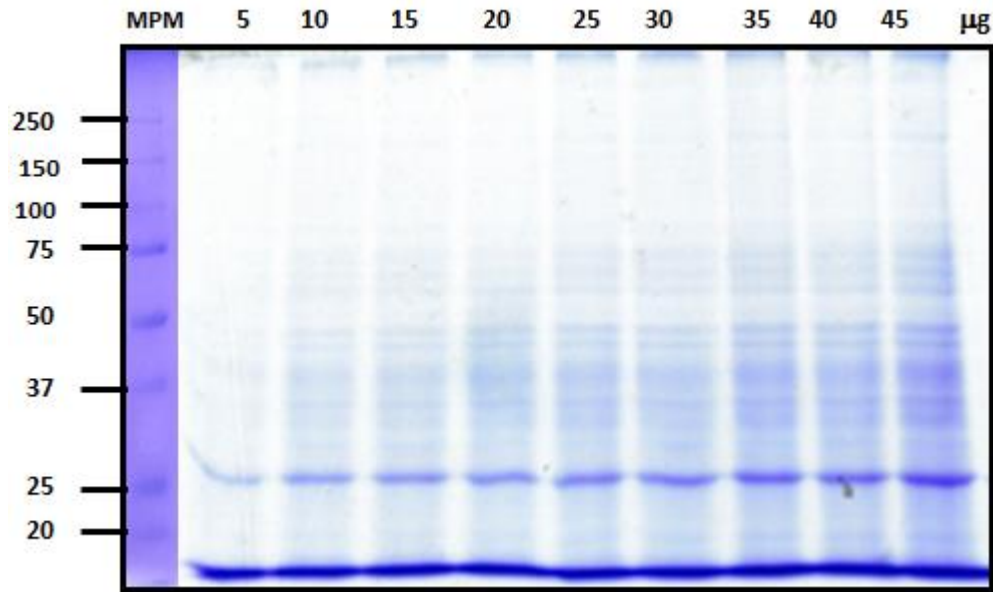


Fig 1. Perfil de proteínas del bazo de ratón Balb/C. SDS-PAGE 10 % de extracto total del bazo, se sometieron a electroforesis diferentes concentraciones (5,10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ug),el gel se tiño con azul de Coomassie.

Actividad proteolítica de las proteínas secretadas a diferentes horas

Se sabe que las células eucariotas responden ante una infección secretando proteasas, que actúan contra algún agente patógeno en su caso los microorganismos invasores secretan proteínas líticas para manipular a la célula eucariótica. Para determinar si el bazo del ratón Balb/c secreta proteasas en respuesta a *Y. pseudotuberculosis* se obtuvo el perfil de proteasas a diferentes horas (5, 10, 15, 20, 30, 40 y 48 horas), para ello se usaron 70 µg de los extractos proteicos, los cuales se corrieron en geles de sustrato como se mencionó anteriormente. En la figura 2 a 40 horas de infección se expresan cuatro proteasas de 145, 200, 250 kDa y una de alto PM, la cual se mantiene constante durante el desarrollo de la infección. Cabe mencionar que las de 145, 200, 250 kDa solo se detectan a los tiempos 5, 15, 20 y 48 horas de infección. El resultado evidencia que durante el desarrollo de la enfermedad se producen proteasas.

