



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

“Hacia el análisis de la dinámica de expresión de los diferentes sistemas de secreción de *Escherichia coli* enterohemorrágica durante la infección de células epiteliales”

TESIS

Que presenta

QFB. LANDY ESTEPHANIA ZAMBRANO ARGÜELLO

Para obtener el grado de
**MAESTRA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOLOGÍA CELULAR**

Director de la tesis:

Dr. EMILIANO FERNANDO NAVARRO GARCÍA

Ciudad de México

Agosto, 2018

TUTOR

Dr. Emiliano Fernando Navarro García

Investigador Titular del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, Mex.

ASESORES

Dr. José Manuel Hernández Hernández

Investigador Titular del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, Mex.

Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva

Investigador Titular del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, Mex.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Dr. Emiliano Fernando Navarro García. Durante el desarrollo de este proyecto se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de una beca de maestría, N°.614028.

DEDICATORIA

A mi familia por el cariño que todos los días me regalan. Porque siempre están para mí a pesar del tiempo y la distancia, regalándome consejos y palabras de ánimo para continuar. Con todo mi cariño les dedico este logro a cada uno de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida y por permitirme realizar este sueño que ahora es una realidad.

A mi maravillosa mamá Rosina, por todo su amor y apoyo incondicional. A mi papá Roger, por su cariño y apoyo. A mi hermana Heidie, por sus consejos y cariño. A ustedes mi pequeño equipo, muchísimas gracias.

A mi tutor, Dr. Fernando Navarro García por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo. Por su paciencia y enseñanza, y por el tiempo que dedicado para que este trabajo pudiera realizarse, muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio, Octavio González, Paul Ugalde, Farid Tejeda, Luis Díaz y Fernando Flores. Por los buenos momentos, por compartirme enseñanzas y experiencias para mejorar mis experimentos.

A mis amigas Alejandra Corzo y Maritza Ríos, por su cariño, consejos y su grata compañía.

A mis amigos de toda la vida, Andrea Solís, Cecilia Domínguez, Jessica Constantino, Sadía Cal y Mayor, Carlos Canel y Marco Tipá, por siempre creer en mí, por siempre compartirme palabras de ánimo, por los excelentes momentos que me regalan y por la amistad que a pesar del tiempo y la distancia continua intacta.

A la M. en C. Lucía Chávez y la M. en C. Jazmín Huerta, por su apoyo técnico, su asesoría durante el desarrollo de este trabajo y su apreciable amistad.

Al Sr. Israel Flores, gracias por su apoyo técnico en el laboratorio.

Índice

LISTA DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	1
Patogénesis de EHEC	1
Sistemas de secreción	3
Sistema de secreción tipo I (T1SS).....	5
Sistema de secreción tipo 2 (T2SS).....	7
Sistema de secreción tipo 3 (T3SS).....	11
Sistema de secreción tipo V (T5SS)	13
Sistema de secreción tipo VI (T6SS)	17
Recombinación homóloga.....	20
Marcaje con isótopos estables de aminoácidos durante el cultivo celular (SILAC)	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
OBJETIVOS	24
Objetivo general:	24
Objetivos específicos:	24
Objetivos alcanzables durante la maestría:	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Cepas bacterianas	25
Mutagénesis de los sistemas de secreción.....	25

Obtención de células competentes por el método de CaCl ₂	26
Obtención de células electrocompetentes	26
Transformación de bacterias EHEC EDL933 competentes con los plásmidos pKD46 y el gen de resistencia a Kanamicina	26
Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados en este estudio	28
Marcaje de células en cultivo con isótopos estables de aminoácidos (SILAC) ..	29
Digestión de proteínas con Lys-C	29
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	30
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
<i>Western blot</i>	31
RESULTADOS	32
EHEC EDL933 es transformada de forma eficiente con el plásmido pKD46 que contiene la recombinasa red λ	32
EHEC EDL933 (<i>rec+</i>) no integró el gen de resistencia a kanamicina en el gen <i>escN</i>	33
Una nueva cepa certificada de EHEC EDL933 también fue transformada de forma eficiente con el plásmido pKD46 que contiene la recombinasa red λ	35
EHEC EDL933 (<i>rec+</i>) integra eficientemente el gen de resistencia a kanamicina en el gen <i>hlyD</i>	36
EHEC EDL933 (<i>rec+</i>) integra eficientemente el gen de resistencia a kanamicina en los genes <i>clpV</i> y <i>etpC</i>	37
EHEC EDL933 (<i>rec+</i>) no integró el gen de resistencia a kanamicina en <i>virK</i>	38
Diseño de oligonucleótidos para corroborar por PCR mutantes en los sistemas de secreción de EHEC EDL933	40
EHEC EDL933 (<i>rec+</i>) adquiere resistencia a kanamicina sin eliminar genes	41
Bacterias en fase logarítmica y la óptima expresión de la recombinasa aumentan la eficiencia del sistema de recombinación homóloga Red λ	43

Incorporación de aminoácidos SILAC: L-Lis y H-Lis	45
Análisis por LC-HDMS ^E indica que EHEC EDL933 incorpora isótopos de Lisina	46
DISCUSIÓN	48
La baja frecuencia de recombinación en EHEC EDL933 está asociada a diversos factores	49
EHEC EDL933 adquiere el fenotipo mutagénico sin generar deleciones en su genoma	52
El sistema de recombinación homóloga red λ funciona eficientemente durante el crecimiento logarítmico de las bacterias	53
EHEC EDL933 es capaz de incorporar isótopos de lisina en su proteoma.....	55
CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS	57
REFERENCIAS	58
Tabla 1. Sistemas de secreción y efectores de EHEC O157:H7	63

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Esquema de los diferentes sistemas de secreción de bacterias Gram-negativas.....	4
Fig. 2. Secreción de la hemolisina de EHEC (EHEC-Hly) a través del T1SS. ...	7
Fig. 3 Modelo de ensamblaje y operación del T2SS.....	10
Fig. 4. Representación esquemática del ensamblaje del T3SS.....	12
Fig. 5. Representación esquemática de las cinco subcategorías de proteínas autotransportadoras.	16
Fig. 6. Modelo de ensamblaje y operación del T6SS.....	19
Fig. 7. Marcaje con isótopos de lisina.	23
Fig. 8 Transformación de EHEC EDL933 con el plásmido pKD46.	33
Fig. 9 Transformación de EHEC EDL933 (<i>rec+</i>) con el gen de resistencia a kanamicina flanqueado por secuencias de <i>escN</i>	34
Fig. 10 Transformación de la cepa certificada EHEC EDL933 con el plásmido pKD46.....	35
Fig. 11. Construcción de la cepa mutante en el gen <i>hlyD</i>	36
Fig. 12 Construcción de las cepas mutantes en los genes <i>clpV</i> y <i>etpC</i>	38
Fig. 13 Construcción de la cepa EHEC EDL933 mutante en el gen <i>virK</i>	39
Fig. 14 PCR para probar el diseño de oligonucleótidos.	41
Fig. 15 EHEC EDL933 incorpora el gen de resistencia a kanamicina y no elimina genes.....	42
Fig. 16 EHEC EDL933 incorpora el gen de resistencia a kanamicina.....	43
Fig. 17 EHEC EDL933 mutante en el gen <i>clpV</i>	44
Fig. 18 Isótopos de lisina no afectan la expresión de proteínas en EHEC EDL933.	46
Fig. 19 EHEC EDL933 incorpora de forma eficiente isótopos de Lisina a su proteoma.....	47

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μF	Microfaradio
μg	Microgramo
μl	Microlitro
A/E	Adhesión y eliminación de las microvellosidades
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
Arp 2/3	Proteína relacionada con actina 2/3
AT	Autotransportador
ATP	Adenosintrifosfato
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
Bam	Maquinaria ensambladora de β barriles
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCl ₂	Cloruro de calcio
C-terminal	Carboxilo terminal
Da	Dalton
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
DDT	Ditiotreitol
DMEM	Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
DO	Densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
Eha	Proteína autotransportadora enterohemorrágica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
Esp	Proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo III
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica

<i>g</i>	Gravedades
Gb3	Globotriaosilceramida
Gsp	Proteínas de la vía de secreción general
H	Horas
HRP	Peroxidasa de rábano
HUS	Síndrome urémico hemolítico
IgA	Inmunoglobulina A
IM	Membrana interna
IMC	Componente de membrana interna
LB	Luria Bertani
LEE	Locus de eliminación del enterocito
M	Molar
Map	Proteína asociada a mitocondria
MFP	Proteína de fusión de membrana
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
N-terminal	Amino terminal
N-WASP	Proteína del síndrome de Wiscott-Aldrich neuronal
OM	Membrana externa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PBS-T	PBS con Tween20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pet	Toxina codificada en el plásmido
pH	Potencial de hidrógeno
PVDF	Membrana de difluorido polivinilido P-inmobilon

rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
Sec	Sistema general de secreción en bacterias
SOC	Caldo superóptimo con represión por catabolito
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de la toxina de Shiga
Stx	Toxina de Shiga
T1SS	Sistema de secreción tipo I
T2SS	Sistema de secreción tipo II
T3SS	Sistema de secreción tipo III
T4SS	Sistema de secreción tipo IV
T5SS	Sistema de secreción tipo V
T6SS	Sistema de secreción tipo VI
TAA	Adhesinas autotransportadoras triméricas
Tat	Sistema de translocación de argininas gemelas
Tir	Receptor translocado para intimina
V	Voltios
Ω	Ohmio

RESUMEN

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) produce diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (HUS). Dentro de los factores de virulencia más relevantes de esta bacteria se encuentra la toxina de Shiga y el sistema de secreción tipo III (T3SS). Interesantemente, EHEC EDL933 también posee otros sistemas de secreción asociados a factores de virulencia (T1SS, T2SS, T5SS y T6SS), sin embargo, se desconoce si esta bacteria usa (y como usaría) todos estos sistemas de secreción durante la infección en células epiteliales. El objetivo de este trabajo fue generar herramientas que permitan estudiar la dinámica de expresión de los sistemas de secreción de EHEC EDL933 durante la infección de células epiteliales. Para lo cual, decidimos mutar los diferentes sistemas de secreción de esta bacteria empleando el sistema de recombinación homóloga del bacteriófago Red λ , para inactivar genes estructurales de cada sistema de secreción de EHEC EDL933. De esta manera tendríamos mutante y silvestre de cada sistema de secreción, que nos permitiría comparar proteomas mediante la técnica de marcaje metabólico, SILAC. El marcaje permitirá detectar el proteoma bacteriano que esta interactuando con las células eucarióticas durante la infección con EHEC EDL933. En este trabajo, mostramos que EHEC EDL933 es transformada eficientemente con las proteínas de recombinación del sistema Red λ . EHEC EDL933 adquiere resistencia a kanamicina, pero no elimina genes estructurales de cada uno de sus sistemas de secreción. Por lo que para eliminar estos genes se requirió: (i) usar bacterias EHEC EDL933 en fase logarítmica, (ii) incrementar la inducción de la expresión de la recombinasa y (iii) incrementar el tiempo de recuperación (3 h) después de la electroporación. Además, demostramos que EHEC EDL933 incorpora isótopos de lisina (especies ligeras y pesadas) a su proteoma. El marcaje metabólico con isótopos de lisina: (i) no induce cambios en la expresión de proteínas, (ii) genera una diferencia de masa de 6 Da en las proteínas de EHEC EDL933 y (iii) permiten identificar y cuantificar proteínas de EHEC EDL933 mediante análisis por LC-HDMS^E. En conclusión, nuestros datos demuestran que la técnica SILAC es apropiada para estudiar los sistemas de secreción de EHEC EDL933 en conjunto con eliminación de genes por recombinación homóloga del fago Red λ .

SUMMARY

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) causes diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome (HUS). Among the most important virulence factors of this bacteria are the Shiga toxin and the type III secretion system (T3SS). Interestingly, EHEC EDL933 has other secretion systems associates to virulence factors (T1SS, T2SS, T5SS and T6SS), however, remains unknown if these bacteria use (and how could use) all these secretion systems during infection in epithelial cells. The goal of this work was to generate tools that allows to study the expression dynamics of secretion systems from EHEC EDL933 during infection in epithelial cells. Therefore, we decided to generate mutants of the different secretion systems in these bacteria using homolog recombination from Red λ bacteriophage, in order to inactivate structural genes of each secretion systems from EHEC EDL933. Thereby, we would have mutant and wild type strains of each secretion system that would allow us to compare proteomes through a metabolic labeling method, SILAC. This label will allow identify the bacterial proteome that interacts with eukaryotic cells during the infection by EHEC EDL933. Here we show that EHEC EDL933 is efficiently transformed with the recombination proteins from Red λ system. EHEC EDL933 acquire kanamycin resistance, but it did not delete any of the structural genes for the secretion systems tested. Thereby, for deleting these genes is necessary: (i) use bacteria in logarithmic phase (ii) increases the induction of the recombinase expression and (iii) increases the recovery time (3 h) after the bacterial electroporation. Furthermore, we showed that EHEC EDL933 incorporates lysine isotopes (heavy and light species) to its proteome. The metabolic label with lysine isotopes: (i) did not induce changes in protein expression, (ii) generated a mass difference of 6 Da between the heavy and light peptides from EHEC EDL933 proteins and (iii) allowed to identify and quantify EHEC EDL933 proteins by LC-HDMS^E analysis. In conclusion, our data show that SILAC is appropriate for study the secretion systems in EHEC EDL933 together with gene deletion by homolog recombination using Red λ bacteriophage.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas son causa importante de mortalidad en todo el mundo, afectando principalmente a niños menores de 5 años. Muchos agentes etiológicos son los responsables de estas enfermedades diarreicas, sin embargo, *E. coli* patogénica es uno de los principales contribuidores (Croxen et al., 2013).

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo, oxidasa-negativo y anaerobio facultativo que preferencialmente crece a 37°C, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Croxen et al., 2013). Esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal de humanos pocas horas después de su nacimiento, en donde puede coexistir por décadas en una relación de mutualismo. Por otra parte, este comensal rara vez causa enfermedad, excepto en hospederos inmunocomprometidos o en aquellos en donde las barreras intestinales están dañadas. Sin embargo, existen cepas de *E. coli* que han adquirido atributos de virulencia específicos, lo cual les confiere habilidad para adaptarse a nuevos nichos y causar enfermedades. Las combinaciones más exitosas de factores de virulencia han dado origen a patotipos específicos de *E. coli*, los cuales son capaces de producir enfermedades en individuos sanos. Los síndromes clínicos que resultan de las infecciones producidas por los patotipos de *E. coli*, abarcan el tracto gastrointestinal, el trato urinario y el sistema nervioso (Kaper et al., 2004).

Entre los patotipos intestinales de *E. coli*, existen seis categorías bien descritas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Kaper et al., 2004).

Patogénesis de EHEC

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC, por sus siglas en inglés) forma parte de un grupo de *Escherichia coli* productoras de la toxina Shiga (STEC, por sus siglas en inglés), originalmente descrita por su asociación con la colitis hemorrágica, misma que es clínicamente distinta de la shigellosis (Croxen et al., 2013).

Las infecciones producidas por el serotipo EHEC O157:H7 causan calambres abdominales, diarrea sanguinolenta y complicaciones severas como el síndrome urémico hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés). En humanos, EHEC coloniza el intestino grueso y la toxina de Shiga liberada se une a las células endoteliales que expresan Gb3 (globotriaosilceramida), permitiendo su absorción dentro del torrente sanguíneo y su diseminación hacia otros órganos. Los tejidos y las células que expresan Gb3 varían entre los hospederos, por ejemplo, el endotelio glomerular renal en humanos expresa altos niveles de Gb3, y la producción de la toxina de Shiga resulta en fallo renal, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, todas son características típicas de HUS. Por otro lado, el uso de antibióticos exagera la citotoxicidad mediada por la toxina de Shiga, debido a que estos potencian la replicación y expresión de los genes *stx*, codificados por un profago lambda integrado en el cromosoma de EHEC. Además, la expresión de la toxina de Shiga promueve la lisis de EHEC mediada por los fagos, permitiendo la liberación y diseminación de la toxina, por lo cual los pacientes tratados con antibióticos tienen alto riesgo de desarrollar HUS (Sperandio & Nguyen, 2012).

Por otra parte, *Escherichia coli* enterohemorrágica, pertenece a un grupo de patógenos extracelulares que colonizan el epitelio intestinal a través de lesiones de adherencia y eliminación (A/E). La histopatología de las lesiones A/E se caracteriza por la eliminación de las microvellosidades del borde en cepillo, íntima adherencia de la bacteria a la membrana plasmática apical del enterocito y la acumulación de filamentos de actina polimerizada debajo del sitio de adherencia de la bacteria. Los patógenos A/E poseen una isla de patogenicidad, el *locus* de eliminación del enterocito (LEE, por sus siglas en inglés) que codifica genes reguladores, una adhesina llamada intimina, el sistema de secreción tipo 3 (T3SS, por sus siglas en inglés), chaperonas, y muchas proteínas efectoras, incluido el receptor de intimina translocado, llamado Tir (Navarro-García et al., 2013). Todos estos componentes, principalmente el T3SS son muy importantes para EHEC, pues gracias a estos la bacteria puede desarrollar las lesiones A/E y establecer la infección.

No obstante, además del T3SS, distintos estudios han reportado la existencia de otros sistemas de secreción en el serotipo EHEC O157:H7, particularmente en la cepa EDL933 aislada en el brote de 1982 en Michigan, EUA., los cuales se describen a continuación. Además, en la Tabla 1 se describen los efectores para cada uno de estos sistemas de secreción descritos en EHEC.

Sistemas de secreción

Para modificar y controlar el ambiente local, las bacterias a menudo secretan proteínas y efectores hacia el medio extracelular circundante o directamente al citoplasma de las células usando nanomáquinas complejas llamadas sistemas de secreción (Sana et al., 2017). Por esta razón, los sistemas de secreción son muy importantes para el crecimiento, sobrevivencia y patogénesis bacteriana.

Algunos sistemas de secreción se han encontrado en casi todas las bacterias, los cuales secretan una amplia variedad de sustratos, mientras otros han sido identificados en un reducido grupo de especies bacterianas o dedicados a la secreción de solamente una o pocas proteínas. Las funciones que desempeñan los sistemas de secreción son muy diversas, puesto que algunos son empleados para manipular la célula huésped y establecer un nicho replicativo. En otros casos, son requeridos para que una bacteria tome ventajas en un nicho o ambiente determinando, probablemente a través de la secreción de proteínas que permitan la competencia con microorganismos cercanos (Green & Mecsas, 2016).

Por otra parte, existen diferentes clases de sistemas de secreción bacterianos, y su diseño puede diferir con base en si las proteínas cruzan una sola membrana fosfolipídica, dos membranas, o inclusive tres membranas, donde dos son bacterianas y una pertenece a la célula huésped (Green & Mecsas, 2016). En bacterias Gram negativas, estos complejos moleculares pueden ser divididos en dos categorías: aquellos que abarcan la membrana bacteriana interna y externa, y los que abarcan solamente la membrana bacteriana externa. Cinco sistemas de secreción abarcan la doble membrana bacteriana y son clasificados como sistema de secreción tipo I (T1SS), T2SS, T3SS, T4SS y T6SS. Dentro de los sistemas de

secreción que solamente abarcan la membrana bacteriana externa se incluye el T5SS (Fig. 1) (Guerrero-Mandujano et al., 2017).

