



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
UNIDAD ACADÉMICA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD ACADÉMICA FACULTAD DE MEDICINA

**“Clonación y expresión de LcrE de  
*Chlamydia trachomatis* en *Escherichia coli*  
usando un plásmido inducible con  
arabinosa”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :  
**MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ BARRERA**

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO LEYVA VÁZQUEZ

CHILPANCINGO, GRO., MARZO DE 2006.

---

**“Clonación y expresión de LcrE de *Chlamydia trachomatis* en *Escherichia coli* usando un plásmido inducible con arabinosa”**

---

---

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.**

**Financiado por el PIFI 3.1 del ProDES de la DES Ciencias Químico Biológicas y Biomédicas 2004.**

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de forma especial a mi director de tesis, Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez por la ayuda y el tiempo brindado para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco también a mis asesores, Dr. Saúl López Silva, Dr. Everardo Curiel Quesada, Dr. Alfonso Bernabé Carreño, M en C. Gloria Fernández Tilapa y a Dr. Alejandro Millán Vega por sus importantes aportaciones y sugerencias durante el desarrollo del presente trabajo.

---

---

***Dedico mi trabajo a mis padres y hermanos.***

---

---

---

# Índice

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Abreviaturas.....	I
Índice de figuras.....	II
Índice de anexos.....	II
Resumen.....	III
Abstract.....	IV
<hr/> <hr/>	
I. Introducción.....	1
II. Material y métodos.....	5
Cepas bacterianas, plásmidos y DNA de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	5
Aislamiento y amplificación de gen <i>lcrE</i> .....	5
Clonación del gen <i>lcrE</i> en <i>Escherichia coli</i> .....	6
Análisis de clonas positivas.....	6
PCR de colonias bacterianas.....	6
Expresión de LcrE en <i>Escherichia coli</i> .....	7
Purificación de la proteína LcrE.....	7
SDS-PAGE del extracto periplasmático.....	8
Secuenciación.....	8
Búsqueda y análisis de secuencias de DNA.....	8
III. Resultados.....	11
Aislamiento y amplificación de <i>lcrE</i> .....	11
Clonación y construcción de transformantes del gen <i>lcrE</i> .....	11
Secuenciación del producto de PCR.....	13
Expresión de la proteína LcrE recombinante.....	14
Análisis de la secuencia aminoácida de la proteína.....	14
IV. Discusión.....	15
V. Conclusiones.....	17
VI. Anexos.....	18
Anexo 1.....	18
Anexo 2.....	19
Anexo 3.....	19
Anexo 4.....	20
VII. Referencias.....	22

---

---

## Abreviaturas

<b>Cds</b>	Secreción dependiente de contacto
<b>CopN</b>	Proteína externa N de <i>Chlamydia</i>
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm
<b>EB</b>	Cuerpo elemental
<b>HLA</b>	Antígenos leucocitarios humanos
<b>IB</b>	Cuerpo intermedio
<b>Inc</b>	Proteínas de inclusión
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LcrE</b>	Proteína E de respuesta a bajas concentraciones de calcio
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RB</b>	Cuerpo reticular
<b>RFLPs</b>	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
<b>Scc</b>	Chaperona específica de <i>Chlamydia</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>Syc</b>	Chaperona específica de <i>Yersinia</i>
<b>TTS</b>	Secreción tipo III
<b>Yop</b>	Proteína externa de <i>Yersinia</i>
<b>Ysc</b>	Proteína de secreción de <i>Yersinia</i>

## Índice de figuras

Figura. 1. Representación esquemática del ciclo de desarrollo de <i>Chlamydia</i> y sus interacciones con la célula huésped. ....	3
Figura. 2. Diagrama de un hipotético aparato de secreción tipo III presente en la pared clamidial. ....	4
Figura. 3. Estrategia de clonación. ....	10
Figura. 4. Amplificación del gen <i>lcrE</i> . ....	11
Figura. 5. PCR colony del plásmido recombinante pCR-lcre.....	12
Figura. 6. Restricción del plásmido pCR-lcre. ....	12
Figura. 7. Comparación de la secuencia del gen <i>lcrE</i> clonado en contra la secuencia del genoma de <i>Chlamydia trachomatis</i> , NC_000117, usando el programa Blast 2. (91%).....	13
Figura. 8: SDS-PAGE del extracto periplasmático .....	14

## Índice de anexos

Anexo 1. Cepas bacterianas y plásmidos.....	18
Anexo 2. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para la PCR y secuenciación .....	19
Anexo 3. Choque osmótico.....	19
Anexo 4. Alineamiento de proteínas de respuesta a bajas concentraciones de calcio homologas de LcrE de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	20



## Resumen

*Chlamydia trachomatis* posee genes que pueden codificar para un aparato de secreción tipo III, por medio del cual se cree que modula las vías de señalización de la célula huésped, la síntesis de proteínas y la inhibición de la apoptosis de la célula, así como la degradación de los factores de transcripción. Aunque se ha observado que clamidia modifica activamente la membrana de inclusión con proteínas integrales de membrana (Inc), no existe evidencia de que estas proteínas modulen los procesos de la célula. Se especula que LcrE (CT089) actúa como un regulador que inhibe la secreción de proteínas efectoras en ausencia de una señal de contacto con una célula *in vivo* o de una disminución en la concentración extracelular de  $[Ca^{++}]$ . Se aisló el gen *lcrE* por PCR y se clonó en el plásmido pCR 2.1, posteriormente se subclonó en el plásmido pBAD gIII, induciendo la expresión de la proteína recombinante con una solución de arabinosa al 2%.

Palabras clave: LcrE, YOPN, *Chlamydia trachomatis*, TTS, *Escherichia coli*, *Yersinia*.

## Abstract

*Chlamydia trachomatis* has genes that can codify for a secretion apparatus type III, which is thought to modulate the routes of signaling of the cell host, the protein synthesis and the inhibition of the apoptosis of the cell host as well as the degradation of transcription factors. Although it has been observed that *Chlamydia* actively modifies the inclusion membrane with integral membrane proteins (Inc), there is not evidence of which these proteins modulates the processes of the cell. It is speculated that LcrE (CT089) acts like a regulator that prevents the secretion with effector proteins in absence of a signal the contact with an alive cell in or the diminution of  $Ca^{2+}$  in the environment. The gene *lcrE* was isolated by PCR and cloning in plasmid pCR 2.1, later subcloning in plasmid pBAD gIII, inducing the expression of the recombinant protein by means of arabinose.