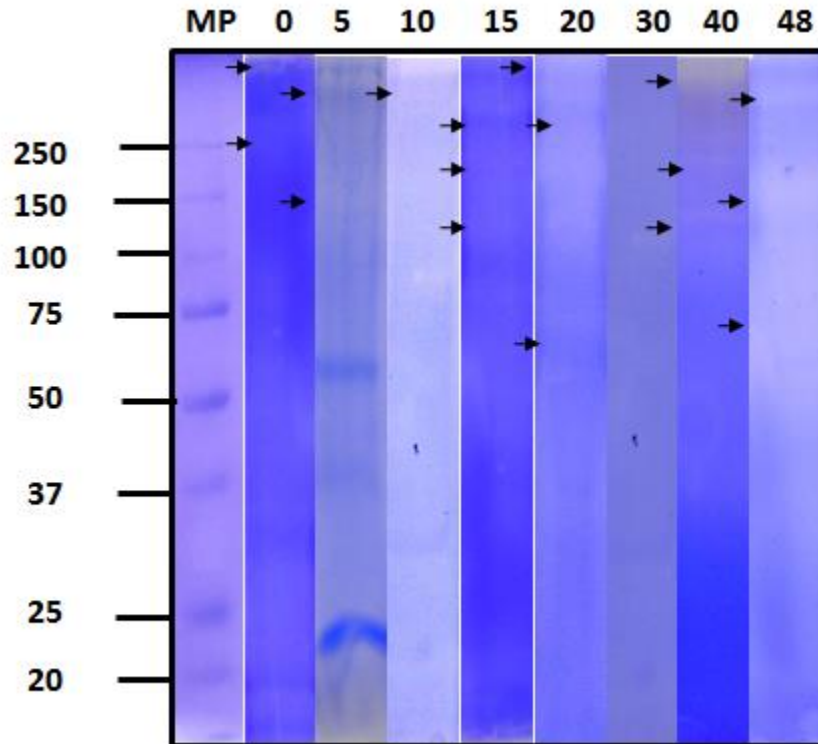


Fig 2. Perfil de proteasas que se inducen durante la infección por *Yersinia pseudotuberculosis*. SDS-PAGE al 10% copolimerizado con albumina, cargado con 70 ug extracto total del bazo de ratón Balb/c a distintas horas (5, 10, 15, 20, 30, 40, 48). Teñido con azul de coomassie, la actividad se observa como una banda blanca.

Determinación de actividad proteolítica frente a inhibidores

Los inhibidores de proteasas son capaces de formar un complejo con la proteasa, esto impide que puedan llevar a cabo la proteólisis. Existen inhibidores específicos para diferentes tipos de proteasas, por lo cual para valorar si se podía determinar el tipo de proteasa, se llevó a cabo un ensayo de actividad enzimática frente a distintos inhibidores; TLCK, NEM, IA y PMFS.

Para ello el gel se lavó con solución de lavado durante 1 hora y posteriormente se incubó con búfer de acetato de sodio durante 12 horas, a cada muestra se le añadió distinto inhibidor. En la figura 3 se observa que la mayor actividad inhibitoria se ve frente al PMSF, lo cual indica que tal vez se trate de una serina proteasa, aun cuando consideramos que se necesitan hacer más ensayos que permitan definir de que tipos de proteasas se tratan.

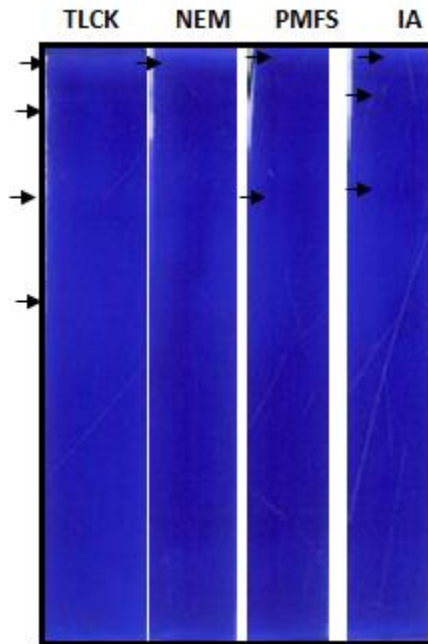


Figura 3. Actividad de proteasa frente a inhibidores. Gel de sustrato copolimerizado con albumina al 0.4 % tratado con inhibidores (TLCK, NEM, PMFS, IA) y cargado con 70 µg de extracto total de bazo de ratón Balb/c a las 20 horas de transcurrida la infección por *Y. pseudotuberculosis*, teñido con azul de Coomassie.

Discusión

Se sabe que *Yersinia pseudotuberculosis* utiliza el sistema de secreción tipo III para secretar proteasas al medio extracelular, debido a esto la bacteria se disemina a diversos órganos, entre ellos el hígado, el pulmón, los ganglios linfáticos y el bazo. Este último es uno de los órganos involucrados en la respuesta inmune, en la cual las proteasas tienen un papel importante en el procesamiento de diversas proteínas, entre ellas las interleucinas. Se ha demostrado que durante el desarrollo de la enfermedad provocada por *Y. pseudotuberculosis* en el eritrocito e hígado existe degradación proteica, lo cual hace pensar que se activan un grupo de enzimas encargadas de la proteólisis (Garibay-Cerdenares, 2008).

En este trabajo se analizó la integridad de la muestra, donde se observó un perfil de perfil de proteínas en el cual no se encontraron zonas de degradación y en etapas finales de la infección se disminuye el patrón de proteínas, como lo observo Torres Ramos 2011, probablemente pudiera ser por el tiempo que tiene que pasar para que la bacteria se disemine a los diferentes órganos.

Para el ensayo de proteasas de extracto proveniente del bazo (Fig 2.) se realizó un SDS-PAGE copolimerizado con albumina, se evidencio que se activan proteasas cuando se induce la enfermedad por *Y. pseudotuberculosis*. Si bien en otros órganos estudiados se ha demostrado, que el perfil de proteínas disminuye a las 40 y 48 horas de infección como en eritrocitos y hepatocitos, si bien en estos tipos celulares no se ha demostrado que se activen proteasas todo parece indicar que se activan estas moléculas. (Torres Ramos 2011).