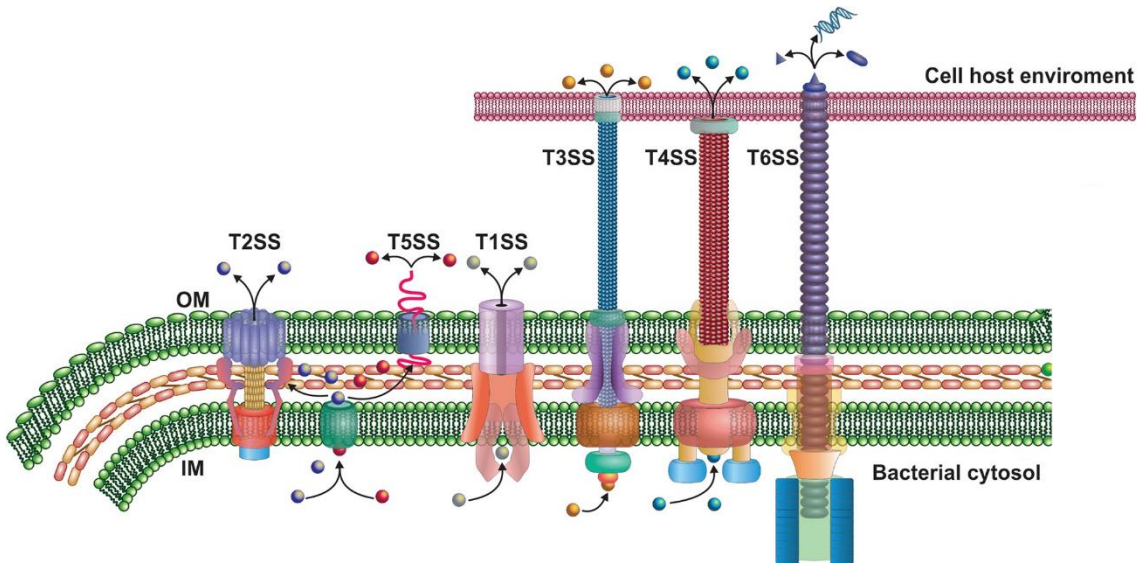


Fig. 1. Esquema de los diferentes sistemas de secreción de bacterias Gram-negativas.

Los sistemas de secreción tipo 1 (T1SS), tipo 2 (T2SS), tipo 3 (T3SS), tipo 4 (T4SS) y tipo 6 (T6SS) abarcan la doble membrana fosfolipídica de la bacteria. Únicamente T3SS, T4SS y T6SS inyectan proteínas efectoras hacia el citoplasma de la célula huésped, gracias al diseño de su estructura, el mecanismo para la translocación de proteínas comprende un solo paso. El sistema de secreción tipo 5 (T5SS), se sitúa en la membrana fosfolipídica externa de la bacteria, por lo que sus efectores en primer lugar tienen que alcanzar el espacio periplásmico para ser exportados hacia el espacio extracelular. El mecanismo para la translocación de proteínas mediante los sistemas T2SS y T5SS, comprende dos pasos, en donde las proteínas son translocadas desde el citoplasma bacteriano hacia el periplasma mediante el translocon SecYEG, una vez que las proteínas alcanzan el periplasma estas son expuestas hacia el espacio extracelular [Modificado de (Guerrero-Mandujano et al., 2017)].

Los sistemas de secreción son muy divergentes, y dependiendo de su diseño las proteínas efectoras tienen tres posibles destinos: pueden permanecer asociadas

con la membrana bacteriana externa, pueden ser liberados al espacio extracelular o ser inyectados en la célula huésped (ya sea una célula eucariota o una célula bacteriana). Además, la secreción de proteínas a través de la cubierta bacteriana envuelve mecanismos de secreción ya sea de uno o dos pasos (Costa et al., 2015).

Los sistemas que abarcan la doble membrana bacteriana y usan el mecanismo de un solo paso son el T1SS, T3SS, T4SS y T6SS, en donde los sustratos son transportados directamente del citoplasma bacteriano hacia el espacio extracelular o hacia el interior de la célula blanco. El sistema de secreción que abarca solo la membrana bacteriana externa (T5SS), y el T2SS que conecta ambas membranas, utilizan el mecanismo de dos pasos, por lo tanto, los sustratos son translocados hacia el espacio periplásmico por transportadores que abarcan la membrana bacteriana interna (como el translocon SecYEG) y subsecuentemente son transferidos a la membrana bacteriana externa o secretados hacia el espacio extracelular (Costa et al., 2015). A continuación, se describen los componentes estructurales esenciales para cada uno de los sistemas de secreción descritos en EHEC EDL933.

Sistema de secreción tipo I (T1SS)

El T1SS bacteriano, forma un canal tripartita que abarca la doble membrana bacteriana, con un componente de membrana interna (IMC, por sus siglas en inglés), una proteína adaptadora periplásmica, referida como proteína de fusión de membrana (MFP, por sus siglas en inglés) y TolC, proteína que forma el canal de membrana externa (Costa et al., 2015).

En el T1SS, el IMC pertenece a la familia de transportadores con *cassette* de unión a ATP (ABC transportadores). Los componentes de membrana interna (IMC) del T1SS, funcionan como dímeros y reconocen motivos ricos en glicina (Gly-Gly-X-Gly-X-Asp) que usualmente están presentes como repetidos en el dominio carboxilo terminal (C-terminal) de los sustratos. El sistema esta energizado por la hidrólisis de ATP, lo cual es mediado por el dominio carboxilo terminal del IMC (Costa et al., 2015).

Las proteínas de fusión de membrana (MFP), pertenecen a la familia de proteínas que exhiben similitud de secuencia con proteínas de fusión viral. La proteína MFP, participa en el reconocimiento del sustrato y también esta preasociada con el transportador ABC o es reclutada seguido de la unión al sustrato (Costa et al., 2015).

ToIC, es un trímero que forma un canal β -barril en la membrana externa y un barril periplásmico α -helicoidal que se asocia con la MFP. Las estructuras cristalinas de ToIC, han demostrado que la apertura del canal ocurre en el extremo periplásmico del β -barril y esto es desencadenado por un movimiento giratorio de las α -hélices. Los sustratos translocados por este sistema se unen al IMC y se transfieren desde el citoplasma, a través del IMC hasta la cavidad periplásmica de la MFP, utilizando la energía generada a partir de hidrólisis del ATP. La unión del sustrato asegura la asociación del complejo IMC-MFP con ToIC en la membrana externa. Esto desencadena la apertura de ToIC y la subsecuente liberación del sustrato hacia el espacio extracelular (Costa et al., 2015).

Mediante este sistema, se secretan una variedad de proteínas con diversas funciones. EHEC EDL933, posee una citotoxina formadora de poros, designada como hemolisina de EHEC (EHEC-HlyA) o toxina de EHEC (Ehx; codificada por *ehxA*) (Bielaszewska et al., 2014). La citolisina EHEC-HlyA, pertenece a la familia RTX (toxinas con repeticiones ricas en glicina y aspartato ubicadas en el extremo C-terminal, que facilitan la exportación mediante el T1SS). La secreción de esta toxina es el prototipo del T1SS descrito en *Escherichia coli* (Fig. 2). La activación y la maquinaria de secreción de esta citolisina esta codificada por el operón EHEC-*hlyCABD*, en el cual EHEC-*hlyA* es el gen estructural de la toxina. El producto de EHEC-*hlyC* media la activación postraducciona de EHEC-HlyA. Pro-HlyA, se activa en el citoplasma de la célula bacteriana a la forma hemolíticamente activa por HlyC, que es una aciltransferasa de ácidos grasos. La acilación solo es necesaria para la actividad hemolítica de EHEC-HlyA, puesto que su secreción es independiente de HlyC. EHEC-*hlyB* y EHEC-*hlyD* codifican proteínas de transporte para trasladar a EHEC-HlyA fuera de la bacteria (Bielaszewska et al., 2013; Gentshev et al., 2002).

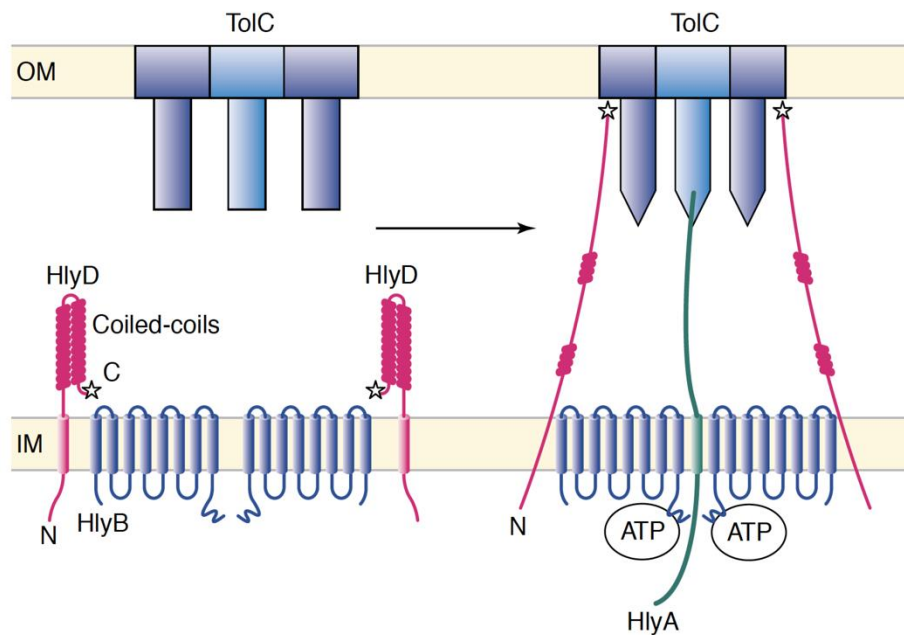


Fig. 2. Secreción de la hemolisina de EHEC (EHEC-Hly) a través del T1SS.

HlyB (Componente de membrana interna, IMC), se inserta en la membrana interna mediante ocho dominios hidrofóbicos transmembranales α -helicoidales. HlyD (Proteína de fusión de membrana, MFP), se inserta en la membrana interna mediante un solo paso transmembranal y posee un dominio periplásmico largo (C-terminal) de 100 aminoácidos. TolC, es una proteína de membrana externa, forma parte de diferentes sistemas de transporte. HlyA interactúa en la región citoplásmica del complejo HlyB-D preformado, a través de su secuencia señal (C-terminal 50-60 aminoácidos), esto induce la interacción de HlyD con TolC. La interacción HlyD-TolC permite la formación del canal a través del cual HlyA se secreta y la hidrólisis de ATP por HlyB, completa la secreción de la toxina al medio extracelular (Gentschev et al., 2002).

Sistema de secreción tipo 2 (T2SS)

Muchas bacterias Gram negativas usan el T2SS para translocar proteínas plegadas del periplasma a través de la membrana externa y hacia el medio extracelular. Este sistema es importante para especies patógenas y no patógenas por igual. Durante su biogénesis, participan entre 40-70 proteínas de 12-15 tipos diferentes para formar la maquinaria final. El T2SS está formado por cuatro subcomplejos: plataforma de membrana interna, una ATPasa de secreción, pseudopili y complejo de membrana externa (Korotkov et al., 2012). Las proteínas que forman el T2SS se denominan

proteínas de la vía de secreción general (Gsp, por sus siglas en inglés) (Costa et al., 2015).

La plataforma de membrana interna está formada por proteínas GspC, GspL, GspM y GspF. Las proteínas GspC, son proteínas bitópicas de membrana interna organizadas en muchos dominios. Incluyen una región citoplasmática N-terminal, un dominio transmembrana, un dominio periplásmico central altamente conservado y un dominio C-terminal que contiene estructuras secundarias específicas denominadas dominios *coiled-coil* o dominios PDZ (*postsynaptic density, disc-large, ZO-1*). GspL es una proteína bitópica de membrana interna organizada en tres dominios, el dominio C-terminal localizado en el compartimento citoplasmático, un dominio transmembrana y un dominio periplásmico. El dominio citoplasmático está compuesto de subdominios I, II y III que interactúan con el dominio C-terminal de GspE. GspM, es una proteína bitópica con un dominio citoplasmático corto, un dominio transmembrana y un dominio periplásmico. GspM es requerida para la formación de un complejo estable con GspL. GspF es una proteína integral de membrana con un pequeño *loop* periplásmico y dos dominios citoplasmáticos grandes conectados a través de tres dominios transmembrana que permiten la interacción con otras proteínas del T2SS (Douzi et al., 2012).

La ATPasa citoplasmática del T2SS, GspE, pertenece a la familia ATPasa de secreción tipo II/IV (Korotkov et al., 2012). GspE es una proteína que contiene zinc, a diferencia de otros miembros de esta familia. Aunque GspE no contiene dominios hidrofóbicos puede localizarse en la membrana bacteriana interna a través de la interacción con la proteína GspL (Douzi et al., 2012).

Seis de doce genes *gsp* conservados están dedicados a la formación del pseudopilus. Cinco de esos genes codifican las pseudopilinas GspG, GspH, GspI y GspK, las cuales son los elementos constitutivos del pseudopilus, mientras que *gspO* codifica la prepilina peptidasa, involucrada en la maduración de las pseudopilinas. Las pseudopilinas maduras se caracterizan por contener un dominio hidrofóbico N-terminal altamente conservado de aproximadamente 20 residuos; seguido de un dominio C-terminal específico cada una. Las pseudopilinas son

proteínas de membrana interna bitópicas con un solo dominio transmembrana N-terminal y un dominio periplásmico globular C-terminal. Las pseudopilinas usan la vía SecYEG para su identificación e inserción en la membrana (Douzi et al., 2012; Korotkov et al., 2012).

El complejo de membrana externa está formado por la proteína de membrana externa GspD (secretina). Las secretinas poseen una secuencia señal en su dominio N-terminal que hace posible su transporte del citoplasma hacia el periplasma a través de la vía SecYEG. En algunos casos las secretinas dependen de pequeñas lipoproteínas GspS (pilotina) para insertarse en la membrana externa o a veces la secretina misma es una lipoproteína y por lo tanto no depende de una pilotina para su correcta inserción en la membrana externa (Korotkov et al., 2012). Los monómeros de secretina son proteínas bipartita y su homología entre miembros de la familia secretina reside en la mitad del dominio C-terminal importante para su oligomerización; mientras que el dominio N-terminal está conservado solo entre grupos de secretinas relacionadas al mismo sistema de secreción. El dominio N-terminal comprende cuatro dominios estructurales independientes N0-N3 (Douzi et al., 2012).

Los sustratos del T2SS son transportados al periplasma como polipéptidos no plegados por el translocón SecYEG o como proteínas plegadas por el transportador Tat. Se ha sugerido que el T2SS usa la hidrólisis del ATP para ensamblar el pseudopilus periplásmico y empujar los sustratos a través del canal de la OM. Como GspL interactúa con ambas GspE (la ATPasa del T2SS) y GspG (el mayor componente del pseudopilus), se ha sugerido que GspL debe acoplar la función ATPasa con el ensamblaje y desensamblaje del pseudopilus. La interacción del pseudopilus con GspC y GspD facilita la inserción del sustrato dentro del canal de secretina, y el sustrato es entonces empujado a través del canal de secretina por extensión del pseudopilus en forma de pistón (Fig. 3) (Costa et al., 2015).

EHEC, posee gran variedad de proteínas efectoras que le permiten generar daño en la célula epitelial. La metaloproteasa de zinc, StcE es secretada por EHEC a través del T2SS, codificado en el plásmido de virulencia pO157. StcE, media la

íntima adherencia de EHEC sobre las células hospederas. Además, escinde el inhibidor C1 esterasa (C1-INH), un regulador de múltiples vías inflamatorias que se localiza en la superficie de las células huésped, protegiéndolas de la lisis mediada por el complemento. Por otra parte, esta metaloproteasa escinde la mucina 7 (MUC7) y la glicoproteína 340 (gp340) al actuar como mucinasa permite el paso de EHEC a través de la cavidad oral, reduciendo la viscosidad de la saliva humana (Grys et al., 2006)

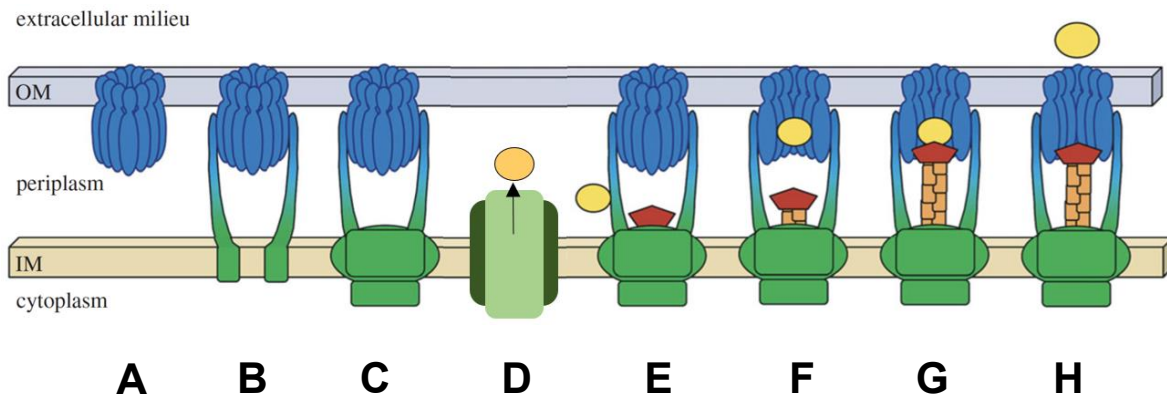


Fig. 3. Modelo de ensamblaje y operación del T2SS.

(A) La primera parte que se ensambla es la secretina. (B-C) El siguiente paso es el reclutamiento sucesivo de las proteínas de membrana interna y de la ATPasa citoplásmica. (D) Transporte del sustrato al espacio periplásmico a través del translocón SecYEG. (E) El sustrato es reconocido por el T2SS, mediante el dominio periplásmico de la proteína GspC (azul). (F) El sustrato es transferido hacia el vestíbulo de secretina, en donde también hace contacto con el extremo del pseudopili que emerge de la superficie de la membrana interna (G). (H) La proteína es liberada al medio extracelular a través del poro de secretina [Modificado de (Douzi et al., 2012)].

La adherencia a la célula epitelial es un paso importante para establecer la colonización intestinal, el T2SS es sustancial para que EHEC pueda adherirse a las células epiteliales, puesto que mediante este sistema se secreta la proteína YodA (también llamada ZinT). YodA, es una proteína de unión a metal, que juega un papel importante para que EHEC pueda adherirse a las células HeLa (Ho et al., 2008).