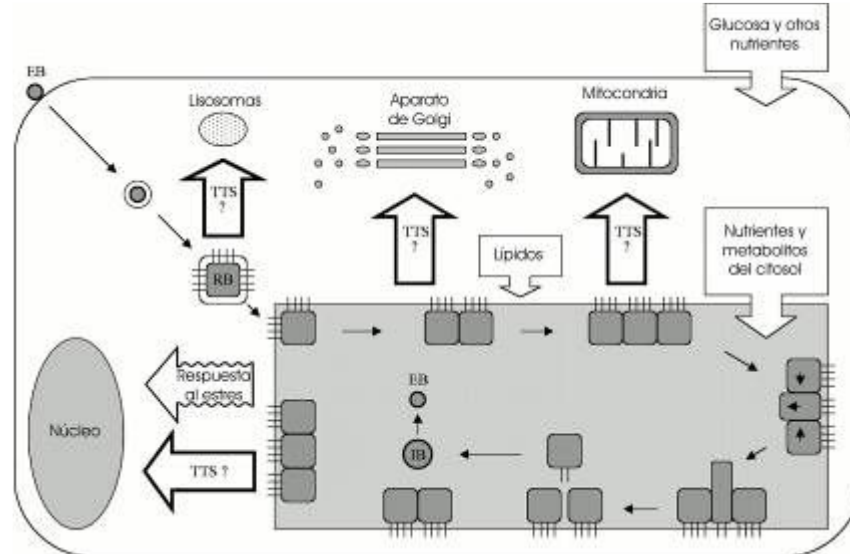
Key words: LcrE, YOPN, *Chlamydia trachomatis*, TTS, *Escherichia coli*, *Yersinia*.

## I. Introducción.

Los miembros de la familia *Chlamydiae* son patógenos intracelulares obligados que han establecido un nicho único en la célula huésped. Como grupo, esta estrategia ha sido exitosa, *Chlamydia spp* causa una variedad de enfermedades en varias especies animales de casi todos los niveles filogenéticos. *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* se cuentan entre los patógenos más significativos para el humano: *Chlamydia trachomatis* es el principal agente bacteriano causante de ceguera infecciosa prevenible en el mundo, y la especie bacteriana más comúnmente transmitida por vía sexual, causando la enfermedad pélvica inflamatoria. Entre las secuelas de la infección por *Chlamydia trachomatis*, destacan la ceguera por tracoma, el dolor pélvico crónico, el embarazo ectópico y la infertilidad. *Chlamydia pneumoniae* es causante del 10% al 20% de las neumonías adquiridas en la comunidad y ha sido asociada con la arteriosclerosis coronaria, el asma, la esclerosis múltiple, los infartos y, recientemente, con la enfermedad de Alzheimer. (1, 3, 4)

Los principales determinantes de la patogénesis clamidial son complicados y aún no están claros, debido al estilo de vida intracelular y a la resistencia a la manipulación genética de la bacteria. Aparentemente *Chlamydia* no es toxigénica y en muchos casos la infección es asintomática y persistente. Las enfermedades clamidiales crónicas se desarrollan dependiendo de varias condiciones, incluyendo la capacidad para adherirse y crecer en las células blanco, de mecanismos de diseminación y persistencia, de la remodelación dirigida del ambiente intracelular y de la naturaleza de la respuesta inmune a la infección. (1) La información genómica, en combinación con los nuevos hallazgos en la biología molecular y celular de la infección, ha permitido nuevos enfoques para el estudio de estos organismos únicos, uno de los cuales consiste en que el microorganismo explota y altera las vías de

señalización y el tráfico intracelular del huésped ajustando las condiciones para su propio desarrollo y fines patogénicos, por una vía de secreción dependiente de contacto similar a la encontrada en muchos otros patógenos bacterianos. (2) La vía de secreción de proteínas tipo III es un fenómeno observado exclusivamente en las bacterias gram negativas, y representa quizás el mecanismo más complejo de traslocación de proteínas en la biología. Encontrada sólo en organismos patógenos, ésta vía ha sido implicada en el propósito expreso de enviar proteínas que manipulen las funciones celulares en el citosol de las células eucarióticas blanco en un esfuerzo por sobrevivir causando enfermedad. (5, 6) La función del sistema de secreción tipo III en clamidia parece ser la modificación de los procesos de la célula huésped que pueden ser necesarios para la invasión celular, la remodelación de la membrana de inclusión o afectar las vías metabólicas y de señalización de la célula huésped. *Chlamydia* altera los patrones de fosforilación en residuos de tirosina e influencia los componentes del citoesqueleto de la célula huésped. (7) Aunque se ha visto que *Chlamydia* modifica activamente la membrana de inclusión con una familia de proteínas integrales de membrana (Incs), no hay evidencia directa del papel de las proteínas Incs en la modulación de los procesos celulares. Por lo tanto, el mecanismo por el cual *Chlamydia* crea y mantiene un nicho intracelular privilegiado que es esencial para su sobrevivencia, aún no se ha determinado, figura 1. (3, 8)



**Figura 1. Representación esquemática del ciclo de desarrollo de *Chlamydia* y sus interacciones con la célula huésped.**

Inmediatamente después de la invasión, *Chlamydia* inhibe la fusión de la vacuola con los lisosomas. Durante la fase de replicación, la expresión de transportadores en la membrana plasmática son modificados, y los lípidos, nutrientes y metabolitos del citosol y organelos de la célula huésped son desviados hacia la inclusión. Durante la fase tardía, hay pérdida de contacto mediada por TTS con la vacuola; con la separación del RB de la membrana inicia su diferenciación en IB y posteriormente en EB. (2)

TTS: Sistema de secreción tipo III  
IB: Cuerpo inicial o intermedio

RB: Cuerpo reticular  
EB: Cuerpo elemental

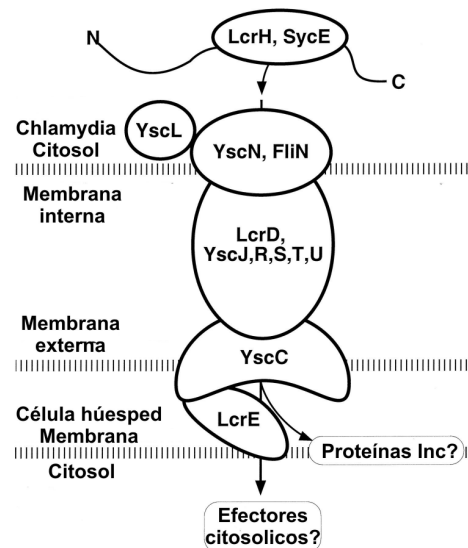
En *Chlamydia spp* se han encontrado genes en varios grupos diseminados en el cromosoma que codifican para proteínas similares a los componentes del aparato de secreción tipo III de *Yersinia spp*, mostrando la capacidad de secretar proteínas por este sistema de secreción. Un loci que contiene cuatro posibles genes del sistema de secreción tipo III, designados chaperona específica de *Chlamydia* (*scc1*), proteína externa N de *Chlamydia* (*copN*) y proteínas 1 y 2 de secreción dependientes de contacto (*cds1* y *cds2*) basándose únicamente en la similitud de su secuencia con los genes *sycE*, *yopN* (*IcrE*), *yscU* y *yscV*, respectivamente, de *Yersinia spp*. (8) Este mecanismo de secreción ha sido mejor caracterizado en *Yersinia spp* en la cual la secreción de las proteínas anti-huésped (Yops) es mediada por un aparato de secreción tipo III (Ysc), codificado en un plásmido de virulencia. La secreción por este mecanismo esta caracterizada como “dependiente de contacto” y es inhibida antes del contacto con la célula huésped, por un complejo de proteínas incluyendo la