Para determinar el tipo de proteasa que se activa en el bazo, se usaron inhibidores propios de este tipo de enzimas, estos afectan la actividad de estas proteínas, si bien no existen reportes relacionados, ya que los existentes se han enfocado en la caracterización de proteasas purificadas, no en órganos infectados, lo cual dificulta la caracterización molecular. Sin embargo, es evidente que algunas proteasas presentes en los extractos disminuyen su actividad proteolítica, Por lo cual consideramos interesante caracterizar bioquímicamente las proteasas presentes en los extractos proteicos de bazo.

Conclusión

Durante la infección del bazo de ratón con *Y. pseudotuberculosis*, se determinó que en el bazo se expresan proteasas las cuales presentan diferentes PM de 150, 200, 250. Así también se observaron alteraciones en el perfil de expresión de las proteasas durante la pseudotuberculosis experimental. De los diferentes tiempos de infección que se analizaron, se observó que a las 40 horas se detectó un perfil mayor de expresión de proteasas.

Bibliografía

- Bi, Y., Wang, X., Han, Y., Guo, Z., Yang, R. (2012). *Yersinia pestis* versus *Yersinia pseudotuberculosis* effects on host macrophages. *Scand J Immunol.* 76 (6): 541-551.
- Bottone, E. J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clinic Microbiol Rev.* 10(2): 257- 276.
- Autenrieth, I. B., Kempf, V., Sprinz, T., Preger, S., Schnell, A. (1996). Defense mechanisms in Peyer`s patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines. *Infect Immun.* 64(4): 1357-1368.
- Wuorela, M., Tohka, S., Granfors, K., Jalkanen, S. (1999). Monocytes that have ingested *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3 acquire enhanced capacity to bind to non stimulated vascular endothelial cells via P-selectin. *Infect Immun.* 67(2): 726-732.
- Rocha-Gracia, R. C., Martínez-Laguna, Y., Lozano-Zaraín, (2004) Mecanismos de Patogenicidad e interacción Parásito Hospedero. Primera edición, BUAP. Puebla, México. 325pp
- Leung, K.Y., Reisner, B. S. Straley, S. C. (1990). Yop inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infectimmun.* 58(10): 3262-327
- Thinwa J., Segovia, J. A., Bose, S., Dube, P. H. (2014). Integrin-Mediated First Signal for Inflammasome Activation in Intestinal Epithelial Cells. *J. Immuno.* 193(3): 1373-1382.
- Fábrega A; vila J. (2012) *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance, *Enfer infecc y microbiol clin.* 1:24-32
- La Rock, C. N., Cookson, B.T. (2012) The *Yersinia* Virulence Effector Yop M Binds Caspase-1 to Arrest Inflammasome Assembly and Processing. *Cell Host & Microbe.* 12(6): 799-805

- Aepfelbacher, M. (2004). Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of *Yersinia*. *Ergebnisse Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol* 152: 65-77
- Navarro, L., Koller, A., Nordfelth, R., Wolf-Watz, H., Taylor, S., Dixon, J. E. (2007). Identification of a molecular target for the *Yersinia* protein kinase. *Mol. Cell* 26(4): 465-477
- Prehna, Gerd., Ivanov, M. I., Bliska, J. B., Stebbins, S. T. (2006). *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell*. 126(5): 869-880.
- Aepfelbacher, M., Trasak, C., Wilharm, G., Wiedemann, A., Trülzsch, K., Krauss, K., Gierschik, P., Heesemann, J. (2003). Characterization of Yop T Effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected Cells. *J of Bioll Chem*. 278(35): 33217-33223
- Trosky, J. E., Liverman, A. D. B., Orth, K. (2008). *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol*. 10 (3): 557-565.
- Garibay-Cerdenares, O. L. “Niveles de fosforilación en tirosina en eritrocitos de ratón BALB/c durante un proceso infeccioso provocado por *Yersinia pseudotuberculosis*” (Tesis Maestría). Universidad Autónoma De Guerrero; 2008.
- Torres-Ramos, A. “Análisis de la asociación de las proteínas espectrina, banda 4.1 y actina en eritrocitos de ratón BALB/c infectados con *Yersinia pseudotuberculosis*” (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Guerrero; 2011.
- Owen, C. A., Campbell, E. J. (1999) The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *JLeukoc Biol*. 65 (2): 137-150
- Owen, C. A. (2008). Leukocyte Cell Surface Proteinases: Regulation of expression, Functions, and Mechanisms of Surface Localization. *J. Biochem Cell Biol*. 40 (6-7): 1246-1272.

Chang, C., Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasión, angiogénesis and metástasis. *J TCell Biol.* 11 (11): S37-S43

Jeninga, E. H., Bugge, A., Nielsen, R., Kersten, S., Hamers, N., Dani, C., Wabitsch, M., Berger, R., Stunnenberg, H. G., Mandrup, S., Kalkhoven, E. (2009). Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Regulates Expression of the Anti-lipolytic G-protein-coupled Receptor 81 (*GPR81/Gpr81*). *J Biol Chem.* 284 (39): 26385-26393