Sistema de secreción tipo 3 (T3SS)

El T3SS es una nanomáquina embebida en la doble membrana de bacterias Gram negativas patógenas. Es una vía de exportación de proteínas que se forma por un complejo ensamble de más de 20 componentes. En su núcleo se encuentra el inyector y una red de chaperonas especializadas que dirigen las proteínas efectoras a la antesala del inyector. El T3SS crea un canal contiguo a través de la bacteria y la membrana de una célula hospedera. La entrega de proteínas efectoras vía T3SS, permite a la bacteria manipular la interacción bacteria-célula huésped, a su favor al dirigirse a una amplia variedad de procesos celulares que incluyen el citoesqueleto, la fagocitosis, la apoptosis y la respuesta inflamatoria (Navarro-Garcia et al., 2016).

El ensamblaje del T3SS competente para la secreción e inyección de proteínas, implica tres pasos principales: (1) formación del cuerpo basal, incluye anillos de membrana interna y externa; (2) ensamblaje de la estructura tipo aguja; y (3) secreción y localización de proteínas que forman el translocón sobre la membrana de la célula blanco (Izore et al., 2011).

El cuerpo basal consiste en la formación de dos anillos proteicos de diferente diámetro, posicionados en la membrana interna y externa de la bacteria. Este proceso requiere de la maquinaria SecYEG, sistema esencial bacteriano para transportar proteínas hacia la membrana (Fig. 4 A-C). Subsecuente al ensamblaje del cuerpo basal, esta estructura debe hacerse competente para la secreción. Durante esta fase, el inyector es completado con una conexión interna de los anillos del cuerpo basal, elongación de la aguja y la formación del poro translocador; esta fase es T3SS dependiente (Fig.4 D-E) (Portaliou et al., 2016).

El cuerpo basal forma una plataforma para formar la aguja y extenderse al medio extracelular. La aguja, se forma a partir de una sola proteína que se sintetiza en el citoplasma y polimeriza solamente después de su secreción en la superficie. En la parte superior de la aguja, se forma un pentámero denominado punta. Subsecuentemente, las proteínas que formarán el poro translocador son

secretadas; estas proteínas son principalmente hidrofílicas y se insertan en la membrana plasmática de la célula diana, después de lo cual oligomerizan para formar el poro translocador. El poro translocador es un heteropentámero con un poro interno de 10 nm de ancho a través del cual los efectores son inyectados dentro del citoplasma (Fig. 4F) (Portaliou et al., 2016).

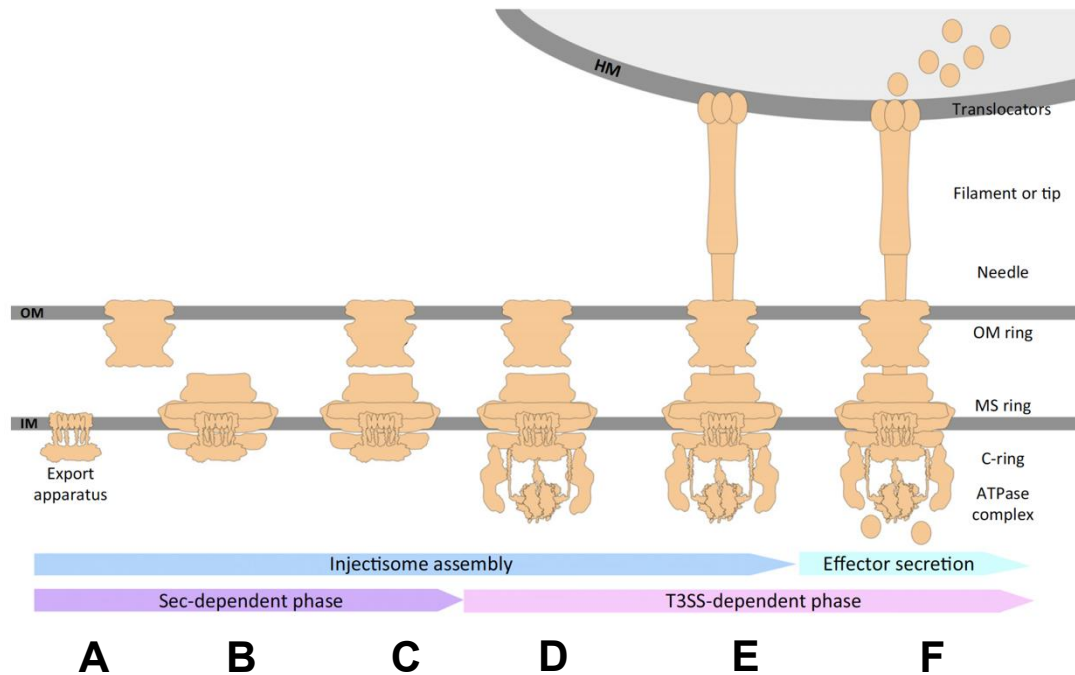


Fig. 4. Representación esquemática del ensamblaje del T3SS.

El aparato de exportación se sitúa en la membrana interna (A, Sec dependiente). Posteriormente, el anillo de membrana interna se forma envolviendo el aparato de exportación. Mientras, el anillo de membrana externa se forma en la membrana externa (B, Sec dependiente). Ambas estructuras se unen por medio de interacciones intermoleculares estabilizadoras (C, Sec dependiente). Durante la fase T3SS dependiente, el complejo ATPasa es transferido a la membrana e interactúa con el anillo C y el aparato de exportación (D, T3SS dependiente). El anclaje de la ATPasa y del anillo C a la membrana inicia la secreción de los sustratos iniciales (E, T3SS dependiente). Una vez que se establece contacto con la membrana hospedera mediante el poro translocador, los efectores son secretados directamente al citoplasma eucariota (F, T3SS dependiente) [Modificado de (Portaliou et al., 2016)].

Una vez que la bacteria establece contacto con la célula hospedera, la secreción de las proteínas translocadoras (que forman un poro en la membrana de la célula huésped) y las proteínas efectoras son disparadas por un mecanismo de señalización muy específico que presumiblemente involucra cambios conformacionales del filamento tipo aguja. El transporte eficiente de los sustratos no plegados del T3SS a través del filamento tipo aguja es controlado por señales de secreción precisas, las cuales a menudo están codificados dentro de los 100 primeros residuos de las proteínas y los cuales aseguran que la secreción proceda de una manera jerárquica y coordinada (Portaliou et al., 2016).

El T3SS es del sistema que más efectores se conocen, para EHEC se han reportado hasta la fecha alrededor de 33 proteínas. Las proteínas efectoras de este sistema cumplen con una variedad de funciones, dentro de las que se destacan la formación de las lesiones A/E (Tir, Intimina, EspFu). Tir, receptor de intimina, participa en la formación de pedestales y regula la actividad de Map y EspG. Intimina, adhesina de membrana externa que media la adherencia bacteriana a las células epiteliales. EspFu, activa N-WASP para estimular el complejo Arp2/3 y favorecer la polimerización de actina y la formación de pedestales (Stevens & Frankel, 2015). Este sistema de secreción es de vital importancia para EHEC, puesto que en primera instancia le permite establecer contacto con la célula hospedera. Adicional a las proteínas antes mencionadas, existe una variedad de efectores para este sistema de secreción que cumplen funciones específicas e importantes para alterar las funciones normales de la célula hospedera y con ello establecer el proceso infeccioso (Tabla 1).

Sistema de secreción tipo V (T5SS)

El T5SS, el cual es conocido como el sistema de los autotransportadores, es el único en el que el sustrato y el poro de secreción están fusionados para formar un solo polipéptido. Como resultado, un polipéptido por sí mismo puede llevar a cabo su propia secreción a través de la membrana bacteriana externa, de lo cual se deriva

el término “autotransportador” (AT). Este sistema secreta principalmente factores de virulencia, pero también participa en la adhesión célula-célula y en la formación de *biofilm*. Por otra parte, el T5SS también requiere del translocón SecYEG para transferir polipéptidos autotransportadores no plegados de la membrana bacteriana interna hacia el periplasma. Los autotransportadores están compuestos de un dominio de secreción, llamado dominio pasajero, que puede estar semiplegado o completamente plegado en el periplasma, y un dominio transmembrana, el cual también es llamado “translocador” o β -dominio. El dominio translocador se inserta dentro de la membrana externa formando una estructura de β -barril, lo cual hace posible la secreción del dominio pasajero a través del poro β -barril. En comparación con otros sistemas de transporte de membrana externa, el proceso no requiere un gradiente de ATP o gradiente de protones, la energía requerida para este sistema deriva del plegamiento del dominio pasajero en la salida del poro (Costa et al., 2015).

Actualmente se conocen cinco subtipos del T5SS, clasificados como Va al Ve. Lo que distingue a los diferentes subtipos de los sistemas de secreción tipo 5 es su organización de dominio y las variaciones resultantes en el (los) mecanismo (s) de transporte. El sistema tipo Va es el autotransportador prototipo (clásico). En el sistema tipo Va, el poro es formado por el dominio C-terminal del polipéptido, mientras que el dominio N-terminal es exportado hacia la superficie. En muchos casos, como en la proteasa IgA1, el dominio pasajero es escindido a través de un proceso autocatalítico después de que la translocación se ha completado, liberando el pasajero hacia el medio extracelular, pero dejando el dominio translocador en la membrana externa. En otros casos, los Va no son autoprosesados, de esta manera el dominio pasajero se mantiene anclado a la superficie a través del dominio de translocación. Los pasajeros no escindibles funcionan como adhesinas, mientras que los que se escinden tienen actividad enzimática (proteasa o lipasa) (Fan et al., 2016).

El sistema Vb, a primera vista parece una variante del Va: el dominio pasajero y el dominio translocador son dos cadenas proteicas separadas, pero expresadas a

partir del mismo operón. Este sistema también se denomina sistema de secreción de dos compañeros (Tps, por sus siglas en inglés), en el cual el dominio pasajero (TpsA) y el translocador (TpsB), poseen el motivo asociado al transporte de polipéptidos (POTRA, por sus siglas en inglés). TpsB, posee un extremo periplásmico formado por dos dominios POTRA sucesivos, importantes para el reconocimiento del dominio pasajero TpsA y un extremo C-terminal que está embebido en la OM para formar el poro a través del cual TpsA será translocado (Navarro-García et al., 2016).

El sistema Vc, denominado adhesinas autotransportadoras triméricas (TAA, por sus siglas en inglés), caracterizadas por la presencia de tres dominios pasajeros fusionados al dominio C-terminal, permitiendo la secreción de polipéptidos triméricos. TAAs son producidos como un solo polipéptido, pero ellos divergen de los ATs clásicos en el tamaño del dominio translocador β -barril. Los β -barriles de los ATs clásicos comprenden 12 cadenas β , mientras los TAAs tienen solamente 4 cadenas β (70-100 aminoácidos). Para volverse funcionales, los dominios de translocación se ensamblan en homotriméros de 12 cadenas β en la OM, lo cual transmite estabilidad al β barril y funcionalidad al dominio pasajero (Navarro-García et al., 2016).

Sistema Vd, los autotransportadores de esta subcategoría parecen una fusión entre los ATs Va monoméricos y los ATs Vb. Su estructura es muy similar al sistema Va, con un dominio de translocación C-terminal y un dominio pasajero N-terminal. En contraste a los ATs clásicos, estos dominios están conectados a través de un dominio periplásmico adicional, homólogo a los dominios periplásmicos tipo Vb (Navarro-García et al., 2016).

Los autotransportadores inversos, forman parte del subtipo Ve. Su nombre está basado en el hecho de que el orden de sus dominios está invertido. El extremo C-terminal comprende el dominio pasajero, mientras que el N-terminal forma parte del poro translocador. El dominio pasajero es típicamente un dominio tipo Ig o lectina, que no es encontrado en otros subtipos del T5SS. Sin embargo, este tipo

de dominio es común en adhesinas de bacterias Gram-positivas y en otras superficies celulares y proteínas periplásmicas (Navarro-Garcia et al., 2016).

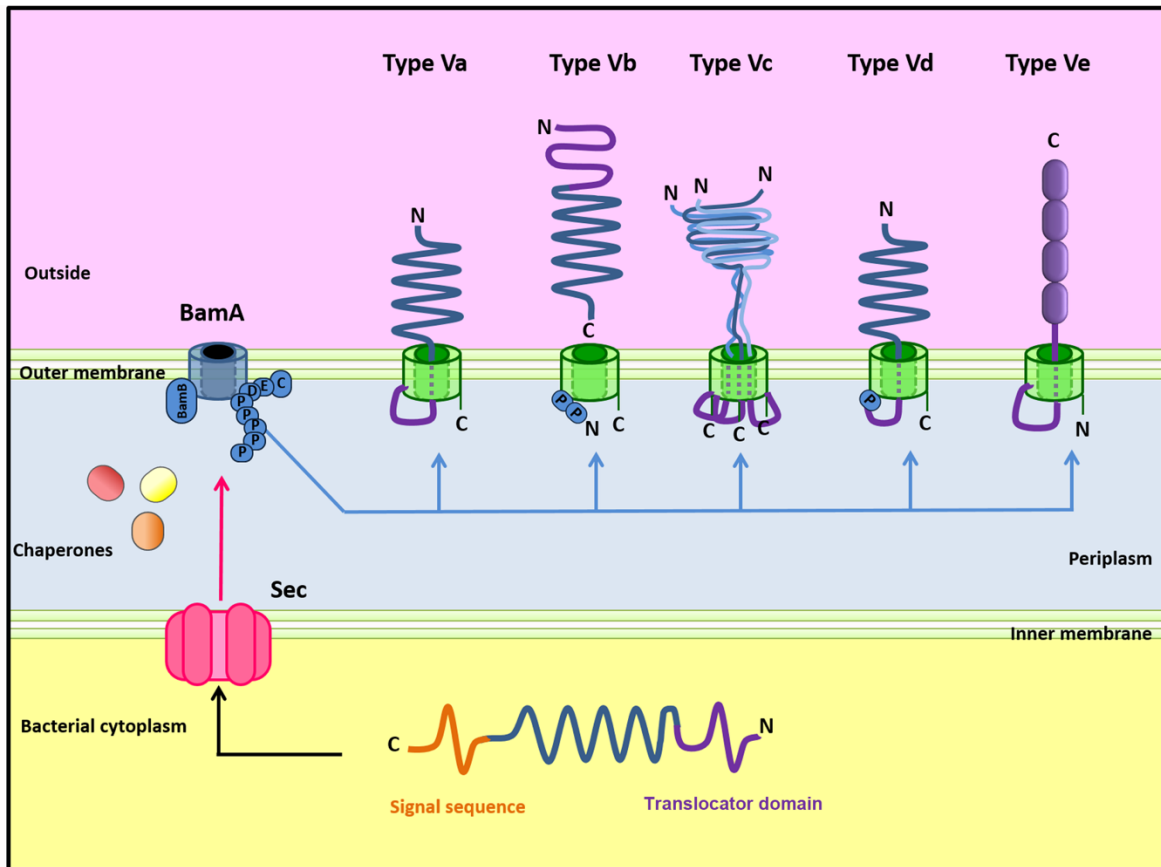


Fig. 5. Representación esquemática de las cinco subcategorías de proteínas autotransportadoras.

Los autotransportadores del T5SS son proteínas que poseen un dominio translocador orientado en el extremo C-terminal de la proteína y una secuencia señal orientada en el dominio N-terminal que permite sean transferidos al periplasma mediante el translocón SecYEG, en el espacio periplásmico muchas chaperonas estabilizan su estructura no plegada. En el periplasma, el dominio translocador es insertado en la OM con ayuda del complejo BamA, el cual se pliega en estructuras β-barril. El dominio pasajero pasa a través del poro creado por el dominio translocador y adopta una estructura β-helicoidal. La estructura y topología de las proteínas autotransportadoras permite que se distingan cinco subcategorías: autotransportadores clásicos (Va), autotransportadores de dos compañeros

(Vb), adhesinas triméricas autotransportadoras (Vc), autotransportadores que son una fusión de Va y Vb (Vd) y autotransportadores inversos (Ve) (Navarro-Garcia et al., 2016)

EHEC, posee tres de las cinco subcategorías descritas para el T5SS. Mayormente contiene proteínas autotransportadoras de la subcategoría Va, las cuales están asociadas principalmente a la formación de *biofilm* y adhesión. Estas proteínas se han denominado, proteínas autotransportadoras enterohemorrágicas (Eha, por sus siglas en inglés), dentro de las cuales se encuentran: EhaA, EhaB, EhaD y EhaJ (McWilliams and Torres, 2014). No obstante, EHEC posee la proteína autotransportadora EspP, que también pertenece a la misma subcategoría, en contraste con las Eha, EspP ejerce un efecto citopático ya que contribuye en la generación de hemorragias a nivel de la mucosa intestinal al escindir el factor de coagulación V (Kuo et al., 2016) (Tabla 2).

Sistema de secreción tipo VI (T6SS)

El T6SS es una máquina que abarca la envoltura celular, capaz de translocar proteínas efectoras tóxicas tanto a células eucariotas como a procariontes, el cual también tiene un papel esencial en la patogénesis y competencia bacteriana. Este sistema está formado por 13 componentes básicos esenciales conservados y varios componentes accesorios. La nanomáquina consiste de dos complejos principales: un complejo de membrana, el cual comprende proteínas de membrana interna (IM) que son homólogos al T4SS, y un complejo tipo cola que contiene componentes evolutivamente relacionados a la cola de un bacteriófago contráctil (Costa et al., 2015).

El complejo de anclaje a la membrana típicamente está compuesto por tres subunidades (TssJ, TssL y TssM). TssJ, es una lipoproteína que se encuentra anclada a la membrana externa, expuesta hacia el periplasma. TssM, está anclada a la membrana interna mediante tres dominios transmembranales y posee un dominio periplásmico largo, incluyendo su dominio C-terminal que interactúa con TssJ. TssL, se encuentra anclada a la membrana interna mediante una hélice transmembranal.

El dominio N-terminal citoplasmático de TssL, media una interacción mutuamente estabilizadora con TssM (Cianfanelli et al., 2016).

El T6SS, forma un tubo interno compuesto por hexámeros Hcp, una proteína estructuralmente relacionada a gp19, una proteína del fago T4 que forma el tubo interno de su cola. El apilamiento de los hexámeros Hcp, requiere VgrG y, a su vez se requiere para el ensamblaje de la envoltura TssBC circundante. VgrG, es una proteína trimérica con alta similitud estructural con el complejo gp27/gp25 que forma el prisma β del pico de la cola en el bacteriófago T4. De forma análoga al fago T4, VgrG se sitúa en la parte superior del tubo Hcp. Las proteínas con repetidos PAAR, a menudo codificadas río abajo de los genes *vgrG*, se unen a un extremo del trímero VgrG, formando una estructura afilada, que es una punta canónica en la extremidad de la estructura de punción Hcp-VgrG que es expulsada de la bacteria hacia la célula blanco (Cianfanelli et al., 2016).