proteína LcrE. (9-12) Sin embargo la secuencia genómica de *Chlamydia* demuestra que en muchos aspectos el sistema de secreción tipo III parece diferente entre *Chlamydia* y otras bacterias. Primero, los genes no están fuertemente agrupados en el genoma como en los plásmidos de virulencia de *Yersinia* o en las islas de patogenicidad de otras bacterias. Segundo, no se encuentran homólogos o cualquier otra proteína que comparta identidad con proteínas efectoras conocidas en otras bacterias. *Chlamydia spp* codifica una colección mínima de proteínas involucradas con la maquinaria secretora y sólo codifica para una proteína, LcrE, involucrada en el control de la secreción de proteínas Yop en *Yersinia spp*, mientras que *Yersinia spp* codifica tres proteínas (LcrE, TyeA, y LcrG) con esta función. Es posible que muchas proteínas involucradas en el sistema de secreción tipo III sean exclusivas de este sistema o que una sola proteína tenga múltiples funciones en el sistema de secreción tipo III. (1) Figura 2.

La expresión de LcrE clamidial ha sido reportada en *Yersinia enterocolitica* (11) y en *C. pneumoniae* (4) aportando evidencia experimental de un sistema de secreción tipo III funcional en *Chlamydiae*.

El propósito de este estudio fue desarrollar un protocolo de clonación y expresión del gen *lcrE* de *Chlamydia trachomatis* en

*Escherichia coli* y caracterizar las clonas recombinantes y los parámetros de expresión, con el objeto de disponer de un sistema que permita estudiar la proteína.



**Figura 2. Diagrama de un aparato de secreción tipo III hipotético presente en la pared clamidial.**

Las proteínas clamidiales con homología aparente en otros sistemas son colocadas de acuerdo a los modelos derivados de otras bacterias gram negativas. (1)

## II. Material y métodos.

### ***Cepas bacterianas, plásmidos y DNA de Chlamydia trachomatis.***

El DNA genómico de *Chlamydia trachomatis* fue purificado de una muestra clínica del banco de DNA de raspados cervicales del Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Universidad Autónoma de Guerrero, correspondiente al genotipo E y tipificada por PCR-RFLP. (13)

Para la expresión de LcrE en *Escherichia coli*, se usó el plásmido pBAD gIII (Invitrogen). Las cepas de *Escherichia coli* usadas fueron DH5 $\alpha$  (Gibco-BRL) y Top10 (Invitrogen). Anexo 1.

### ***Aislamiento y amplificación de gen lcrE.***

La secuencia del gen *lcrE* de *Chlamydia trachomatis* (GenBank AE001283) fue usada para el diseño de dos oligonucleótidos iniciadores CTS3D y CT4F, para amplificar el gen *lcrE* incluyendo el codón de paro (CTS3D y CT4F). (14) El gen *lcrE* fue aislado por PCR con los iniciadores sentido CTS3D (5' **ATGACTGCATCAGGAGGAGCT** 3') y antisentido CT4F (5' **AATGGGTGATGGAGGCTGTGT** 3') amplificando un segmento de 1,266 pb. Se usó 1  $\mu$ g de DNA en 50 ml de la mezcla de reacción conteniendo agua destilada estéril, buffer para PCR 0.7X (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM (Invitrogen), desoxinucleótidos trifosfatados (dGTP, dATP, dCTP, dTTP), 0.2 mM (GIBCO/BRL), oligonucleótidos iniciadores 0.3 mM y 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador PERKIN ELMER GeneAmp PCR System 2400, con una desnaturalización inicial de 94°C por 10 min; se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación como sigue: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento de los oligonucleótidos iniciadores a 63°C por 1 min, extensión a 72°C por 2 min y una

extensión final a 72°C por 10 min. Anexo 2.

### **Clonación del gen *lcrE* en *Escherichia coli*.**

El gen *lcrE* fue clonado mediante la siguiente estrategia, figura 3, el producto de PCR fue ligado con la T4 DNA Ligasa al vector TA pCR 2.1 (Invitrogen), el plásmido recombinante se denominó pCR-*lcrE*. La mezcla de ligación fue usada para transformar *Escherichia coli*, cepa DH5 $\alpha$ ; y las colonias transformantes, fueron seleccionadas de placas de agar Luria Bertani (LB) suplementadas con 50 mg/ml de ampicilina. El fragmento extraído con *EcoRI* fue purificado en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% por fenol/cloroformo, y ligado al plásmido pBAD gIII, el plásmido recombinante fue denominado pBAD-*lcrE*, e introducido en *Escherichia coli* TOP 10 inducible con arabinosa. La orientación correcta y contenido de nucleótidos del fragmento introducido fue probado por secuenciación.

### **Análisis de clonas positivas.**

#### *PCR de colonias bacterianas.*

Las colonias transformantes fueron seleccionadas por PCR utilizando para la amplificación los iniciadores M13 sentido (-20) (5' **GTAAAACGACGGCCAG** 3') y M13 antisentido (5' **CAGGAAACAGCTATGAC** 3') para el plásmido pCR 2.1 TOPO amplificando un segmento de 1,282 pb. Las colonias seleccionadas fueron tomadas con un palillo estéril, el cual fue introducido en 25  $\mu$ l de la mezcla de reacción conteniendo agua destilada estéril, buffer para PCR 1X (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM (Invitrogen), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dGTP, dATP, dCTP, dTTP), 0.2 mM (GIBCO/BRL), oligonucleótidos iniciadores 0.3 mM y 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador (PERKIN ELMER GeneAmp PCR System 2400) con una desnaturalización inicial de 94°C por 2 min, se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación como sigue: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento de los oligonucleótidos iniciadores a 55°C por 1 min, extensión a 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C por 7 min.

El DNA plasmídico de las clonas positivas se sometió a restricción con *EcoRI*

---



para confirmar la presencia del gen *lcrE*.

***Expresión de LcrE en Escherichia coli.***

Para determinar la expresión óptima de LcrE, se aislo una colonia transformante en placas de agar LB que contenia 50 µg/ml de ampicilina, incubada por 16 a 24 hrs a 37°C, se usó para inocular 10 ml de medio LB conteniendo 50 µg/ml de ampicilina. El cultivo líquido fue incubado a 37°C en un baño metabólico con agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de ~0.5. La arabinosa fue adicionada para inducir la expresión de LcrE. Para determinar la concentración óptima de arabinosa para inducir la expresión, se adicionaron al cultivo concentraciones finales de 0.002, 0.02, 0.2 y 2% e incubando por 4 a 6 hrs. La bacteria fue cosechada por centrifugación (13,200 rpm, 5 min).

*Purificación de la proteína LcrE.*

La purificación de la proteína LcrE se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Describiendo brevemente el proceso: se cultivó a 37°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> = ~0.5. Se removió 1 ml de cultivo, se centrifugó (13,200 rpm 30 segundos). Se adicionó la cantidad apropiada de arabinosa para inducir la expresión de la proteína. Se cultivaron las células por 4-6 hrs. Se separó un 1 ml de las células cosechadas, se centrifugó a máxima velocidad, se eliminó el sobrenadante y se colocaron en hielo.

Se resuspendieron las células en la solución de choque osmótico #1 (con sacarosa) a una DO<sub>600</sub> de ~0.5 se incubaron en hielo por 10 minutos, se centrifugó por 1 minuto a 4°C y decantó el sobrenadante. Posteriormente las células se resuspendieron en la solución de choque osmótico #2. Se incubó en hielo por 10 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Finalmente las células se resuspendieron en la solución de choque osmótico #2. Anexo 3.

*SDS-PAGE del extracto periplasmático.*

Se mezclaron volúmenes iguales de buffer [62.5 mM Tris pH 6.8, 10% (v/v) glicerol, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol, 2% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 0.001% de azul de bromofenol] con las muestras y los controles negativo: pBADgIII sin inserto y positivo: pBADgIII + calmodulina. Se calentaron por 10 min previamente a la electroforesis en geles de poliacrilamida, (4% el de apilamiento y 7.5% el de resolución) a un voltaje constante de 200 V, usando el sistema de buffers de Laemmli. Los geles fueron teñidos con 0.25% azul de Coomassie R250, 7% de ácido acético y 30% de etanol. (15) El estándar de proteínas usado para estimar el peso molecular de la proteína fue: fosforilasa b (94,000 Da), albúmina de suero bovino (67, 000 Da), ovoalbúmina (43,000 Da), anhidrasa carbónica (30,000 Da), inhibidor de tripsina (20,100 Da) y lisozima (14,400 Da) (BIO-RAD)

**Secuenciación.**

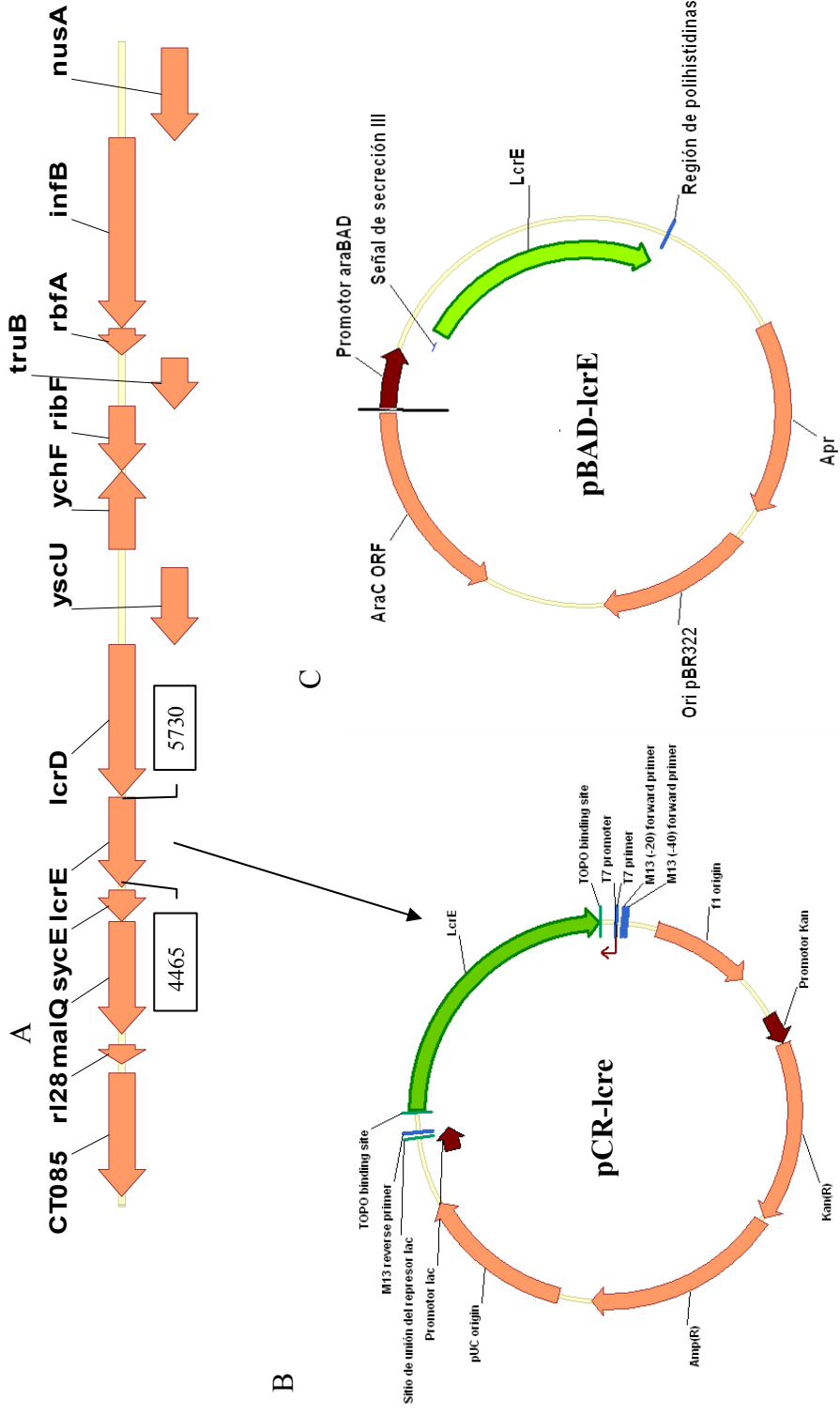
El producto de PCR fue purificado a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% mediante la técnica de fenol-cloroformo. El producto de PCR purificado fue secuenciado usando el secuenciador automático ABI PRISM 310 (APPLIED BIOSYSTEM). La secuenciación se llevó a cabo con el kit “Big Dye Terminator” (APPLIED BIOSYSTEM), utilizando los oligonucleótidos iniciadores sentido CTS3D (5' **ATGACTGCATCAGGAGGAGCT** 3'), antisentido CT4F (5' **AATGGGTGATGGAGGCTGTGT** 3').