La vaina contráctil del T6SS, está compuesta de dos proteínas, TssB (VipA) y TssC (VipB), formando una estructura tubular con apariencia de ruedas dentadas apiladas. Esta vaina se ensambla en el citoplasma, perpendicularmente a la membrana, y existe en forma contraída hueca (vacía) o en forma extendida más delgada con densidad interna. Esa densidad interna en la forma extendida es probablemente el tubo Hcp antes de la expulsión. El subcomplejo final de la parte tipo bacteriófago del T6SS, es una estructura denominada placa base que actúa como una plataforma para el ensamblaje del tubo interno (Hcp) y la vaina contráctil (TssB y TssC) (Cianfanelli et al., 2016).

La placa base, es un complejo citoplasmático anclado a la membrana bacteriana interna. TssE, es una proteína con homología al componente de la placa base del bacteriófago, gp25, y es requerido para el ensamblaje de TssBC. TssAFGK, son componentes esenciales de la placa base. TssK es una proteína trimérica intrínsecamente citoplasmática asociada a la membrana interna que puede formar oligómeros de orden superior. Se ha reportado que las interacciones de TssK con TssL, TssC y Hcp en *E. coli*, sugiere que conecta los complejos de membrana y la cola tipo bacteriófago del T6SS (Cianfanelli et al., 2016).

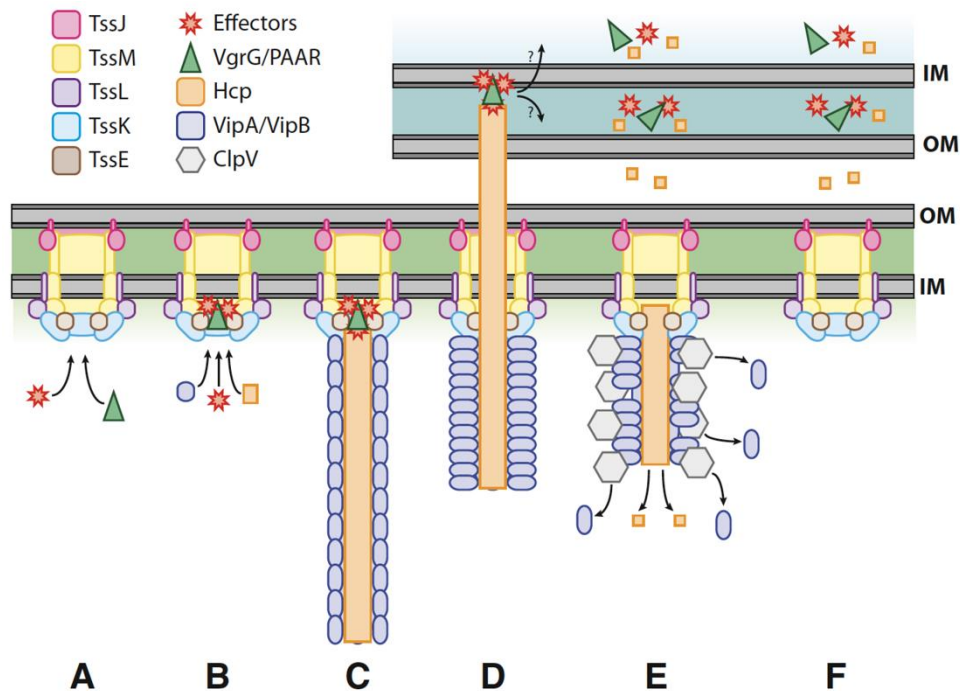


Fig. 6. Modelo de ensamblaje y operación del T6SS.

(A) Formación del complejo placa base que consiste de TssE, TssJ, TssK, TssL, TssM y otros que no se muestran en la Figura como TssA, TssF y TssG. (B) VgrG, PAAR y otras proteínas efectoras son reclutadas al complejo y ensambladas dentro de la estructura. (C) Se considera que el tubo Hcp polimeriza a partir de un nucleador, que en parte es un trímero VgrG, y entonces la vaina formada por VipA/VipB polimeriza alrededor del tubo Hcp en crecimiento. (D) Análogo al fago, un cambio conformacional en la estructura de la vaina resulta en un evento de contracción que lanza el tubo Hcp hacia afuera de la célula y a través de la membrana de la célula diana. Este evento de contracción entrega VgrG cargado con otras proteínas efectoras, a través de las capas de la envoltura celular. (E) ClpV usa ATP para remodelar la vaina contraída, restaurando el pool de subunidades disponibles para formar la vaina. (F) El complejo desnudo de la placa base está listo para ser reciclado o desmontado, dependiendo del T6SS y su estado de activación (Ho et al., 2014).

ClpV es una ATPasa AAA+ citoplasmática que induce el desacoplamiento de la vaina formada por TssBC dependiente de ATP. ClpV se une específicamente al tubo contraído, permitiendo el reciclamiento de la maquinaria T6SS. ClpV también previene la polimerización aberrante o no productiva de la vaina, en el citoplasma (Cianfanelli et al., 2016).

Recombinación homóloga

La disponibilidad de secuencias completas de genomas bacterianos ha generado abundante información acerca de la estructura y organización de una gran cantidad de genes cuya función es desconocida. Para poder estudiar las funciones de los genes, normalmente estos se mutan para evaluar el comportamiento de un microorganismo en presencia y/o ausencia de un gen específico. Aunque existen muchos métodos para llevar a cabo la inactivación de genes en bacterias, anteriormente, realizar mutaciones en el genoma de *Escherichia coli* usando fragmentos lineales de ADN no era posible, debido a que esta bacteria posee exonucleasas que lo degradan (Datsenko & Wanner, 2000).

Sin embargo, el descubrimiento del sistema de recombinación homóloga de los bacteriófagos permitió desarrollar un método en el que se usa este sistema para generar mutantes en *E. coli*, a partir de fragmentos de ADN lineal. El método de ingeniería genética usando las proteínas de recombinación del bacteriófago lambda (λ), se denomina ingeniería genética mediada por recombinación (del inglés *Recombineering*).

El sistema de recombinación del bacteriófago Red λ , está conformado por tres proteínas: Exo, Beta y Gam. La proteína Gam, inhibe la actividad nucleasa de RecBCD y SbcCD, preservando el ADN lineal y permitiendo que se use como sustrato para la recombinación. La proteína Exo, es una exonucleasa dependiente de ADN de doble cadena (dsADN). Exo requiere un extremo de dsADN para unirse y permanecer unida a una cadena de ADN mientras degrada otra en dirección 5'-3'. El resultado es dsADN con un extremo 3' sobresaliente, sustrato requerido para que la proteína Beta se una. Beta, es una proteína que se une al ADN de cadena sencilla

(ssADN) y promueve el alineamiento de cadenas de ADN complementarias (Sawitzke et al., 2007).

Basándose en este sistema, Datsenko & Wanner (2000) desarrollaron una metodología en la que se amplifica por PCR un gen de resistencia a antibióticos a partir de oligonucleótidos que contienen regiones homólogas adyacentes al gen que será inactivado. Los productos de PCR son usados para transformar a una bacteria que expresa las proteínas de recombinación Red λ , estas proteínas median la recombinación a partir de los productos de PCR que ingresan por electroporación. El resultado es una bacteria recombinante que reemplaza uno de sus genes y en su lugar inserta un gen de resistencia a antibiótico. En este trabajo, usamos este sistema para inactivar genes en EHEC EDL933.

Marcaje con isótopos estables de aminoácidos durante el cultivo celular (SILAC)

SILAC, es una estrategia de marcaje metabólico que utiliza aminoácidos marcados con isótopos estables en un medio de crecimiento celular. Al ser una estrategia basada en el metabolismo celular, asegura la incorporación de los aminoácidos marcados durante la síntesis normal de proteínas. El marcaje resulta en una diferencia de masa específica en todos los péptidos que poseen el aminoácido marcado; esta diferencia depende únicamente del isótopo, así como de la estrategia de proteólisis. Los péptidos obtenidos, se someten a análisis por espectrometría de masas para realizar una cuantificación relativa de proteínas (Chen et al., 2015).

El método consiste en la incorporación metabólica de los aminoácidos marcados con isótopos estables, como ^{13}C o ^{15}N , dentro del proteoma durante la síntesis de proteínas. En SILAC, dos poblaciones celulares son crecidas en dos medios de cultivo diferentes; el medio “ligero”, es el medio que contiene aminoácidos con el isótopo de abundancia natural, y el medio “pesado” es el que contiene el aminoácido marcado con un isótopo estable. Se requiere un número suficiente de divisiones celulares, al menos cinco ciclos en células de mamífero, para que teóricamente todas las proteínas de las células cultivadas en el medio

pesado incorporen el aminoácido pesado. Sin embargo, el número de divisiones celulares requerido para el marcaje completo depende de la síntesis de proteínas, degradación y recambio. Por lo tanto, la eficiencia de marcaje debe ser cuidadosamente determinada antes de realizar la cuantificación (Chen et al., 2015).

Debido a que la información para la cuantificación depende del aminoácido, es muy importante elegirlo dependiendo de los objetivos del experimento. El criterio más importante para elegir el aminoácido es que debe introducir una diferencia de masa de al menos 4 Da para evitar solapamiento de las señales obtenidas por espectrometría de masas. Por ejemplo, cada L-Arginina $^{13}\text{C}_6$ en la secuencia de un péptido introduce una diferencia de masa de 6 Da, entre el péptido ligero y el pesado. Además, el aminoácido debe ser esencial para la sobrevivencia de las células en cultivo. Esto asegura que el aminoácido suplementado en el cultivo sea la única fuente de su obtención para el crecimiento de la célula. De modo que, de forma ideal se emplean aminoácidos esenciales para el marcaje como leucina, lisina y metionina. Aunque arginina no es un aminoácido esencial, se ha mostrado que en muchas poblaciones celulares es esencial y puede ser usado a pesar de su conversión metabólica hacia prolina (Ong & Mann, 2006).

La elección del aminoácido está relacionada a la estrategia de proteólisis; comúnmente la tripsina es la enzima proteolítica usada en proteómica. En consideración a esto, los aminoácidos usados para el marcaje en SILAC son lisina y arginina, esto porque tripsina específicamente escinde el carboxilo terminal de los residuos lisina y arginina. De esta manera, la digestión con tripsina y el marcaje de SILAC con lisina y arginina, permite la cuantificación por espectrometría de masas de todos los péptidos trípticos de una proteína (Ong & Mann, 2006).

Considerando la conversión de arginina a prolina, el marcaje proteómico puede realizarse usando isotopos de lisina marcados con ^{13}C , los cuales generan una diferencia de masa de 6 Da. Por lo tanto, para poder identificar las diferencias de peso durante el análisis por espectrometría de masas, la digestión tiene que realizarse con una enzima que corte en los residuos lisina de las proteínas, como Lys-C (Fig. 7).

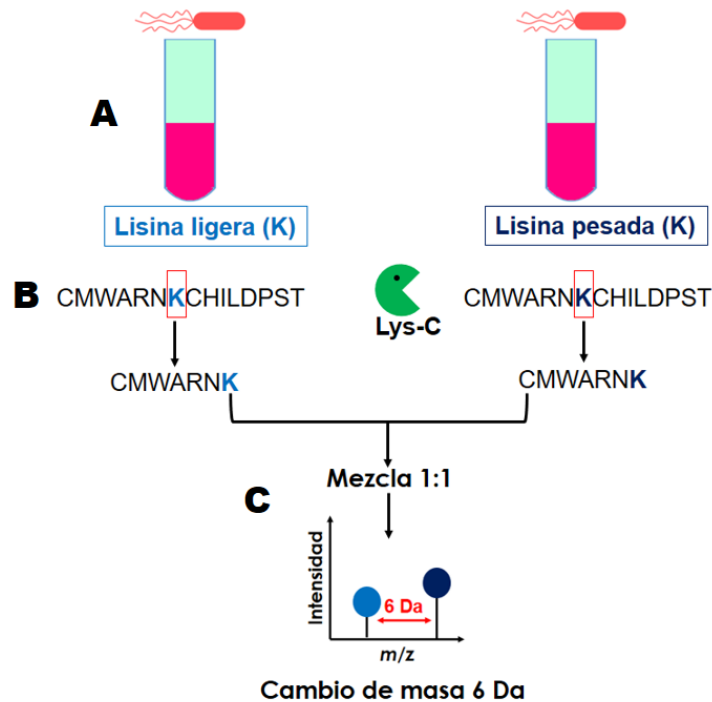


Fig. 7. Marcaje con isótopos de lisina.

(A) Crecimiento de la bacteria en medio ligero (L-Lis) y en medio pesado (H-Lis). La síntesis de proteínas favorece la incorporación de isótopos de lisina al proteoma bacteriano. (B) La digestión de proteínas con Lys-C, corta en el extremo carboxilo terminal de lisina dejando este residuo en cada péptido generado. (C) El residuo específico de lisina genera un cambio de masa de 6 Da, que puede distinguirse por espectrometría de masas [Modificado de (Ong & Mann, 2006)].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC), es un agente etiológico asociado a la producción de enfermedades diarreicas a nivel mundial. Los brotes producidos por EHEC, se asocian al consumo de alimentos derivados de animales contaminados con la misma. A partir de una baja dosis infecciosa, EHEC es capaz de producir colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (HUS). La toxina de Shiga es el

principal factor de virulencia responsable en la generación del síndrome urémico hemolítico, una secuela importante que se distingue por producir falla renal, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática tanto en niños menores de 5 años como en personas jóvenes. Además, esta bacteria produce lesiones de adherencia y eliminación (A/E) a nivel intestinal gracias a que posee el T3SS. Interesantemente, estudios aislados han reportado la existencia de otros sistemas de secreción además del T3SS, dentro de los cuales se encuentran T1SS, T2SS, T5SS y T6SS; los cuales particularmente han sido identificados en la cepa EHEC EDL933. La versatilidad de cada uno de estos sistemas de secreción hace que sus proteínas efectoras cumplan con diversas funciones y sean usadas por la bacteria en distintos escenarios celulares. Estos datos sugieren que los sistemas de secreción de EHEC EDL933 son muy importantes durante la patogénesis generada por esta bacteria y que pueden ser activados para favorecer el proceso de colonización y/o sobrevivencia de la misma. Por lo anterior se considera muy importante entender cuál es la dinámica de expresión de estos sistemas de secreción durante el proceso infeccioso, así como conocer que eventos biológicos favorecen o inhiben la expresión de los sistemas de secreción en EHEC EDL933.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar la dinámica de expresión de los diferentes sistemas de secreción de EHEC durante el curso de infecciones en células epiteliales humanas.

Objetivos específicos:

1. Detectar la expresión de los sistemas de secreción de EHEC silvestre usando diferentes medios de cultivo
2. Comparar el secretoma de cepas EHEC nativa y mutantes en los diferentes sistemas de secreción
3. Caracterizar el patrón de expresión de los sistemas de secreción y el interactoma de EHEC al infectar células epiteliales

Objetivos alcanzables durante la maestría:

1. Realizar mutaciones de los sistemas de secreción tipo I, II, III, V y VI
2. Estandarizar condiciones de cultivo que permitan la incorporación de isótopos de Lisina durante el cultivo de EHEC y las cepas EHEC mutantes
3. Definir medios de cultivo bacterianos que amplifiquen la expresión de cada uno de los sistemas de secreción

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

En este estudio se usó la cepa EHEC EDL933. La cepa fue crecida rutinariamente en medio Luria Bertani (LB). En los casos en que se requirió antibiótico se usaron las siguientes concentraciones finales: ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml).

Mutagénesis de los sistemas de secreción

Para generar la delección de los siguientes genes: *hlyD*, *etpC*, *escN*, *espP*, *virK* y *clpV* a partir de la cepa EHEC EDL933 silvestre, se usó el método de recombinación homóloga y cada uno de estos fue remplazado por un gen que codifica para resistencia a kanamicina (Datsenko and Wanner, 2000). El gen de resistencia a kanamicina fue amplificado a partir del plásmido pKD4 por PCR usando los oligonucleótidos enlistados en la Tabla 2. La extracción de ADN plasmídico se realizó usando el protocolo comercial *Wizard Plus SV Mnipreps ADN Purification System* (Promega, Madison, WI). La purificación de fragmentos de ADN y su extracción de geles de agarosa se llevó a cabo utilizando el protocolo comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen, Hilden, Alemania). La transformación de EHEC EDL933 se realizó por electroporación de células competentes utilizando el sistema electroporador ECM 630 (BTX, Holliston, MA).

Obtención de células competentes por el método de CaCl₂

La cepa EHEC EDL933 se inoculó en 3 ml de medio LB durante 16 h a 37°C/150 rpm. De este cultivo se utilizaron 300 µl para inocular un tubo con 10 ml de medio LB y se incubó bajo las mismas condiciones por 90 min. El cultivo se centrifugó a $4,500 \times g$ durante 10 min a 4°C, el paquete celular obtenido se resuspendió en 4 ml de MgCl₂ 0.1 M y se mantuvo en hielo durante 10 min. Posteriormente, el cultivo se centrifugó como se describió anteriormente, el paquete celular se resuspendió en 4 ml de CaCl₂ 0.1 M frío y se incubó en hielo durante 1 h. Las bacterias se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en 4 ml de CaCl₂. Las células competentes, se distribuyeron en alícuotas de 200 µl, en tubos Eppendorf de 0.6 ml. Para conservar bacterias competentes se agregó 20% de glicerol estéril y se almacenó a -70°C.

Obtención de células electrocompetentes

La cepa EHEC EDL933 (*rec+*) se inoculó en 11 ml de medio SOC-Ampicilina toda la noche a 30°C/150 rpm. De este cultivo se utilizaron 10 ml para inocular un matraz con 90 ml de medio SOC-Ampicilina y se incubó durante 1 h a 30°C/180 rpm. Después de este periodo de incubación, se adicionó 1 ml de arabinosa 1 M y se indujo durante 4 h a 30°C/180 rpm. Posteriormente se centrifugó a $3,121 \times g$ durante 15 min a 4°C, el paquete celular obtenido se suspendió en agua miliQ fría y estéril, este lavado se repitió dos veces más. Finalmente, el paquete celular se resuspendió en 1 ml de agua con glicerol al 10% y se almacenó a -70°C.

Transformación de bacterias EHEC EDL933 competentes con los plásmidos pKD46 y el gen de resistencia a Kanamicina

Las bacterias con el plásmido pKD4 y pKD46 se inocularon en 10 ml de medio LB con kanamicina (50 µg/ml), 30°C/160 rpm y ampicilina (100 µg/ml), 37°C/160 rpm durante toda la noche, respectivamente. El cultivo fue centrifugado a $3,121 \times g$ a temperatura ambiente durante 15 min, para obtener la pastilla bacteriana. Los plásmidos fueron purificados con el kit Wizard®Plus SV Minipreps DNA purification

System, como indica el fabricante. En un tubo Eppendorf de 0.6 ml, se adicionaron 100 μ l de bacterias competentes, más 200, 400 y 800 ng de plásmido pKD46 purificado por separado, se mezcló suavemente y transfirió a una celda para electroporación. Posteriormente, se sometió a un pulso eléctrico, usando un electroporador bajo los siguientes parámetros: Voltaje 2,500 V (HV), Resistor 0.200 Ω , Capacitor 0025 μ F \downarrow . Inmediatamente después del pulso eléctrico, se removieron las bacterias utilizando 1 ml de medio SOC y se incubaron durante 1 h a 30°C/150 rpm. Al día siguiente, se inocularon 100 μ l de estas bacterias en medio SOC suplementado con ampicilina (100 μ g/ml), para seleccionar bacterias transformadas con el plásmido pKD46, EHEC EDL933 (*rec+*).