El DNA del plásmido pBAD-IcrE fue secuenciado para confirmar que la secuencia, dirección y marco de lectura fueran correctos, utilizando el oligonucleótido iniciador sentido pBAD Forward (5' **ATGCCATAGCATT TTTATCC** 3') de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**Búsqueda y análisis de secuencias de DNA.**

Las secuencias nucleotídicas de los iniciadores fueron analizadas con los programas BLASTN (16) y Virtual PCR (17) para determinar el correcto alineamiento

con el DNA genómico y predecir él o los productos de amplificación. Para conocer la homología de LcrE, se alinearon las secuencias usando CustalW (18) (creación de huecos y penalización de extensiones de 10.00 y 0.50 respectivamente) y el porcentaje de similitud e identidad entre YopN de *Yersinia enterocolitica* y LcrE de *Chlamydia trachomatis* fue obtenido usando Needle. (19) Anexo 4.



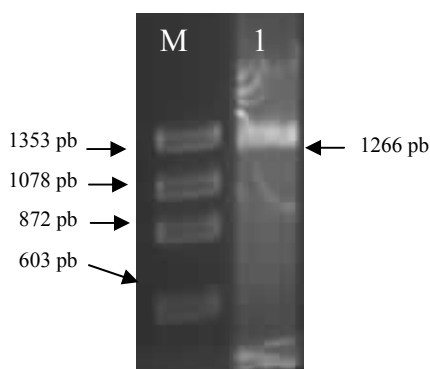
**Figura 3. Estrategia de clonación.**

**A.** Sección 10 de 87 del genoma completo de *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX (AE001283), el ORF *lcrE* fue aislado por PCR. **B.** El ORF *lcrE* fue clonado en el vector pCR2.1 TOPO. **C.** Por restricción con *EcoRI* se extrajo el fragmento con el ORF *lcrE* para clonarse en vector pBAD gIII.

### III. Resultados.

#### ***Aislamiento y amplificación de lcrE.***

Usando oligonucleótidos específicos diseñados de acuerdo a las secuencias depositadas en el GenBank se amplificó el gen *lcrE* de *Chlamydia trachomatis* con el codón de paro, figura 4.

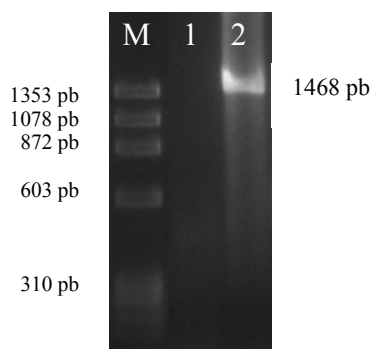


**Figura 4. Amplificación del gen *lcrE*.**

El carril M contiene el marcador  $\phi$  174 digerido con *Hae*III (Invitrogen), en el carril 1 el producto de la PCR de 1,266 pb

#### ***Clonación y construcción de transformantes del gen lcrE.***

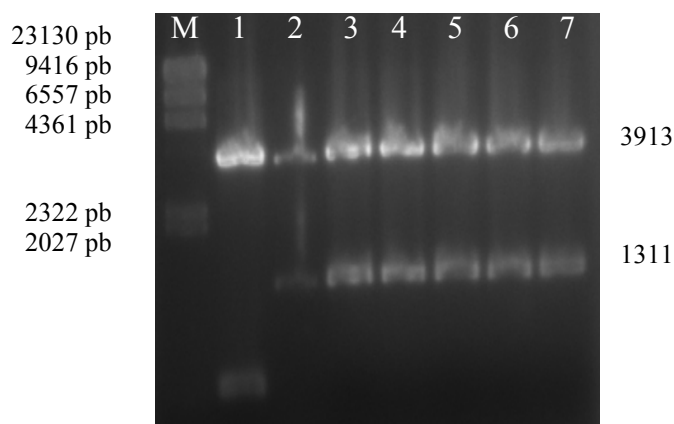
El gen *lcrE* fue clonado en el plásmido pCR 2.1 TOPO, para lograrlo se incremento el tiempo de extensión final de la PCR a 60 minutos para asegurar la adición de adeninas en el extremo 3'. Se introdujo por transformación en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , el plásmido recombinante fue denominado pCR-*lcrE* las colonias positivas fueron analizadas por PCR para determinar la presencia del inserto, utilizando los iniciadores M13 sentido (-20) y M13 antisentido obteniendo un fragmento de 1,468 pb, figura 5.



**Figura 5. PCR de colonias bacterianas con el plásmido recombinante pCR-lcrE.**

El carril M contiene el marcador  $\phi$ 174 digerido con *HaeIII* (Invitrogen), en el carril 1 hay colonias sin inserto y en el carril 2 se muestra el amplicón de una colonia recombinante *Escherichia coli*.

La restricción con *EcoRI* del plásmido pCR-lcrE originó dos bandas, una correspondiente al vector y otra al inserto, el gen *lcrE*, figura 6. A partir de la restricción del plásmido recombinante con *EcoRI*, se purificó el fragmento de 1,311 pb para introducirlo al plásmido de expresión pBAD gIII, un plásmido inducible por arabinosa, el cual fue denominado pBAD-lcrE.



**Figura. 6. Restricción del plásmido pCR-lcrE con *EcoRI*.**

Restricción del DNA plasmídico de las clonas transformantes. Carril M, lambda digerido con *HindIII*, carril 1, clona sin inserto y carriles 2 al 7 clonas recombinantes con el gen *lcrE*.

## Secuenciación del producto de PCR.

El producto de PCR fue purificado a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% con fenol-cloroformo. El producto de PCR purificado fue secuenciado usando el secuenciador automático ABI PRISM 310 (APPLIED BIOSYSTEM). La secuenciación se llevó a cabo con el kit "Big Dye Terminator" (APPLIED BIOSYSTEM). La secuencia obtenida se comparó en el programa Blast 2, figura 7, encontrándose una homología del 91% con la secuencia del gen *IcrE* de *Chlamydia trachomatis* genotipo E al compararla con el genotipo D/UW-3/CX.

```

Query: 830      tttttgatagaaat-attgggaacttgaaaaatagc-ttaaagcatgaaggacatgcccc 887
              ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| |
Sbjct: 396      ttttnggtagaaatgntnggg-anttgaaaaatngccttgaagca-gaaggacatgcccc 339

Query: 888      tatt-ccatccttaacgacaggaatattaactaaaaccttcttacaattagtagaagata 946
              ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| |
Sbjct: 338      tattcccatccttanccgacaggaatattaantaagccttcttacaattagtagaagata 279

Query: 947      aattcccttctcttccaaagctcaaaaggcattaaatgaactggtaggccagatactg 1006
              ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| |
Sbjct: 278      aattcccttctcttccaaagctcaaaaggcattaaatgaactggtaggccagatactg 219

Query: 1007     gtccctcaaactgaagttttaacttattcttccgcgctcttaatggctgttcgcctagaa 1066
              ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| |
Sbjct: 218      gtccctcaaactgaagttttaacttattcttccgcgctcttaatggctgttcgcctagaa 159

Query: 1067     tattctctggagctgnnnnnnncagcagctggcatcggttatcacaatacgcctagatg 1126
              ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| |
Sbjct: 158      tattctctggagctgaaaaaaaaacagcagctggcatcggttatcacaatacgcctagatg 99

Query: 1127     cgataaatgCGGataatgaggattatcctaaaccaggtgacttcccacgatcttccttct 1186
              ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| |
Sbjct: 98      cgataaaggnggataatgaggattatcctaaaccaggtgacttcccacgatcttccttct 39

Query: 1187     ctagtacgcctcctcatgctccag 1210
              | ||||| | ||||| | ||||| |
Sbjct: 38      gg-g-acgcctcctcatg-tccag 18

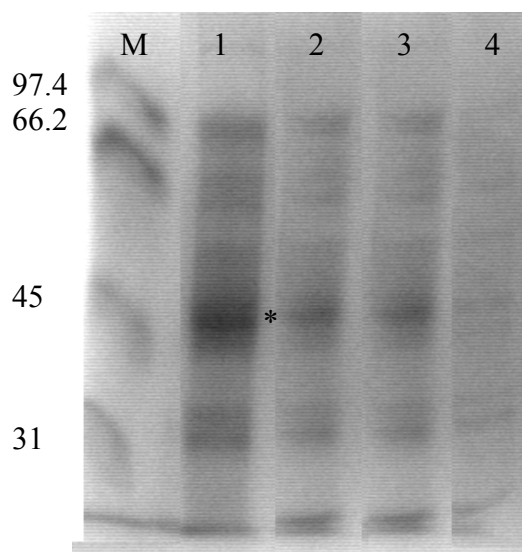
```

**Figura. 7. Comparación de la secuencia del gen *IcrE* de *Chlamydia trachomatis* serovar E contra la secuencia del genoma de *Chlamydia trachomatis*, NC\_000117 serovar D, usando el programa Blast 2. (91%)**

El plásmido pBAD-IcrE fue secuenciado usando el oligonucleótido iniciador pBAD forward (5' **ATGCCATAGCATT TTTTATCC** 3') confirmando que el inserto se encuentra en marco de lectura.

### **Expresión de la proteína LcrE recombinante.**

Todas las clonas se cultivaron hasta tener una densidad de  $DO_{600} \sim 0.5$  y se estimularon con 2% de arabinosa por 4 horas. Los lisados bacterianos fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE), las proteínas fueron visualizadas con azul de Coomassie R250. Figura 8.



*Figura. 8: SDS-PAGE del extracto periplasmático.*

Perfil de proteínas de *Escherichia coli* después de 4 horas de inducción con arabinosa. Carriles 1, 2, 3 y 4 con arabinosa (2, 0.2, 0.02 y 0.002% respectivamente) el asterisco señala la ubicación de la proteína LcrE de 45,101 Da. El carril M corresponde al marcador de peso molecular (Da)

### **Análisis de la secuencia aminoácida de la proteína.**

LcrE es un polipéptido de 421 aminoácidos con un peso molecular calculado de 45,101 Da. La secuencia aminoácida de LcrE fue homóloga a la secuencia aminoácida de YopN (14.5 % de identidad, 25.3 % de similitud), el análisis también reveló homología de LcrE con MxiC, (15.9 % de identidad, 34.6 % de similitud). La homología de LcrE con YopN, fue generalmente baja y permitió observar huecos en las secuencias correspondientes a los diferentes tamaños entre estos polipéptidos. Anexo 3.



## IV. Discusión.

Los genomas de *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci* contienen genes que codifican para un aparato de secreción tipo III, como en otros patógenos, probablemente *Chlamydia* usa este sistema para secretar proteínas en el citosol de la célula huésped. Las interacciones entre *Chlamydia* y las células eucarióticas son esenciales para la sobrevivencia y desarrollo de *Chlamydia*. Los miembros de la familia *Chlamydiae* son parásitos intracelulares obligados, ya que se desarrollan únicamente en una vacuola dentro de la célula huésped, donde el sistema de secreción probablemente juega un papel central en estas interacciones. (1) Debe de haber mayor manipulación genética de los genes que codifican para el sistema de secreción tipo III de *Chlamydia spp* para entender la estructura, función y conformación del sistema de secreción tipo III. A la fecha no se ha logrado una transformación efectiva y estable de *Chlamydia*. La alternativa a la manipulación genética directa de la bacteria es el desarrollo de sistemas heterólogos que puedan ser usados para tales investigaciones. Usar sistemas heterólogos hace factible enfocarse en la estructura, función, antigenicidad e inmunogenicidad. El gen *IcrE* es un candidato apropiado por el papel que desempeñan las proteínas homólogas en otras bacterias patógenas, p. ej. *Yersinia*. En *Yersinia sp* *LcrE* (YopN), *TyeA* y *LcrG*, controlan la salida de proteínas efectoras a la membrana o al citosol de la célula eucarionta, como un tapón. Sin embargo *Chlamydia* posee solo una proteína, *LcrE* homóloga, que podría controlar la secreción de las proteínas efectoras de *Chlamydiae*. (1)

En *Yersinia*, *YopN* es un sustrato de la secreción dependiente de contacto, la cual, con otras *Yops* permanecen asociadas a la membrana externa. Después del contacto *YopN*, parece transmitir una señal, que inicia la expresión y liberación de proteínas efectoras, controlando la liberación de las mismas. Es posible, por su homología con *Yersinia*, que *LcrE* de *Chlamydia trachomatis* funcione como un regulador del paso de proteínas efectoras entre *Chlamydia* y la célula huésped.

En este estudio nos enfocamos en la clonación y expresión molecular del gen *lcrE* usando el plásmido inducible por arabinosa pBAD gIII.

La expresión óptima de LcrE fue lograda usando 2% de arabinosa, cuatro horas después de la inducción.

El gen *lcrE* clonado y expresado en *Escherichia coli* resultó en la producción controlada de proteína y DNA susceptible a ser manipulado para el estudio de la estructura y función de la misma.