Usando el plásmido purificado, pKD4, como templado, se amplificó por PCR el gen de resistencia a kanamicina, a partir de oligonucleótidos que poseen regiones homólogas para cada uno de los genes mutados (Tabla 2). Los productos de PCR obtenidos, fueron purificados con un *kit* comercial (QIAquick Gel Extraction Kit) y cuantificados. A continuación, en un tubo Eppendorf de 0.6 ml, se adicionaron 100 μ l de bacterias electrocompetentes (EHEC EDL933 [*rec+*]) más 200, 400 y 800 ng de productos de PCR (gen de resistencia a kanamicina), se mezcló suavemente y transfirió a una celda para electroporación. Posteriormente, se sometió a un pulso eléctrico, usando un electroporador bajo los siguientes parámetros: Voltaje 2,500 V (HV), Resistor 0.200 Ω , Capacitor 0025 μ F \downarrow . Inmediatamente después del pulso eléctrico, se removieron las bacterias utilizando 1 ml de medio SOC y se incubaron durante 1 h a 30°C/150 rpm. Al día siguiente, se inocularon 100 μ l de estas bacterias en medio SOC suplementado con kanamicina (50 μ g/ml), para seleccionar bacterias transformadas con el gen de resistencia a kanamicina, los cuales se espera intercambiaron el gen a mutar por el de resistencia a kanamicina.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados en este estudio

Primer	Secuencias 5'-3'
Hibridan al gen blanco y amplifican el gen de kanamicina:	
<i>hlyD-kam</i> -F1-EDL933	CAG TTT ATA TGC ATA TTT ATA TCA GTT GCA GGC ATA ACG TTG TAG GCT GGA GCT GCT TCG
<i>hlyD-kam</i> -R1-EDL933	GCC AAT ATG TTA TTT ATA TAC TAA CGT TCA CGT AAA CTT TCC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G
<i>etpC-kam</i> -F1-EDL933	CCG TTA ATC AAA ACA TAA AGT AGC GTC CAG CGT TTT ATT GTG TAG GCT GGA GCT GCT TC
<i>etpC-kam</i> -R1-EDL933	TAC CGG CAA ACG CCC ATT CAA CCA TTT CCT GAA CAA TCA CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG
<i>escN-kam</i> -F1-EDL933	CTT AAA GTA TTA GGA ACG GTA AAT GAT TTC AGA GCA TGA TTC TGT ATT GTG TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG
<i>escN-kam</i> -R1-EDL933	ATT CTG TCC AAC ATA CTC AGG CAA CCA CTT TGA ATA GGC TTT CAA TCG CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG
<i>espP-kam</i> -F1-EDL933	ACA TTA GAA AAA CCA ATG TTT CCC TTA AAA ATG GAG CTT ATA TGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G
<i>espP-kam</i> -R1-EDL933	GGC ACT GAG CGT AAA GGG CCC GCA GGC CCT TTT GAA TAC GGA GTA TCA CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG
<i>virK-kam</i> -F1-EDL933	ACG TTA GTA ATC ACA CTA TTG ATG TTT GGT TAA GAT ACG CAA TGT GTG TAG GCT GGA GCT GCT T
<i>virK-kam</i> -R1-EDL933	CGC GCG GTC GCG CGG ATT AAC CGC GAA ACA TCG TGG CCA TTT GTG GCT CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG
<i>clpV-kam</i> -F1-EDL933	ACG CAG GAC ATC CTG CAC CAG CTA AAC AAA TTA CTT CGA TAA GGA CGT TTT GTG TAG GCT GGA GCT GCT T
<i>clpV-kam</i> -R1-EDL933	CCA CTG CCG ACA ACC GAA TCC GGG CAA TCG CCG TGT TAG CCG CCA TTC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G
Amplifican regiones internas de los genes	
<i>hlyD</i> -F-EDL933	TGA CGG TGC CTG GTG TTG AAT CTG
<i>hlyD</i> -R-EDL933	CCT GAA CAG TAC CAC TCA CAG GAG C
<i>etpC</i> -F-EDL933	ATC AGC TGG TGT CGG TTA TC
<i>etpC</i> -R-EDL933	TAC CCG GAA TCA AGC GAT AA
<i>escN</i> -F-EDL933	TTG CGG TAT TGG GCA GCG TA
<i>escN</i> -R-EDL933	GTA ACG AAG AAA AAA CAC TCG GAG G
<i>espP</i> -F-EDL933	CTG TTG GTC GTA ATG CAA AT
<i>espP</i> -R-EDL933	GAG GTC GCT TTC ATC ATG AC
<i>virK</i> -F-EDL933	GCC GTA AGC AAT TGC TGG AG
<i>virK</i> -R-EDL933	GGG AAA TTC CAC ATC AGG AAA TCC
<i>clpV</i> -F-EDL933	GGC GGG CTG GAT ATC TCC AA
<i>clpV</i> -R-EDL933	CCT TTG ATG GTG TCG CCC AG

Marcaje de células en cultivo con isótopos estables de aminoácidos (SILAC)

El marcaje metabólico de células en cultivo celular a partir de isotopos de aminoácidos fue adaptado para marcar el proteoma de EHEC EDL933. Siguiendo el método estándar establecido (Ong & Mann, 2006), EHEC EDL933 fue crecida en medio LB a 37°C, toda la noche, sin agitación. Posteriormente, se realizó una dilución del cultivo anterior para inocular la misma cantidad de bacterias e iniciar el crecimiento bacteriano a la misma densidad óptica (DO). Para marcar el proteoma bacteriano, se usaron 3 ml de medio DMEM deficiente de L-Lisina y L-Arginina. El medio ligero fue suplementado con isótopos de abundancia natural de L-Lisina-2HCl (0.46 mM) y L-Arginina-2HCl (0.46 mM) y por separado, para el medio pesado se usaron isótopos de [¹³C₆]-H-Lisina-2HCl (0.46 mM) y L-Arginina-2HCl (0.46 mM) (ThermoFisher Scientific), a una DO inicial 0.005, los cultivos se incubaron durante 8 h a 37°C, 180 rpm. Al finalizar este periodo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 15,119 × g durante 10 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet p40, 0.5% Deoxicolato de sodio), las bacterias fueron sujetas a sonicación a 50 de amplitud en intervalos de 1 minuto (tres veces); para obtener el clarificado se centrifugó a 20,500 × g durante 5 minutos a 4°C. Las proteínas fueron cuantificadas mediante el método de Bradford.

Digestión de proteínas con Lys-C

La digestión de proteínas se realizó en solución con bicarbonato de amonio. A las proteínas resuspendidas en *buffer* RIPA, se les realizó cambio de *buffer* y se resuspendieron en *buffer* de bicarbonato de amonio (50 mM). Brevemente, se usaron 130 µg/µl de proteína, se colocaron en un filtro de 3 kDa, se adicionaron 400 µl de bicarbonato de amonio (50 mM) y se centrifugó a 14,000 × g durante 40 min, esto se repitió 4 veces. Al final las proteínas se eluyeron con un volumen de 50 µl y se cuantificaron. Se usaron 50 µg de proteínas para realizar la digestión, a las que se adicionaron 2.5 µl de RapiGest™ (0.2%) y se incubó a 80°C durante 15 min a 300 rpm. Para realizar la reducción y alquilación de las proteínas se agregaron 2.5

μl de DDT (100 mM) y se incubó a 60°C durante 30 min a 300 rpm; posteriormente se adicionaron 2.5 μl de iodoacetamida (300 mM) y se incubó durante 30 min protegiendo de la luz. Para la digestión se agregaron 2.5 μl de Lys-C (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Wako) mas 7.5 μl de bicarbonato de amonio (50 mM) y se incubó toda la noche a 37°C. Finalmente se adicionaron 32.5 μl acido fórmico (0.1%), se incubó a 37°C durante 2 h; se centrifugo a 6°C durante 45 min, el sobrenadante es el que contiene lo péptidos provenientes de la digestión. Se realizaron 3 inyecciones, en donde se usaron 1.5 μg de péptidos digeridos para análisis por espectrometría de masas (LC-HDMS^E).

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Esta técnica se realizó en microplacas de cultivo de 96 pozos. Lo primero que se obtuvo fue una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (1 mg/ml) en amortiguador de fosfatos salinos (PBS, pH 7.4), esta curva se realizó para cada lote de reactivo de Bradford. Para realizar la curva se colocaron en el primer pozo 10 μl de BSA y 310 μl de PBS para tener un volumen final de 320 μl . A partir de los pozos 2 al 6, se colocaron 160 μl de PBS y se realizaron diluciones dobles seriadas a partir del primer pozo hasta el sexto pozo, teniendo un volumen final de 160 μl en cada uno de los 6 pozos con una cantidad de: 5, 2.5, 1.25, 0.312 y 0.156 μg de BSA. El séptimo pozo fue utilizado como blanco al cual solo se agregó 160 μl de PBS. Todo esto se realizó por triplicado. A cada pozo se le agregaron 40 μl de solución de Bradford 5X (azul de Coomassie G-250, etanol absoluto, ácido ortofosfórico 85% y agua) y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, las muestras se leyeron a una absorbancia de 595 nm en un lector de microplacas de ELISA (BioRad Laboratories, Richmond, CA). Con los datos obtenidos se construyó una gráfica estándar de absorbancia-concentración mediante regresión lineal, así como una hoja de cálculo electrónico (macro) en el *software* Excel Microsoft®. Para determinar la concentración de proteína en las muestras problema, se realizó una dilución (1:30) y se colocaron 5, 7 y 10 μl de dicha dilución, llevándolas a un volumen final de 160 μl de PBS, se adicionaron 40 μl del reactivo de Bradford 5X y se

determinó la lectura como se describió anteriormente. Esta lectura fue cotejada con la curva estándar, por medio de la hoja de cálculo, para obtener la concentración de proteínas real en la muestra (Bradford, 1976).

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con SDS (en condiciones reductoras). A las muestras se les agregó amortiguador de muestra con β -mercaptoetanol y se calentaron a ebullición en baño María durante 10 min. Las muestras fueron analizadas a voltaje constante, el cual inició a 60 V durante 20 min y posteriormente aumentando a 120 V hasta que el amortiguador de corrida alcanzó la parte distal de la cámara de electroforesis. Después de la corrida electroforética, los geles fueron transferidos a membranas de PVDF para su análisis por *Western blot* o bien, fueron teñidos con colorante de Fairbanks durante 10 min. Al término de la tinción se retiró el colorante, posteriormente se destiñeron con una solución de metanol, ácido acético y agua hasta que se observaron claramente las proteínas (Laemmli, 1970).

Western blot

Las proteínas separadas en SDS-PAGE al 12% fueron transferidas a membrana de PVDF (Immubilon P^{sq}, Millipore) de la siguiente manera. En una cámara de transferencia semiseca se pusieron en contacto la membrana de PVDF y el gel de poliacrilamida que contenía las proteínas. Las proteínas fueron transferidas durante 40 min a 20 V corriente continua a temperatura ambiente. Las membranas se retiraron de la cámara y se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h en leche descremada al 5% disuelta en PBS-Tween 20 (0.05%) (PBS-T). Posteriormente, el anticuerpo primario (anti-EspA 1:5000 y anti-Tir 1:1200, ambos hechos en conejo) fue diluido en PBS-T y se incubó toda la noche a 4°C. Al finalizar el tiempo de incubación, la membrana fue lavada 3 veces con PBS-T durante 10 min. La membrana fue incubada con un anticuerpo secundario anti-isotipo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Thermo Fisher, Waltham, MA) diluido en PBS-T

durante 1 h. Al término de la incubación, la membrana fue lavada 5 veces con PBS-T durante 10 min. La detección de las proteínas se llevó a cabo utilizando el reactivo EMD Millipore™ Immunobilon™ Western Chemiluminiscent HRP Substrate (ECL) y la reacción se visualizó utilizando el equipo LI-COR Odyssey®.

RESULTADOS

EHEC EDL933 es transformada de forma eficiente con el plásmido pKD46 que contiene la recombinasa red λ

Las bacterias como *Escherichia coli* no son fácilmente transformables con fragmentos de ADN lineal debido a que poseen exonucleasas que lo degradan. Por otra parte, se sabe que los bacteriófagos codifican su propio sistema de recombinación homóloga (Datsenko & Wanner, 2000).

Con este antecedente y para poder generar eliminaciones genéticas en los sistemas de secreción de la cepa EHEC EDL933, se utilizó el método de recombinación homóloga, el cual consiste en inducir la expresión de la recombinasa red λ en bacterias para que posteriormente sean transformadas con fragmentos de ADN lineal, que codifican resistencia a un antibiótico determinado. A partir de células EHEC EDL933 competentes, el plásmido de expresión de la recombinasa red λ , pKD46, se introdujo mediante electroporación. Posteriormente, las bacterias se seleccionaron en medio suplementado con ampicilina a 30°C, puesto que este plásmido contiene el gen que codifica la resistencia a ampicilina y además tiene un origen de replicación sensible a la temperatura. Para corroborar que EHEC EDL933 se transformó, se seleccionaron dos colonias que crecieron en medio SOC-Amp, a partir de las cuales se llevó a cabo la extracción de plásmido para determinar la presencia del vector pKD46. El plásmido purificado se analizó en un gel de agarosa; en las dos clonas seleccionadas se detectaron bandas de aproximadamente 6, 329 pb, lo cual corresponde con el tamaño del plásmido pKD46, de manera similar a lo observado en el control positivo (Fig. 8). Esto indica que ambas clonas de EHEC podrían expresar la recombinasa red λ , misma que permitirá que el proceso de recombinación pueda llevarse a cabo.

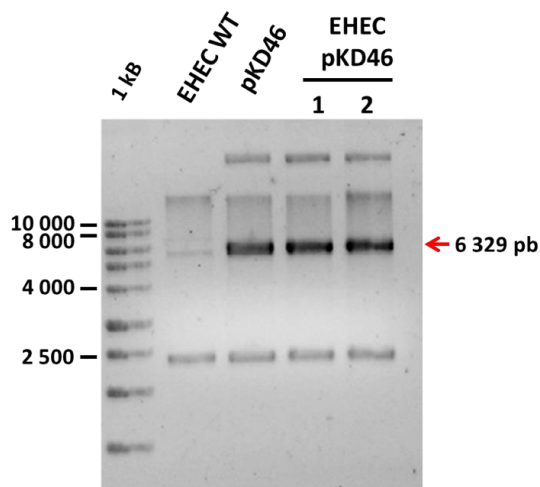


Fig. 8. Transformación de EHEC EDL933 con el plásmido pKD46.

Bacterias EHEC EDL933 fueron transformadas mediante electroporación con el vector de expresión de la recombinasa red λ , pKD46 y seleccionadas en medio SOC-Ampicilina, a partir de las cuales se realizó extracción de plásmido. Como control negativo se usó EHEC silvestre (sin transformar) y como control positivo se usó plásmido pKD46, empleado en la transformación. Los plásmidos fueron identificados mediante electroforesis en geles de agarosa 1%.

EHEC EDL933 (*rec+*) no integró el gen de resistencia a kanamicina en el gen *escN*

La estrategia básica de esta metodología consiste en reemplazar una secuencia cromosómica, con un gen de resistencia a antibióticos. El reemplazo se genera mediante PCR usando oligonucleótidos con fragmentos de homología con el gen a mutar (H1-H2) que comprenden 36-50 nucleótidos y fragmentos de homología con el gen de resistencia a antibióticos (P1-P2) de 20 nucleótidos cada uno. Por lo tanto, nos dimos a la tarea de diseñar oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes estructurales de los sistemas de secreción de EHEC EDL933, que será mutado (Tabla 2).

Los oligonucleótidos diseñados para generar la delección del gen *escN*, se usaron para amplificar por PCR el gen de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. Los fragmentos obtenidos de la PCR, que poseen el gen de resistencia a kanamicina flanqueados por regiones homólogas a *escN*, se usaron

para reemplazar el gen *escN*, el cual es un componente estructural importante para la función del T3SS. Las bacterias transformadas con los productos de PCR, fueron seleccionadas en medio suplementado con kanamicina. Para verificar la delección del gen *escN* realizamos una PCR de colonia para amplificar un fragmento intermedio del gen de resistencia a kanamicina. Sin embargo, en este experimento no fue posible obtener productos de amplificación del tamaño esperado, 471 pb, en ninguna de las siete clonas seleccionadas como el que se observa en el control positivo usando plásmido purificado (pKD4) (Fig. 9).

En experimentos anteriores, se había observado que la cepa EHEC EDL993, había perdido la movilidad, por lo cual existía la posibilidad de que los resultados obtenidos en este experimento pudieran tener asociación con ello y de alguna manera esto representara un inconveniente para que el proceso de recombinación fuera ineficiente.

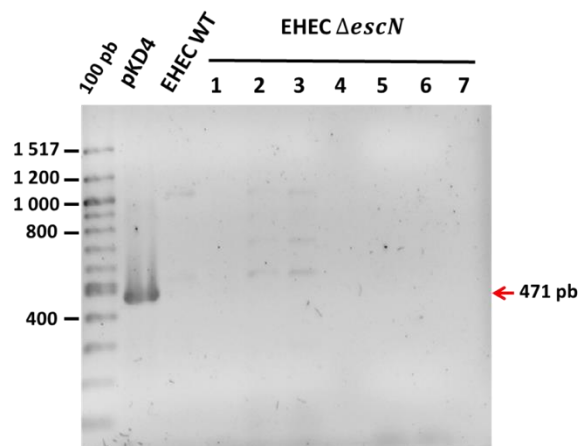


Fig. 9. Transformación de EHEC EDL933 (*rec+*) con el gen de resistencia a kanamicina flanqueado por secuencias de *escN*.

Se seleccionaron siete clonas que crecen en medio SOC-Kanamicina, previamente electroporadas con fragmentos de PCR que poseen regiones homólogas a *escN* y el gen de resistencia a kanamicina proveniente del plásmido pKD4; para identificar por PCR clonas resistentes a kanamicina a partir de lisados bacterianos. Como control negativo se usó EHEC silvestre (sin transformar) y como control positivo se usó el plásmido pKD4, que contiene la secuencia del gen de kanamicina. Los productos de la PCR fueron identificados mediante electroforesis en geles de agarosa 1%.

Una nueva cepa certificada de EHEC EDL933 también fue transformada de forma eficiente con el plásmido pKD46 que contiene la recombinasa red λ

Para descartar la probable asociación de los resultados anteriores con problemas observados en la cepa con la cual se realizaron los experimentos previos, se adquirió una nueva cepa EHEC EDL933 certificada. A partir de esto, EHEC EDL933 fue nuevamente transformada con el vector de expresión de la recombinasa red λ , el plásmido pKD46. Se seleccionaron dos colonias bacterianas que crecen en medio suplementado con ampicilina, a partir de las cuales se llevó a cabo la purificación del plásmido, en ambos casos se observa una banda de 6,329 pb, que corresponde con el tamaño del plásmido pKD46, como se observa en el control positivo (Fig. 10).

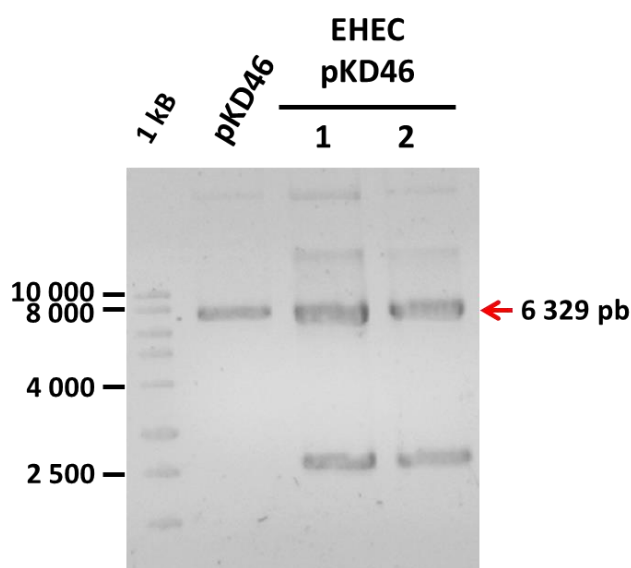


Fig. 10. Transformación de la cepa certificada EHEC EDL933 con el plásmido pKD46.

Bacterias EHEC EDL933 fueron transformadas mediante electroporación con el vector de expresión de la recombinasa red λ , pKD46 y seleccionadas en medio SOC-Ampicilina, a partir de las cuales se realizó la extracción de plásmido. Como control positivo se usó el plásmido pKD46. Los plásmidos fueron identificados mediante electroforesis en geles de agarosa 1%.

EHEC EDL933 (*rec+*) integra eficientemente el gen de resistencia a kanamicina en el gen *hlyD*

El sistema de secreción tipo I (T1SS), es usado por EHEC EDL933 para secretar una hemolisina de EHEC (EHEC Hly) (Bielaszewska et al., 2014). Comprender la participación de este sistema de secreción en la patogénesis mediada por EHEC EDL933 es muy importante. Por lo tanto, seleccionamos el gen *hlyD*, mismo que forma parte de los componentes estructurales de este sistema, el cual servirá para construir la mutante en el T1SS.

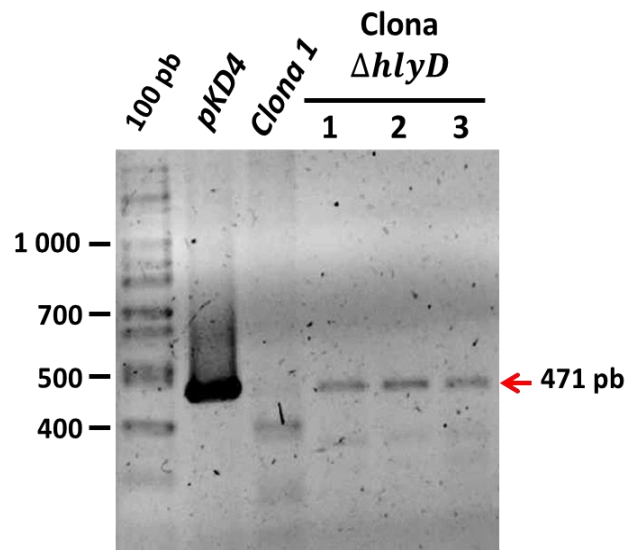


Fig. 11. Construcción de la cepa mutante en el gen *hlyD*.

Se seleccionaron tres clonas EHEC EDL933 (*rec+*) que crecen en medio SOC-Kanamicina previamente electroporadas con fragmentos de PCR que poseen regiones homólogas *hlyD* y el gen de resistencia a kanamicina proveniente del plásmido pKD4. Se usó lisado total (clona 1) y plásmido purificado (clona 1, 2 y 3) para identificar por PCR las clonas transformadas con el gen de resistencia a kanamicina. Como control positivo se usó el plásmido pKD4, que contiene el gen de resistencia a kanamicina. Los productos de la PCR fueron identificados mediante electroforesis en geles de agarosa 1.5%.

Usando el método de inactivación por recombinación homóloga, que se ha descrito anteriormente, la cepa EHEC EDL933 (*rec+*) fue transformada con el gen de resistencia a kanamicina, obtenido por PCR a partir del plásmido pKD4 con *primers*

flanqueados con la secuencia de *hlyD*. Para comprobar que las bacterias incorporaron el gen de resistencia a kanamicina, se realizó una PCR de colonia, para amplificar una región intermedia de dicho gen. A partir de este ensayo, se observó que usando lisados bacterianos es muy difícil detectar fragmentos que correspondan al gen de resistencia a kanamicina. Sin embargo, al realizar la purificación de plásmido de las bacterias que crecen en presencia de kanamicina, se puede observar claramente un producto de amplificación con un tamaño de 471 pb, como el que se observa en el control positivo con el plásmido pKD4 (Fig. 11). Es importante aclarar que para este caso se decidió purificar el plásmido de estas bacterias, porque el T1SS de EHEC EDL933 se encuentra codificado dentro del plásmido pO157, propio de dicha bacteria.

EHEC EDL933 (*rec+*) integra eficientemente el gen de resistencia a kanamicina en los genes *clpV* y *etpC*

De acuerdo con datos de distintos estudios, se cree que el T6SS es muy importante para la competencia entre bacterias, tanto por los nutrientes como para establecer un nicho replicativo. Por lo tanto, resulta muy interesante entender cual es el papel de este sistema de secreción tipo 6 durante el proceso infeccioso que establece EHEC EDL933. Por otra parte, el sistema de secreción tipo 2 (T2SS), se encuentra conservado en la mayoría de las bacterias Gram negativas, y las proteínas secretadas mediante este sistema tienen un amplio rango de funciones biológicas, pero generalmente son enzimas, como proteasas, lipasas, y fosfatasas, así como proteínas que procesan carbohidratos (Green & Meccas, 2016). Para determinar el papel del T6SS y T2SS en la patogénesis mediada por EHEC EDL933, se eligieron genes estructurales para cada uno de estos sistemas. Para construir la mutante en el T6SS, se seleccionó el gen *clpV* (ATPasa) y para el T2SS el gen *etpC* (proteína de conexión con secretina).

Nuevamente, a partir del método de inactivación por recombinación homóloga, transformamos la cepa EHEC EDL933 (*rec+*) con el gen de resistencia a kanamicina obtenido por PCR, usando los oligonucleótidos que poseen regiones

homólogas a los genes *clpV* y *etpC*, por separado. Para determinar si las bacterias que fueron transformadas con dichos productos de PCR incorporaron el gen de resistencia a kanamicina en su genoma, se seleccionaron cuatro clonas de cada construcción para amplificar por PCR una región interna de dicho gen. Para la construcción de la mutante en el gen *clpV*, se obtuvieron tres clonas que amplifican el gen de resistencia a kanamicina (clona 1, 2 y 4); y en el caso de la construcción del gen *etpC*, las cuatro clonas seleccionadas amplifican el gen de resistencia a kanamicina, puesto que en ambos casos se obtuvieron bandas de 471 pb, similares al control positivo con plásmido purificado, pKD4 (Fig.12).

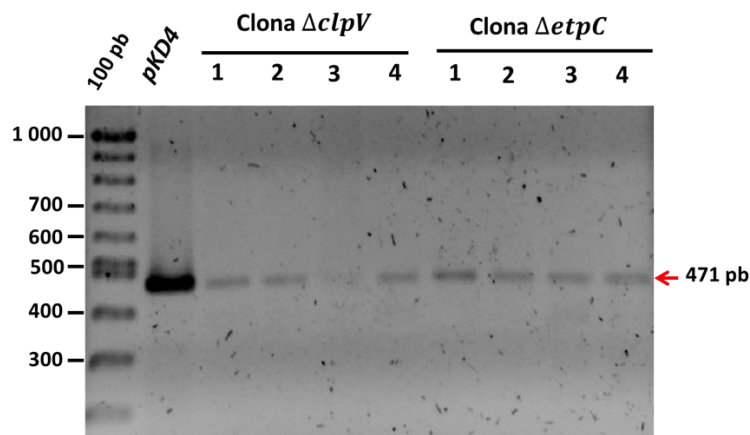


Fig. 12. Construcción de las cepas mutantes en los genes *clpV* y *etpC*.

Se seleccionaron cuatro clonas de EHEC EDL933 (*rec+*) que crecen en medio SOC-Kanamicina previamente electroporadas con fragmentos de PCR que contienen el gen de resistencia a kanamicina proveniente del plásmido pKD4 y regiones homólogas a los genes *clpV* y *etpC*, respectivamente. Se usaron lisados bacterianos para identificar por PCR las clonas que adquirieron el gen de resistencia a kanamicina. Como control positivo se usó plásmido pKD4, que contiene el gen de resistencia a kanamicina. Los productos de la PCR fueron identificados mediante electroforesis en geles de agarosa 1.5%.

EHEC EDL933 (*rec+*) no integró el gen de resistencia a kanamicina en *virK*

El sistema de secreción tipo 5 (T5SS), destaca entre los sistemas de secreción por su aparente simplicidad para translocar proteínas, denominadas proteínas autotransportadoras. Sin embargo, diferentes estudios han reportado que proteínas

chaperonas que se localizan en el periplasma, son importantes para la translocación de estas proteínas, ya que previenen el mal plegamiento o la agregación de las mismas. VirK, fue identificada como una proteína periplásmica que se une específicamente al dominio pasajero de la toxina codificada por plásmido (Pet), una serín proteasa autotransportadora producida por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), y que en ausencia de VirK, los productos de degradación de Pet se acumulan en el espacio periplásmico (Tapia-Pastrana et al., 2012). Por lo que para poder estudiar el papel de las proteínas translocadas a través del T5SS en la cepa EHEC EDL933, nos planteamos mutar el gen *virK*, presente en dicha bacteria.

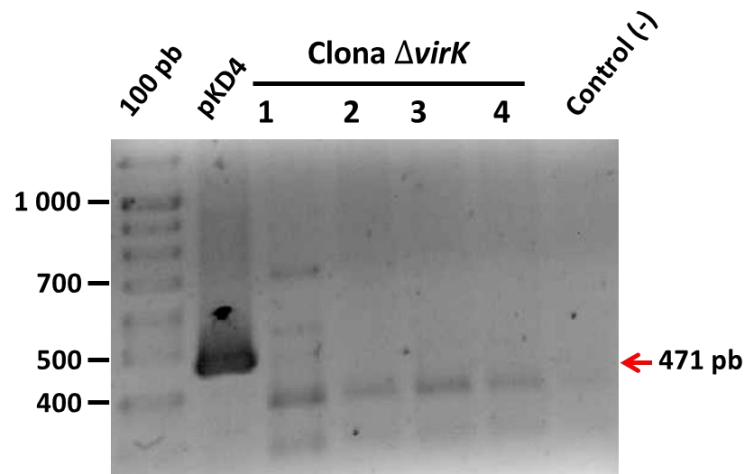


Fig. 13. Construcción de la cepa EHEC EDL933 mutante en el gen *virK*.

Se seleccionaron cuatro clonas EHEC EDL933 (*rec+*) que crecen en medio SOC-Kanamicina previamente electroporadas con fragmentos de PCR que poseen regiones homólogas a *virK* y el gen de resistencia a kanamicina proveniente del plásmido pKD4. Se usaron lisados bacterianos para comprobar por PCR las clonas que adquirieron el gen de resistencia a kanamicina. Como control negativo se usó EHEC EDL933 silvestre (sin transformar) y como control positivo se usó plásmido pKD4, que contiene el gen de resistencia a kanamicina. Esto se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

Para poder generar la delección de *virK*, se usó el método de inactivación por recombinación homóloga. EHEC EDL933 (*rec+*), fue transformada con los productos de PCR obtenidos usando los oligonucleótidos que poseen regiones

homólogas que flanquean al gen *virK* y el gen de resistencia a kanamicina. Para identificar a las bacterias que adquirieron dicha resistencia, se seleccionaron colonias que crecen en presencia de kanamicina, a partir de las cuales se realizó un ensayo de PCR para amplificar una región interna de este gen. Los resultados indican que las clonas seleccionadas, a pesar de que crecen en medio suplementado con kanamicina, no incorporaron el gen, puesto que en ninguna se obtuvo producto de amplificación del tamaño esperado, 471 pb, como el que se obtiene en el control positivo con el plásmido pKD4 (Fig. 13).

Diseño de oligonucleótidos para corroborar por PCR mutantes en los sistemas de secreción de EHEC EDL933

Para comprobar la interrupción de genes, diseñamos oligonucleótidos que amplificarán regiones internas de cada uno de los genes seleccionados para las mutantes en los sistemas de secreción. Por lo tanto, nos dimos a la tarea de analizar si los oligonucleótidos se diseñaron de forma correcta, para lo cual se realizó un ensayo de PCR para detectar los diferentes genes en la cepa EHEC EDL933 silvestre. Los *primers* diseñados para cada gen que deseábamos mutar fueron capaces de amplificar por PCR el fragmento esperado. El análisis de los amplicones en geles de agarosa mostró claramente productos de amplificación del tamaño esperado para cada gen: *hlyD* 642pb, *etpC* 570 pb, *escN* 360 pb y *espP* 540 pb (Fig. 14A). Sin embargo, para *clpV* no se observó producto de amplificación del tamaño que correspondía, 938 pb. No obstante, modificando la temperatura de alineamiento fue posible amplificar una región interna del gen *clpV*, obteniendo una banda de 938 pb. De igual manera, se probó el oligonucleótido diseñado para el gen *virK*, con el que se obtuvo un producto de PCR de 324 pb, el cual corresponde con el tamaño esperado (Fig. 14B). Estos resultados indican que los *primers* son específicos y eficientes para amplificar los genes que deseamos mutar, por lo que nos permitirán detectar si dichos genes se pierden o no durante el proceso de mutagénesis.

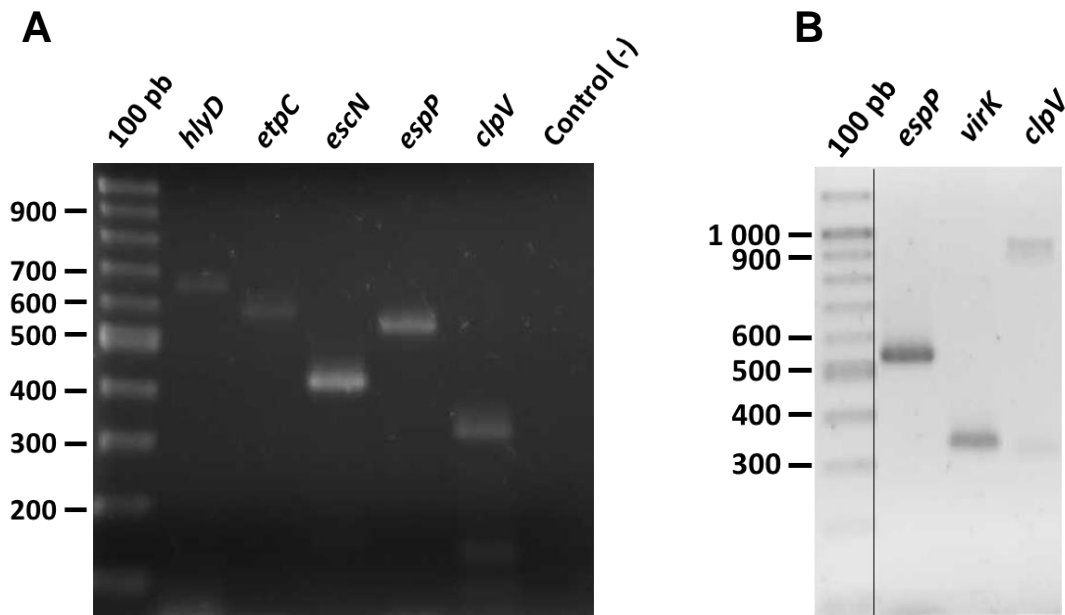


Fig. 14. PCR para probar el diseño de oligonucleótidos.

(A) Ensayo de PCR a partir de lisado total de la cepa EHEC EDL933 silvestre, usada como templado para amplificar regiones internas de los genes *hlyD*, *etpC*, *escN*, *espP* y *clpV* (T_m 57°C) (B) Ensayo de PCR a partir de lisado total de la cepa EHEC EDL933 silvestre, usada como templado para amplificar regiones internas de los genes *espP*, *virK* y *clpV*, usando un gradiente de temperaturas de alineamiento (T_m 57°C-63°C). Esto se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1.5%.

EHEC EDL933 (*rec+*) adquiere resistencia a kanamicina sin eliminar genes

Para verificar que en las cepas resistentes kanamicina, efectivamente exista deleción de los genes que corresponden a cada sistema de secrecion, se realizó un ensayo de PCR usando los oligonucleótidos que anteriormente diseñamos y probamos. Las clonas que previamente habíamos detectado como resistentes a kanamicina y que se sugerían habían intercambiado respectivamente los genes *hlyD*, *etpC*, *virK* y *clpV* por el gen de kanamicina, por lo cual, los *primers* diseñados de la region interna de los genes mutados no deberían ser capaces de amplificar dichos genes. A partir de este experimento, se observó que todas las clonas kanamicina resistentes seleccionadas usadas como templados, fueron capaces de

amplificar los genes *hlyD*, *etpC*, *virK* y *clpV*, como se observa al comparar cada muestra con el control positivo con EHEC EDL933 silvestre, respectivamente (Fig. 15).

Estos datos sugieren que las cepas resistentes a kanamicina no intercambiaron por recombinación los genes a mutar ya que dichas cepas aún poseen los genes. En contraste en las construcciones donadas por el Dr. José Luis Puentes, para las mutantes en los genes *escN* y *espP*, no se observa producto de amplificación que corresponda al tamaño que se esperaba. Con lo anterior, se comprueba por PCR que en dichas clonas existe delección de ambos genes. Por lo cual, es necesario repetir los ensayos para poder obtener las construcciones para las mutantes en los genes: *hlyD*, *etpC*, *virK* y *clpV*.