Tradicionalmente se ha considerado a clamidia sensible a los antibióticos, sin embargo, varios estudios han reportado la aparición de cepas resistentes a los tratamientos de elección como los alternativos. (20-25) El sistema de secreción tipo III representa un mecanismo importante de sobrevivencia y virulencia, por los mecanismos en el cuales se ha implicado, figura 1, y representa una posibilidad de blancos para el diseño de drogas que ataquen procesos no vitales de la bacteria, como lo hacen los antibióticos actuales, pero sí interfiriendo con los mecanismos de patogenicidad, permitiendo que el sistema inmune controle la infección. (26, 27)

En resumen, nuestro sistema de LcrE clamidial provee herramientas para el estudio del sistema de secreción tipo III y podría ayudar al desarrollo de vacunas o nuevas drogas para el control de la infección por *Chlamydia spp.*

## **V. Conclusiones.**

- Se clonó el gen *lcrE* en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y se establecieron las condiciones para la expresión de la proteína.
- Se obtiene la mayor expresión de LcrE cuando se estimulan las bacterias con una solución de arabinosa al 2%
- Este sistema de expresión es práctico para la obtención de proteína purificada que puede ser utilizada para la producción de anticuerpos monoclonales.
- Se dispone de un medio para modificar la secuencia de la proteína y observar los efectos en su estructura y función.

## VI. Anexos.

### Anexo 1.

Cepas bacterianas y plásmidos.

<b>Cepa o plásmido</b>	<b>Propiedades</b>	<b>Fuente o referencia</b>
<i>Escherichia coli</i> K12		
DH5 $\alpha$	F- $\Delta 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1HsdR17 (r_K^- r_M^+) phoA supE44 \lambda thi-1$	GIBCO-BRL
TOP10	F- $mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Delta 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 araD139 \Delta(araA-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG.$	Invitrogen
Plásmidos y construcciones		
pCR2.1	Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> ; vector de clonación TOPO TA	Invitrogen
pBAD gIII	Ap <sup>r</sup> ; vector de expresión para la creación de proteínas de fusión His <sub>6</sub> C-terminal	Invitrogen
pCR_lcrE	<i>lcrE</i> (CT089) <sup>a</sup> amplificado por PCR y clonado en pCR2.1	Este estudio
pBAD_lcrE	<i>lcrE</i> (CT089) <sup>a</sup> subclonado en pBAD gIII.	Este estudio

a. Designación del gen en el proyecto Genoma *Chlamydia trachomatis*

**Anexo 2.**

Oligonucleótidos iniciadores utilizados para la PCR y secuenciación.

<b>Nombre de los oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia (5' – 3')</b>
CTS3D	R 5' ATGACTGCATCAGGAGGAGCT 3'
CT4F	F 5' AATGGGTGATGGAGGCTGTGT 3'
M13 Forward (-20)	F 5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
M13 Reverse	R 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
pBAD forward	F 5' ATGCCATAGCATT TTTTATCC 3'

**Anexo 3.**

Choque osmótico.

Solución 1	20 mM Tris-HCl, pH 8 2.5 mM EDTA 20% sacarosa
Solución 2	20 mM Tris-HCl, pH 8 2.5 mM EDTA

**Anexo 4.**

Alineamiento de proteínas de respuesta a bajas concentraciones de calcio homologas de LcrE de *Chlamydia trachomatis*.

```

YP_LCRE_KIM      MTT---LHNLSYGNTPLHN---ERPEIASSQI-VNQTGQFRGESVQIVSGTLQSIADMA
LCRE_CT          MTASGGAGGLGSTQTVDA---RAQAAAATQD-AQEVIGSQEASEASMLKGCEDLINPAA
MxiC             MLD---VKNTGVFSSAFID---KLNAMTNSDDG-DET-ADAELDSGLANSKYIDSSDEMA
YOPN_Dsv         --M---SIDLRGVSGP-----AQPLANVQDGPDGAAGTLLGRAATVVDSPLSLLADAA
CP_YOPN_TW-183  -----MDQLTTDFDTLMSQLGDVNLT----TVVGRITEVVGMLIKAVVPNVRVGE

YP_LCRE_KIM      -----EE-----VTFVFSERKELSLDKRKLSDSQARVSD--VEEQVNQYLSKVP
LCRE_CT          ATRIKKKGGEK-----FESLEARRKPTADKAEEKSESTEEKGDTPLEDRFTEDLSEVS
MxiC             -----SA-----LS-SFINRRDLEKLGKGTNSDSQERILD--GEE--DEINHKIF
YOPN_Dsv         -----EE-----LTFAADTTDDFELSERKERKS-----TEDAMAERIELYK
CP_YOPN_TW-183  VCLVKRNGMEPLVTEVVGFTQSF AFLSPLGELSGVSPSSEVIPTGLP-----

YP_LCRE_KIM      ELEQKQNVSELLSLLSNP-----NISLSQLKAYLEGKSE---EP-----
LCRE_CT          -----GEDFRGLKNSF-----DDDSSPDEILDALTSK-FSDP-----
MxiC             D-----LKRRTL-----KDNLPLDRDFIDRLKRYFKDP-----
YOPN_Dsv         ELMHQAGKGEGLDRLKDSL-----KSQQGREQARQEALSQ-FPDP-----
CP_YOPN_TW-183  -LHIRAGNGL-LGRVNLGLGEPIDVETKGPLQNVDTFPI-FRAPPDPLHRAKLRQILST

YP_LCRE_KIM      -----SEQFKMLCGLR---DALKGRPELAH-----
LCRE_CT          -----TIKDLALDYLI---QTAPSDGKLKST-----
MxiC             -----SDQVLALRELL---NEKDLTAEQVEL-----
YOPN_Dsv         -----SDAWAALHDAL---QAFDDDP AIPDG-----
CP_YOPN_TW-183  GVRCIDGMLTVARGQRIGIFAGAGV GKSSLLGMIARNAEEADVNVIALIGERGREVREFI

YP_LCRE_KIM      -----LSHLVEQALVSM AEEQGETIVLG-----
LCRE_CT          -----LIQAKHQLMSQNPQ AIVGG-----
MxiC             -----LTKIINEIISGSEKSVNAG-----
YOPN_Dsv         -----VREAVRGAIADLEAEHGPAIRAG-----
CP_YOPN_TW-183  EGD LGEEGMKRSVIVVSTSDQSSQLRLNAAYVGT AIAEYFRDQGKT VVLMMSVTRFARA

YP_LCRE_KIM      -ARITPEAYRESQSGVNPLQPLRD TY-----RDAVMGYQGIYAIWSDLQK-----
LCRE_CT          -RNVLLASETFASRANTSPSSLRSL Y-----FQVTSSPSNCANLHQMLAS-----
MxiC             -INSAIQAKLFGNKMKLEPQLLRAC Y-----RGFIMGNISTTDQYIEWLG-----
YOPN_Dsv         -VHGALASAGFADLG--DADALRDLY-----RGTVCDFTTVEQVFATINE-----
CP_YOPN_TW-183  LREVGLAAGEPPARAGYT PVSFSTLPRLLERSGASDKGTITAFYTVLVAGDDMNEPVADE

YP_LCRE_KIM      -----RFPNGDIDSVILFLQKALSADLQSQQSGSGREKLGIVISDL
LCRE_CT          -----YLPS-EKTAVMEFLVNGMVADLKSEGPSIPPAKLQVYMTTEL
MxiC             -----NFGFNHRHTIVNFVEQSLIVDM DSEKPCSNAYEFGFVLSKL
YOPN_Dsv         -----RYGDERFDVAIGFLYRALSSDLGSDMPSMDGTHLESVNTSL
CP_YOPN_TW-183  VKSILDGHIVLSNALAQAYHYPAIDV LASISRLLTAIVPEEQRRIIGKAREVLA-----

YP_LCRE_KIM      QKLK---EFGSVSDQVKGFQWQ-----
LCRE_CT          SNLQALHSVNSFFDRNIGNLENSLKH EGHAPIPSLTGTGNLTKTFLQLVEDKFPSSSKAQK
MxiC             IAIKMIRTS DVI---FMKKLESS---SLLKDGS-LSAEQLLLTLLYIFQY PSESEQILTS
YOPN_Dsv         GQLRLLKSAHALCADVMTRWENV---HGVKDCP-LTAQGLLEQVVALRSENFLGALHIDR