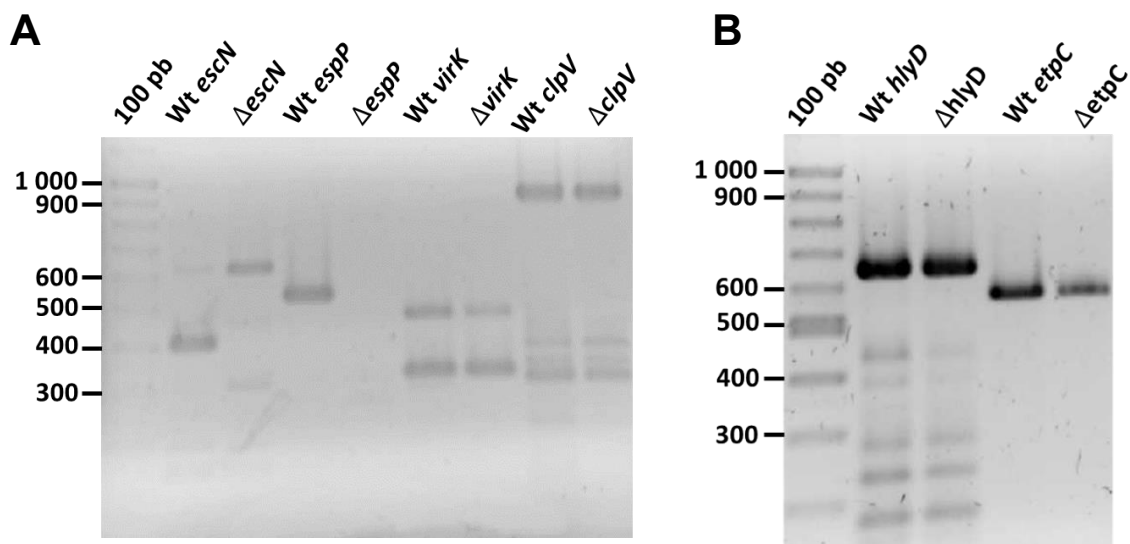


Fig. 15. EHEC EDL933 incorpora el gen de resistencia a kanamicina y no elimina genes.

(A) Ensayo de PCR para amplificar regiones internas de los genes *escN*, *espP*, *virK* y *clpV* a partir de lisados totales de cepas EHEC resistentes a kanamicina y EHEC silvestre. (B) Ensayo de PCR para amplificar regiones internas de los genes *hlyD* y *etpC* usando plásmido purificado de cepas EHEC resistente a kanamicina y EHEC silvestre.

Bacterias en fase logarítmica y la óptima expresión de la recombinasa aumentan la eficiencia del sistema de recombinación homóloga Red λ

El proceso de recombinación homóloga se beneficia de la replicación del DNA bacteriano. Por lo tanto, se realizaron algunas modificaciones en el protocolo para la obtención de bacterias recombinantes. En este ensayo se usaron bacterias EHEC EDL933 (*rec+*) en fase logarítmica, en lugar de las de fase estacionaria que usabamos previamente. Además, para asegurarnos que la recombinasa red λ se expresara correctamente, se aumentó la cantidad de arabinosa, que funciona como un inductor para la expresión de esta proteína. Las bacterias fueron transformadas con productos de PCR que contienen el gen de resistencia a kanamicina y regiones homólogas al gen *c/pV*. Para seleccionar las bacterias recombinantes, se usaron diez clonas que crecen en medio suplementado con kanamicina para identificar por PCR la presencia del gen de resistencia a este antibiótico. En todas las clonas seleccionadas se obtuvo un amplicon de 471 pb, como el que se obtiene en el control positivo con pKD4 (Fig. 16), estos resultados indican claramente que estas bacterias integraron el gen de resistencia a kanamicina.

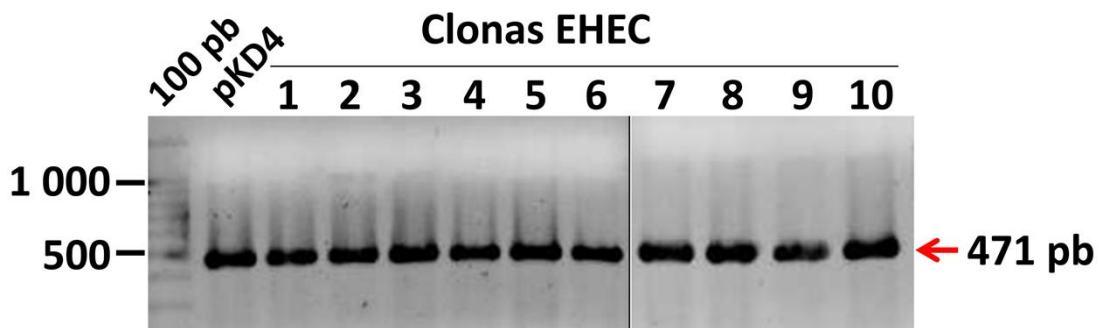


Fig. 16. EHEC EDL933 incorpora el gen de resistencia a kanamicina.

EHEC EDL933 (*rec+*) fue inducida para la expresión de proteínas para la recombinación durante 3 h con 75 mM de arabinosa (en lugar de 10 mM usado en ensayos previos), hasta una DO 0.5 (fase logarítmica) y posteriormente transformada con productos de PCR que contienen el gen de resistencia a kanamicina y regiones homólogas al gen *c/pV*. Se usaron lisados totales de diez colonias que crecen en medio SOC-Kanamicina para detectar por PCR el gen de resistencia a kanamicina. Como control positivo se usó el plásmido pKD4. Esto se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

Adicionalmente y para comprobar que estas bacterias efectivamente eliminaron el gen *clpV*, es decir lo intercambiaron por el gen de resistencia a kanamicina, se amplificó por PCR una región interna del mismo. El tamaño del amplicon esperado corresponde a 938 pb, el cual solo se observa en el control positivo con la cepa EHEC EDL933 silvestre, mientras que en las clonas resistentes a kanamicina no fue posible detectar dicho amplicón. Estos resultados indican que las diez clonas seleccionadas intercambiaron el gen *clpV* por el gen de resistencia a kanamicina y por tanto son mutantes para el gen *clpV* (Fig. 17).

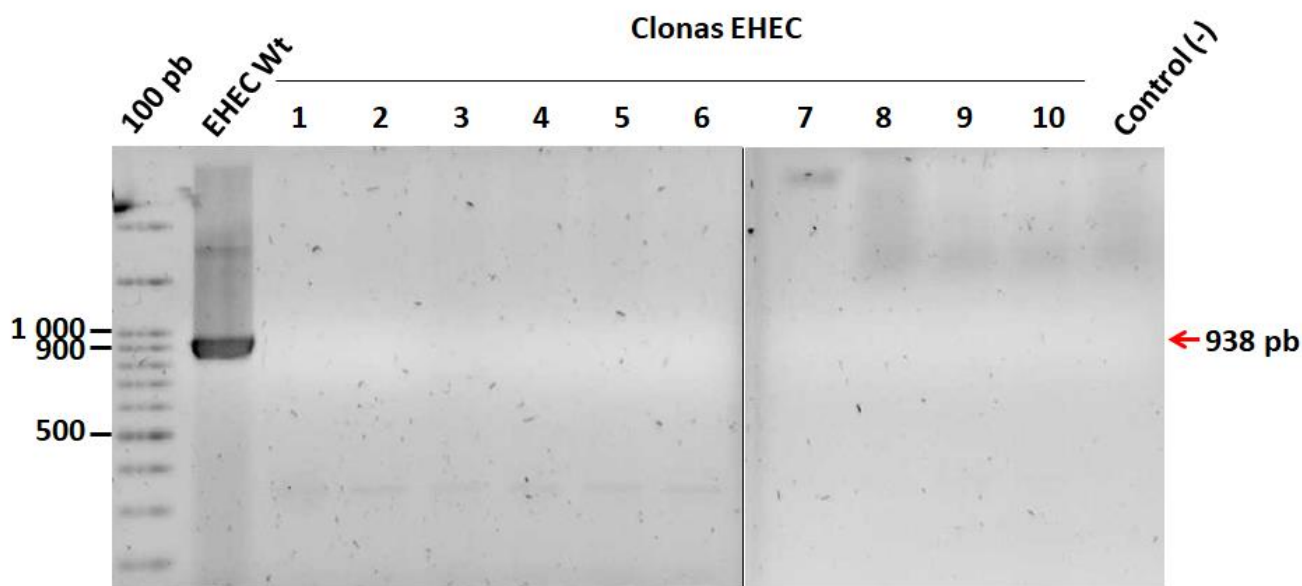


Fig. 17. EHEC EDL933 mutante en el gen *clpV*.

EHEC EDL933 (*rec+*) fue inducida para la expresión de proteínas de recombinación durante 3 h con arabinosa, hasta una DO 0.5 (fase logarítmica) y posteriormente transformada con productos de PCR que contienen el gen de resistencia a kanamicina y regiones homólogas al gen *clpV*. Se usaron lisados totales de diez colonias que crecen en medio SOC-Kanamicina para detectar por PCR el gen *clpV*. Como control positivo se usó lisado total de EHEC EDL933 silvestre y como control negativo se usó agua en lugar de DNA templado. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

Incorporación de aminoácidos SILAC: L-Lis y H-Lis

SILAC, es una técnica muy usada que permite marcar el proteoma de células eucariotas durante su cultivo, mediante la incorporación de isótopos de aminoácidos, gracias a la constante actividad metabólica que estas desarrollan durante su crecimiento. En el presente proyecto se pretende adaptar esta metodología para marcar el proteoma de la bacteria EHEC EDL933, por lo cual nos hemos dado a la tarea de evaluar si el uso de isótopos de aminoácidos no interfiere en la expresión de proteínas en esta bacteria.

Para comprobar que la incorporación de los aminoácidos L-Lisina y H-Lisina, no altera la expresión de proteínas de EHEC EDL933, esta cepa se cultivó en medio DMEM suplementado con L-Lisina/L-Arginina (medio ligero) o H-Lisina/L-Arginina (medio pesado), por separado, a una $DO_{600}=0.005$ durante 8 h. Después de las 8 h, se cosecharon las bacterias y se lisaron y las proteínas obtenidas fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE y *Western blot*. Las bacterias que se cultivaron en presencia del medio ligero o pesado, L-Lis y H-Lis, respectivamente, mostraron el mismo perfil de bandas de proteínas, indicando que no hubo cambios en la expresión de proteínas como se observa mediante SDS-PAGE (Fig. 18A). Para corroborar este resultado decidimos detectar la expresión de dos proteínas específicas de EHEC, Tir y EspA. Es bien conocido que el medio DMEM induce la expresión del T3SS, cuyo sistema incluye la expresión de una proteína translocadora (EspA) y una efectora (Tir). Por lo tanto, se analizaron las proteínas Tir y EspA por *Western blot*. Los anticuerpos anti-Tir y anti-EspA detectaron la expresión de las respectivas proteínas con igual nivel de expresión tanto en lisados obtenidas de cultivos con el isótopo ligero (L-Lis) o el pesado (H-Lis). Por lo que, la expresión de ambas proteínas es igual, esto indica que el uso de isótopos ligero (L-Lis) o pesado (H-Lis), no afecta la expresión de proteínas en EHEC EDL933 (Fig. 18B).

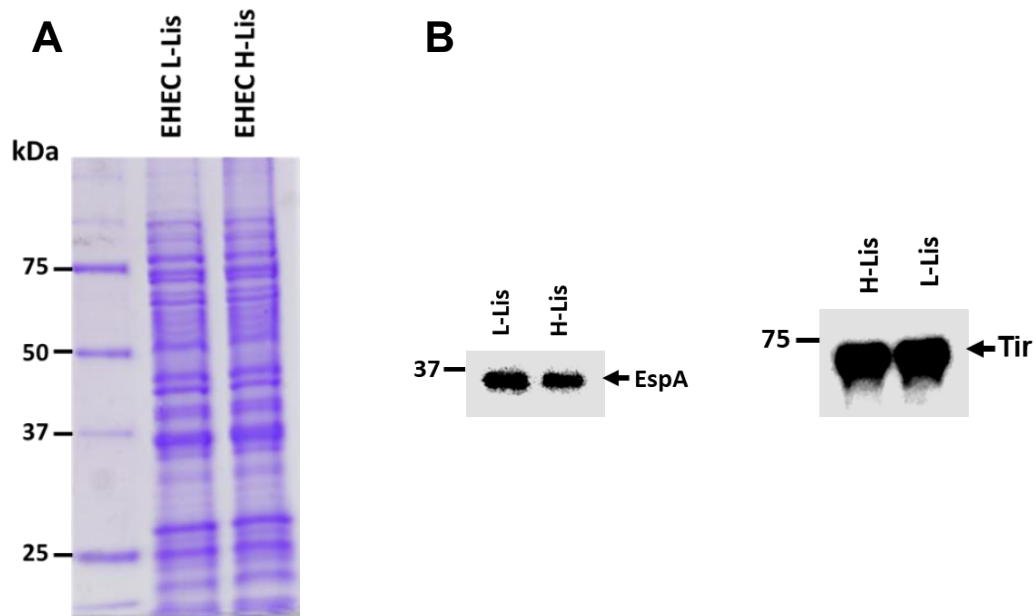


Fig. 18. Isótopos de lisina no afectan la expresión de proteínas en EHEC EDL933.

EHEC EDL933 fue crecida en medio DMEM en presencia de L-Lisina (medio ligero) o en DMEM en presencia de H-Lisina (medio pesado). (A) Lisados totales de bacterias crecidas en medio DMEM ligero y pesado fueron analizadas mediante SDS-PAGE. (B) Células EHEC EDL933 crecidas en medio DMEM ligero y pesado fueron lisadas y los extractos totales fueron cuantificados por el método de Bradford e iguales concentraciones de proteína fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron analizadas por *Western blot*, utilizando anticuerpos anti-Tir y anti-EspA, para analizar la expresión de proteínas del T3SS.

Análisis por LC-HDMS^E indica que EHEC EDL933 incorpora isótopos de Lisina SILAC, es una metodología que permite generar diferencias en el peso molecular de las proteínas, sustituyendo un aminoácido específico en el medio de crecimiento de las células. Empleando esta metodología, se llevó a cabo el marcaje del proteoma de la bacteria EHEC EDL933, usando isótopos de Lisina. La incorporación de isótopos se evaluó a través de análisis por espectrometría de masas (MS).

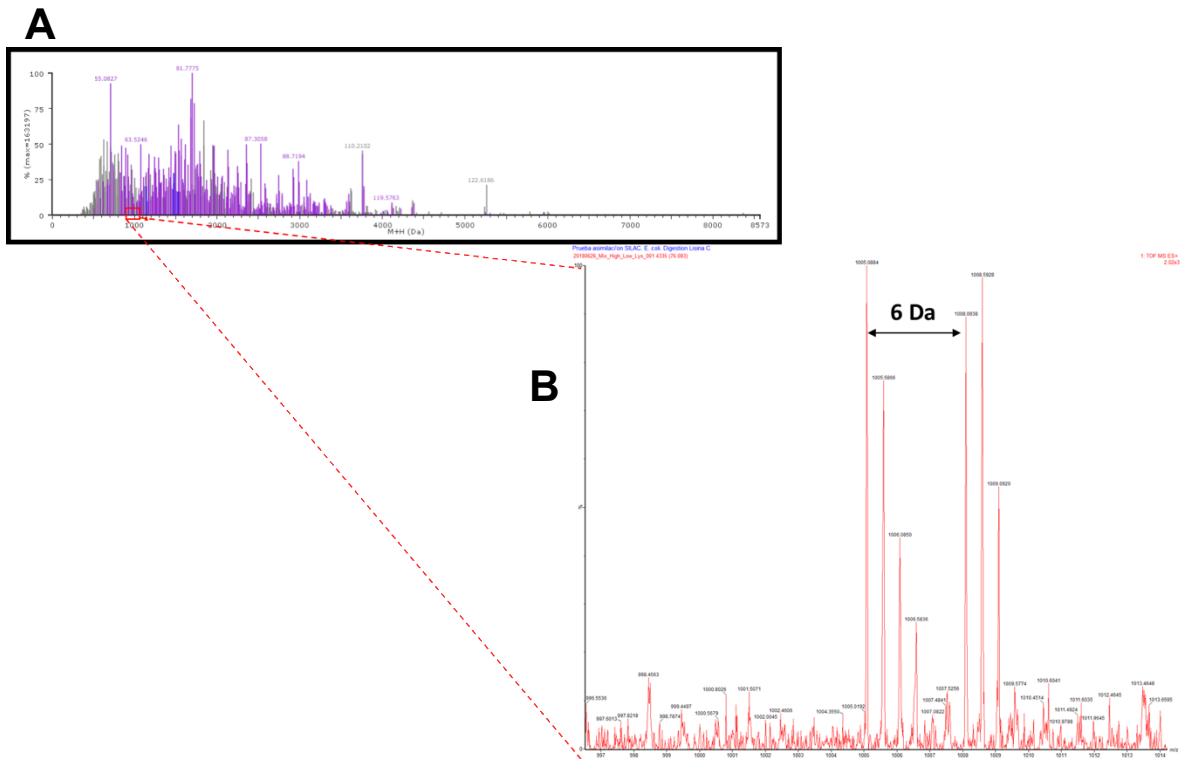


Fig. 19. EHEC EDL933 incorpora de forma eficiente isótopos de Lisina a su proteoma.

EHEC EDL933 fue crecida en medio DMEM en presencia de L-Lisina (medio ligero) o en DMEM en presencia de H-Lisina (medio pesado). Lisados totales de proteínas provenientes de EHEC EDL933 fueron reducidos, alquilados y digeridos con Lys-C. Los péptidos obtenidos provenientes de medio DMEM ligero y pesado se mezclaron en una proporción 1:1 y se analizaron por LC-HDMS^E.

La cepa EHEC EDL933 fue crecida en medio DMEM suplementado con L-Lisina/L-Arginina (medio ligero) o H-Lisina/L-Arginina (medio pesado). Las bacterias fueron incubadas durante 8 h a 37°C en agitación, a una $DO_{600}=0.005$. Después de las 8 h, se cosecharon las bacterias y se lisaron; las proteínas obtenidas fueron reducidas y alquiladas para su posterior digestión con la enzima Lys-C a 37°C durante toda la noche. Los péptidos obtenidos, provenientes del medio pesado y ligero, fueron mezclados en una proporción 1:1 y posteriormente fueron sometidos a análisis en un espectrómetro de masas SYNAPT G2-Si. Las proteínas detectadas

a través de estos análisis fueron identificadas y cuantificadas usando el *software* ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v3.0.3. Mediante este análisis, se puede observar que la mayoría de los péptidos analizados están marcados, como indican los picos en color morado en el cromatograma obtenido, los picos en color gris indican péptidos no marcados (Fig. 19A). Al realizar un acercamiento de este cromatograma, es posible identificar péptidos que contienen L-Lis (ligero) o H-Lis (pesado) a través del análisis de la relación m/z, en donde como se esperaba existe una diferencia de 6Da entre ambos péptidos, el pesado y el ligero (Fig. 19B).

Durante este análisis, se realizaron tres inyecciones independientes y los resultados permitieron calcular un promedio de las proteínas identificadas y cuantificadas para determinar la eficiencia de marcaje usando isótopos de Lisina. En promedio se identificaron 391.33 proteínas y se cuantificaron 356, obteniendo un 90.97% de eficiencia en el marcaje. Esto indica que las condiciones de cultivo que se usaron para marcar el proteoma de EHEC EDL933, son adecuadas para obtener una buena eficiencia de marcaje.