```

---

```

CP_YOPN_TW-183 -----KYKANEMLIIR

YP_LCRE_KIM      FFSEGKTNGVRPF-----
LCRE_CT          ALNELVGPDTGPQTEVLNLFRRALNGCSPRIFSGAEKKQQLASVITNTLDAINADNEDYP
MxiC             VIEVSRAS--HEDSVVYQTYLSSVNESPHDIFKSESEREIAINILRELVTSA-YKKELSR
YOPN_Dsv         IAAQAKAPDIEHEVLFLQELLRMTRNVPAQLFDGTAGRMKLLDAVQDAVDRA-IDRED--
CP_YOPN_TW-183  IGEYRR-----GSDREIDFA-----IDHIDKLN-----

YP_LCRE_KIM      -----
LCRE_CT          KPGDFPRSSFSSTPPHAPVPQSEIPTSPTSTQPPSP
MxiC             -----
YOPN_Dsv         -----AFLAAQEG-----
CP_YOPN_TW-183  -----FLKQDIHEKTNYEAAQQLRAIFR-----

```

Alineamiento de proteínas homologas a LcrE de *Chlamydia trachomatis*.

YP\_LCRE\_KIM: proteína LcrE codificado en el plásmido pCD1 de *Yersinia pestis* KIM

LCRE\_CT: proteína LcrE de *Chlamydia trachomatis*

MxiC: proteína LcrE de *Escherichia coli*

YOPN\_Dsv: proteína LcrE de *Desulfovibrio vulgaris*

CP\_YOPN\_TW-183: proteína LcrE de *Chlamydia pneumoniae*

## VII. Referencias.

1. Rockey DD, Lenart J and Stephens RS. Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. *Infect Immun*. 2000;68(10):5473-9.
2. Bavoil PM, Hsia R and Ojcius DM. Closing in on Chlamydia and its intracellular bag of tricks. *Microbiology*. 2000;146 ( Pt 11):2723-31.
3. Fields KA and Hackstadt T. The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002;18:221-45.
4. Sleprenkin A, Motin V, de la Maza LM and Peterson EM. Temporal expression of type III secretion genes of Chlamydia pneumoniae. *Infect Immun*. 2003;71(5):2555-62.
5. Galán JE and Collmer A. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. *Science*. 1999;284(5418):1322-28.
6. Ramamurthi KS and Schneewind O. Type III protein secretion in Yersinia species. *Annu Rev of Cell & Dev Biol*. 2002;18(1):107 - 27.
7. Xia M, Bumgarner RE, Lampe MF and Stamm WE. Chlamydia trachomatis infection alters host cell transcription in diverse cellular pathways. *J Infect Dis*. 2003;187(3):424-34.
8. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis. *Science*. 1998;282(5389):754-9.
9. Anderson DM and Schneewind O. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by Yersinia enterocolitica. *Science*. 1997;278(5340):1140-3.
10. Cheng LW, Kay O and Schneewind O. Regulated secretion of YopN by the type III machinery of Yersinia enterocolitica. *J Bacteriol*. 2001;183(18):5293-301.
11. Fields KA and Hackstadt T. Evidence for the secretion of Chlamydia trachomatis CopN by a type III secretion mechanism. *Mol Microbiol*. 2000;38(5):1048-60.
12. Lee VT, Mazmanian SK and Schneewind O. A program of Yersinia enterocolitica type III secretion reactions is activated by specific signals. *J Bacteriol*. 2001;183(17):4970-8.
13. Yang CL, Maclean I and Brunham RC. DNA sequence polymorphism of the Chlamydia trachomatis omp1 gene. *J Infect Dis*. 1993;168(5):1225-30.
14. Kalendar R, FastPCR, PCR primer design, DNA and protein tools, repeats and own database searches program. 2005, [www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1.html/fastpcr.htm](http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1.html/fastpcr.htm).
15. Sambrook J and Russell D, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed ed, ed. Harbor CS. 2001, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
16. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res*. 1997;25(17):3389-402.
17. Lexa M, Horak J and Brzobohaty B. Virtual PCR. *Bioinformatics*. 2001;17(2):192-93.
18. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res*. 1997;25(24):4876-82.
19. Olson SA. EMBOSS opens up sequence analysis. *European Molecular Biology*



- Open Software Suite. *Brief Bioinform.* 2002;3(1):87-91.
20. Suchland RJ, Bourillon A, Denamur E, Stamm WE and Rothstein DM. Rifampin-resistant RNA polymerase mutants of *Chlamydia trachomatis* remain susceptible to the ansamycin rifalazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(3):1120-6.
  21. Wang SA, Papp JR, Stamm WE, Peeling RW, Martin DH and Holmes KK. Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for *Chlamydia trachomatis*: a meeting report. *J Infect Dis.* 2005;191(6):917-23.
  22. Rupp J, Gebert A, Solbach W and Maass M. Serine-to-asparagine substitution in the GyrA gene leads to quinolone resistance in moxifloxacin-exposed *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):406-7.
  23. Riska PF, Kutlin A, Ajiboye P, Cua A, Roblin PM and Hammerschlag MR. Genetic and culture-based approaches for detecting macrolide resistance in *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3586-90.
  24. Misyurina OY, Chipitsyna EV, Finashutina YP, Lazarev VN, Akopian TA, Savicheva AM, et al. Mutations in a 23S rRNA gene of *Chlamydia trachomatis* associated with resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(4):1347-9.
  25. Dreses-Werringloer U, Padubrin I, Kohler L and Hudson AP. Detection of nucleotide variability in rpoB in both rifampin-sensitive and rifampin-resistant strains of *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(7):2316-8.
  26. Longbottom D. Chlamydial vaccine development. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 7):537-40.
  27. Muller S, Feldman MF and Cornelis GR. The Type III secretion system of Gram-negative bacteria: a potential therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets.* 2001;5(3):327-39.