DISCUSIÓN

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) es causa importante de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (HUS) que afecta a niños y adultos. Uno de los principales factores de virulencia es la toxina de Shiga, la cual es una característica que define al serotipo EHEC O157:H7 (Croxen and Finlay, 2010; Lawson, 2004). Aunque esta bacteria posee diversos factores de virulencia, los sistemas de secreción juegan un papel vital durante el proceso infeccioso que establece este microorganismo. Particularmente, se ha demostrado que el sistema de secreción tipo III (T3SS) permite establecer contacto íntimo con la célula hospedera e inyectar una variedad de proteínas efectoras que hacen posible que la bacteria genere daño en la célula (Stevens & Frankel, 2015).

Interesantemente EHEC EDL933, que forma parte del serotipo O157:H7 no solo cuenta con el T3SS; sino que también posee T1SS, T2SS, T5SS y T6SS.

Resulta muy importante saber que para cada uno de estos sistemas de secreción existen proteínas efectoras capaces de favorecer el establecimiento del proceso infeccioso. En este trabajo, seleccionamos genes estructurales de cada sistema de secreción en EHEC EDL933 para generar mutaciones y estudiar su participación durante la infección en células epiteliales.

La baja frecuencia de recombinación en EHEC EDL933 está asociada a diversos factores

La inactivación de genes mediante recombinación homóloga fue descrita para realizar deleciones en el genoma bacteriano. Esta metodología fue originalmente desarrollada en *Escherichia coli* K-12, en donde se generaron 40 diferentes interrupciones cromosómicas sin ninguna falla (Datsenko & Wanner, 2000). Sin embargo, también ha sido usada en distintas cepas bacterianas como *Salmonella*, *Escherichia coli* enteropatógena, *Escherichia coli* enterohemorrágica entre otras (Doublet et al., 2008; Murphy & Campellone, 2003; Serapio-Palacios & Navarro-García, 2016).

En este estudio, usamos esta metodología para generar mutaciones en EHEC EDL933. EHEC EDL933 fue capaz de adquirir los genes del sistema de recombinación del bacteriófago Red λ (Exo, Beta y Gam). Sin embargo, ensayos de PCR, han demostrado que esta bacteria no fue capaz de reemplazar el gen *escN* y en su lugar insertar el gen de resistencia a kanamicina, a pesar de haber adquirido las proteínas que median la recombinación y crecer en presencia de kanamicina. Distintos factores pueden contribuir para la obtención de clones recombinantes; por ejemplo, el diseño eficaz de los oligonucleótidos. De acuerdo con la metodología publicada, para llevar a cabo la recombinación homóloga en genes bacterianos, los oligonucleótidos deben tener una extensión entre 36 a 50 bases de homología con respecto a las regiones adyacentes del gen que será inactivado (Datsenko & Wanner, 2000). En este estudio, las regiones homólogas de los oligonucleótidos diseñados varían, siendo la más pequeña de 39 bases y la más grande de 51 bases (Tabla 2). Sin embargo, el tamaño de las regiones homologas puede ser una

limitante en la obtención de clonas recombinantes. Estudios reportan que, oligonucleótidos entre 40-70 bases producen casi el mismo número de recombinantes, aunque un 60-mer o un 70-mer genera un nivel más alto. En contraste, los que oscilan entre 40-23 bases, disminuyen el rendimiento aproximadamente 20 veces (Murphy & Campellone, 2003; Sawitzke et al., 2011), por lo tanto es probable que la extensión de las regiones homólogas de nuestros oligonucleótidos no sea la adecuada y por ello no estemos obteniendo bacterias recombinantes.

Otros estudios han descrito parámetros que afectan la recombinación mediada por oligonucleótidos. Un factor crítico es la dirección de replicación del DNA de la secuencia diana; en donde el oligonucleótido de la cadena retrasada es más eficiente para la recombinación. Esta observación apoya el modelo en el que, durante la replicación del ADN, la proteína Beta alinea el oligonucleótido a la cadena complementaria retrasada (ssADN) en la horquilla de replicación. Además, si la secuencia del oligonucleótido tiene al menos una base diferente con respecto a la secuencia cromosómica, crea un desajuste, que a su vez provoca un evento de reparación mediado por el sistema de reparación dirigida por metilo (MMR, por sus siglas en inglés). La reparación de estos desajustes, reduce la recombinación entre secuencias divergentes (Costantino, 2003; Sawitzke et al., 2011). Nosotros diseñamos los oligonucleótidos en base a lo que establece la metodología, y fuimos cuidadosos al diseñarlos tomando como base el genoma secuenciado y el plásmido (pO157), también secuenciado de EHEC EDL933; por lo que es poco probable que las regiones homólogas de los oligonucleótidos tengan errores (Burland et al., 1998; Perna et al., 2001) .

Otros oligonucleótidos diseñados en este estudio fueron probados para generar las construcciones de los genes *hlyD*, *etpC* y *clpV*. Las construcciones realizadas con estos oligonucleótidos muestran haber integrado el gen de resistencia a kanamicina. Inesperadamente, los ensayos de PCR realizados posteriormente, demuestran que las clonas seleccionadas aun poseen los genes *hlyD*, *etpC* y *clpV*. Tomando en cuenta que los ensayos de PCR se realizaron a

partir de colonias que crecieron en medio suplementado con kanamicina, se considera que no todos los genes blanco pudieron recombinarse. Cuando *E. coli* crece en un medio rico en nutrientes como LB o SOC, su tiempo de división es menor que el tiempo requerido para replicar su genoma completo. Es decir, crece muy rápido e inicia rondas de replicación antes de completar la primera. Por lo tanto, cada uno de sus genes está presente en múltiples copias y solamente está representado en una sola copia justo antes de dividirse. Por lo tanto, sería lógico pensar que se requieren altas concentraciones de productos de PCR para que puedan recombinarse con más de una copia del gen que se requiere mutar. Sin embargo, esto no siempre asegura que dentro de una colonia resistente a kanamicina (en este caso), todas las bacterias sean recombinantes, ya que pueden coexistir algunas con ADN parental; debido a que las bacterias recombinantes dependen de la posición cromosómica del gen objetivo, del número de objetivos recombinados y que tan temprano ocurre la recombinación durante el ciclo celular bacteriano (Sawitzke et al., 2011; Thomason et al., 2014). En consideración a esto, nosotros hemos usado 100, 200, 600 y 800 ng de productos de PCR previamente purificados para electroporar a EHEC EDL933 en cada una de las construcciones realizadas; sin embargo, no se ha observado incremento en la generación de bacterias recombinantes bajo estas condiciones. Más bien, el éxito en la obtención de bacterias recombinantes depende de cuánto ADN ingresa a la célula después de la electroporación y de allí cuanto de este ADN se recombina en dependencia del estado de replicación de la bacteria, como se ha mencionado antes.

Algo muy importante, es el tiempo de crecimiento después de la electroporación. Tomando en cuenta que el proceso resulta muy agresivo para las bacterias, se recomienda darles un tiempo de recuperación después de la electroporación. Se ha reportado que como mínimo se requieren 30 minutos, porque se ha notado que la viabilidad de las bacterias incluso 15 minutos después de la electroporación es muy baja. Además, si se plaquean inmediatamente después de la electroporación, es muy probable que las colonias que se formen sean una mezcla de bacterias con ADN parental y recombinante. En este trabajo las bacterias se dejaron recuperando 24 horas. Los tiempos prolongados de recuperación,

tampoco son recomendados; porque si las bacterias recombinantes tienen desventaja en el crecimiento, es decir crecen más lento, por lo tanto, es posible que las pocas bacterias recombinantes se diluyan en gran medida y sea más complicado poder recuperarlas (Sawitzke et al., 2011). Esto sugiere fuertemente que, fuimos capaces de amplificar el gen de resistencia a kanamicina de un bajo porcentaje de bacterias recombinantes.

EHEC EDL933 adquiere el fenotipo mutagénico sin generar deleciones en su genoma

Como se mencionó anteriormente, este método promueve alta eficiencia de recombinación en *E. coli* K-12. Al comparar la eficiencia de recombinación para generar mutantes en el locus *lacZ* entre *E. coli* K-12 y EHEC, se encontró que la frecuencia de recombinación de EHEC es de $0.7-6 \times 10^{-6}$ en comparación con *E. coli* K-12, en donde la frecuencia de bacterias recombinantes es de 10^{-4} por bacterias que sobreviven después de la electroporación. En consideración a esto, se estima que el sistema Red λ , produce bacterias recombinantes con menor eficiencia en EHEC con respecto a *E. coli* K-12 (Murphy & Campellone, 2003). Nosotros realizamos el mismo procedimiento para la construcción de la mutante en el gen *virK*. Para esta construcción, también se seleccionaron clonas que crecieron en presencia de kanamicina. Sin embargo, los ensayos de PCR demuestran que no integraron la resistencia a kanamicina, y al comprobar por PCR la presencia de *virK*, se observó que estas clonas aun contenían este gen. Tomando en cuenta que, el gen de resistencia a kanamicina proviene de la amplificación por PCR usando un plásmido como templado (pKD4), es muy probable que los productos de PCR usados para electroporar a EHEC EDL933 estuviesen contaminados con trazas de pKD4; lo cual transformó de forma muy eficiente a las bacterias produciendo un fondo no deseado (Thomason et al., 2014). Para que la recombinación homóloga funcione, un aspecto importante es la expresión de la recombinasa. En este estudio, se usó un vector inducible con arabinosa, pKD46, para la expresión de las proteínas de recombinación Red λ . A partir de esto, es necesario considerar el tiempo

adecuado de inducción para obtener el mejor rendimiento de proteínas que medien la recombinación, nosotros inducimos a EHEC EDL933 (*rec+*), durante 4 h; en consideración a que, con este tiempo se han podido generar bacterias recombinantes en otros ensayos. En contraste, se ha observado que cuando se induce la expresión de la recombinasa por períodos prolongados, las bacterias adquieren fenotipo mutagénico, es decir, adquieren resistencia al antibiótico usado para seleccionar a las bacterias recombinantes. Esto se correlaciona con nuestros resultados, en donde a pesar de que obtenemos clonas con fenotipo mutagénico, es decir, son resistentes a kanamicina, estas aun expresan los genes que deseamos mutar. Por lo tanto, para mejorar la eficiencia de esta metodología en EHEC EDL933, es importante limitar la expresión de las proteínas del sistema Red λ , en un período en que favorezca la recombinación y, mejorar el proceso de purificación de los productos de PCR usados para electroporar a EHEC EDL933, para evitar falsos positivos debido a contaminación con plásmido pKD4 (Murphy & Campellone, 2003).

Adicionalmente, trabajos previos han reportado baja eficiencia en la obtención de mutantes para la cepa EHEC O157:H7 Sakai, empleando el sistema de recombinación homóloga Red λ (Lee et al., 2009). Ahora bien, aunque nosotros en este trabajo estemos usando la cepa EHEC EDL933, sabemos que ambas cepas pertenecen al mismo serotipo y que comparten muchas características genotípicas y fenotípicas; de ahí que se considere necesario valorar todos los posibles factores que contribuyen a la baja obtención de bacterias recombinantes, y de esta manera optimizar todo el procedimiento que hemos llevado a cabo para generar estas construcciones para aumentar la eficiencia de recombinación.

El sistema de recombinación homóloga red λ funciona eficientemente durante el crecimiento logarítmico de las bacterias

La fase de crecimiento bacteriano, la expresión de la recombinasa red λ y el tiempo de recuperación de las bacterias, son tres factores muy importantes que fueron

modificados en la metodología para generar bacterias mutantes mediante recombinación homóloga.

Durante la fase logarítmica existen múltiples horquillas de replicación que favorecen el proceso de recombinación mediado por el sistema Red λ . De acuerdo con esto, para favorecer la recombinación es importante usar cultivos bacterianos en fase logarítmica, los cuales oscilan en una DO entre 0.5-0.7 (Thomason et al., 2014). Nuestros resultados demuestran que es posible aumentar la eficiencia del sistema Red λ usando bacterias en fase logarítmica.

Por otro lado, la expresión de la recombinasa es muy importante ya que media el proceso de recombinación (Datsenko & Wanner, 2000). Tomando en cuenta que durante este trabajo se usó el vector pKD46, que expresa la recombinasa red λ bajo el control de un promotor inducible con arabinosa, es relevante indicar que al aumentar la cantidad de este inductor se obtuvieron mejores resultados.

Por otra parte, aunque durante la fase logarítmica, existen múltiples copias del cromosoma bacteriano, la recombinación muchas veces está restringida a una de ellas, y en el caso de los productos de PCR recombinantes, a una cadena de cada copia cromosómica. Así que, durante el crecimiento de las bacterias, las copias de ADN presentes en la recombinación se segregan entre sí, separando las copias del ADN recombinado de las no recombinadas. Por lo cual es necesario considerar un tiempo apropiado de crecimiento bacteriano, para obtener colonias recombinantes puras. En ciertas situaciones el tiempo de recuperación de las bacterias es muy importante; por ejemplo, cuando se usan genes de resistencia a antibióticos para sustituir el gen que se requiere eliminar. En estos casos, el gen de resistencia debe ser expresado antes de que la bacteria que lo posee sea retada con el antibiótico. Se recomiendan 2 o 3 h de crecimiento en ausencia del antibiótico de selección, este tiempo es suficiente para la expresión del gen de resistencia (Sawitzke et al., 2007). En consideración a esto, las bacterias fueron mantenidas 3 h para su recuperación después de la electroporación y posteriormente fueron inoculadas en medio suplementado con kanamicina. Bajo estas condiciones, se obtuvo mayor éxito debido a que todas las clonas seleccionadas eliminaron el gen

clpV. De acuerdo con esto, si se usan bacterias en fase logarítmica para la transformación, si se aumenta la cantidad de arabinosa y si después de la electroporación las bacterias se recuperan por 3 h, es posible obtener bacterias mutantes a partir del sistema de recombinación red λ .

EHEC EDL933 es capaz de incorporar isótopos de lisina en su proteoma

El estudio de los sistemas de secreción se lleva a cabo a nivel de proteínas, a partir de las cuales se puede analizar el mecanismo usado por las bacterias para generar daño en la célula. Ahora bien, la producción de proteínas implica un proceso metabólico esencial en células eucariotas y procariontas. La técnica SILAC, depende de la síntesis de proteínas en donde los aminoácidos son los bloques de construcción más importantes para que se generen estas biomoléculas. Tomando en cuenta esto, nosotros adaptamos la técnica SILAC para marcar el proteoma de EHEC EDL933.

En algunos casos, es necesario generar bacterias mutantes para la síntesis de un aminoácido específico, debido al potencial metabólico que tienen estos microorganismos para sintetizar aminoácidos a partir de otros preexistentes. Por lo tanto, un aspecto crítico en el diseño de los experimentos con SILAC aplicado a bacterias, es asegurarse que el aminoácido seleccionado se incorpore completamente y que el microorganismo no sea capaz de sintetizarlo (Soufi & Macek, 2014). Interesantemente, encontramos que esta bacteria incorpora con buena eficiencia los isótopos de lisina, como se observó a partir del análisis por espectrometría de masas. Esto es muy importante, ya que estos resultados permiten comprobar que las condiciones de crecimiento y el aminoácido seleccionado para marcar el proteoma de EHEC EDL933 funcionan adecuadamente.

Por otra parte, no existen diferencias entre los isótopos de aminoácidos usados durante el proceso de marcaje, excepto su composición isotópica, lo cual genera las diferencias de peso en las proteínas. Por lo tanto, es posible realizar comparaciones entre las poblaciones bacterianas crecidas con distinto isótopo,

debido a que ambas poblaciones conservan las mismas propiedades celulares y bioquímicas (Lanucara & Eyers, 2011; Mann, 2006). Estos datos son consistentes con los nuestros, los cuales demuestran que si crecemos a EHEC EDL933 en presencia de lisina ligera (L-Lis) o Lisina pesada (H-Lis), el patrón general de expresión de proteínas es el mismo, como se observó al comparar la expresión de proteínas por electroforesis SDS-PAGE. Así mismo, la expresión de proteínas del T3SS, Tir (proteína efectora) y EspA (proteína translocadora), se mantiene constante en presencia de L-Lis y H-Lis. Esto permite deducir, que EHEC EDL933 usa de forma indistinta ambos isótopos de lisina para producir sus proteínas y que, por lo tanto, su proteoma no será afectado cuando esta bacteria crezca en presencia de estos isótopos.

Además, esta técnica ofrece muchas ventajas para el estudio de proteínas, gracias a que está acoplada al análisis por espectrometría de masas. Esto es muy importante si tomamos en cuenta la complejidad de las muestras que se requieren analizar y la baja abundancia de algunas proteínas, lo cual requiere una técnica analítica altamente sensible (Aebersold & Mann, 2003). Usando el análisis por espectrometría de masas, se observó clara diferencia en la masa de los péptidos ligeros y pesados; permitiendo la identificación y cuantificación de proteínas en EHEC EDL933. Esto comprueba una vez más que, la diferencia en el peso de las proteínas generadas al usar $^{13}\text{C}_6$ -Lisina para llevar a cabo el marcaje metabólico, puede ser identificada a través del análisis por espectrometría de masas y, por lo tanto, las proteínas de los sistemas de secreción de EHEC EDL933, podrán ser identificadas y cuantificadas usando esta metodología.

CONCLUSIONES

1. Los resultados de este estudio indican que la eficiencia de recombinación es muy baja en EHEC EDL933.
2. EHEC EDL933 es capaz de retener las secuencias lineales que contienen la resistencia a kanamicina sin que ocurra el proceso de recombinación homóloga para generar mutaciones en su genoma.

3. Las bacterias EHEC EDL933 en fase logarítmica, el aumento de inductor para la expresión de las proteínas de recombinación y el tiempo de recuperación (3 h) después de la electroporación son factores que generan mayor eficiencia en el proceso de recombinación homóloga.
4. EHEC EDL933 es capaz de incorporar isótopos de lisina y por lo tanto la técnica SILAC puede usarse para marcar el proteoma de esta bacteria.
5. Los isótopos pesados de lisina no alteran la expresión de proteínas en EHEC EDL933.
6. Los resultados de este trabajo demuestran que los isótopos de lisina generan cambios de masa en las proteínas de EHEC EDL933, lo cual permite su identificación y cuantificación por espectrometría de masas.

PERSPECTIVAS

En esta tesis, mostramos que a través de la técnica de recombinación homóloga fue posible inactivar el gen *clpV* en EHEC EDL933. Tomando en consideración los factores que influyen en el éxito de la recombinación homóloga, es necesario utilizar bacterias en fase logarítmica, modificar la cantidad de inductor de las proteínas de recombinación (Gam, Exo y Beta) y el tiempo de recuperación de las bacterias después de la electroporación, para obtener bacterias mutantes. Como una alternativa para inactivar varios genes en EHEC EDL933, se ha considerado usar la herramienta de edición genómica CRISPR/Cas9, solo si no es posible obtenerlas mediante recombinación homóloga.

Los datos obtenidos durante este trabajo muestran que la técnica SILAC puede aplicarse para marcar el proteoma de EHEC EDL933 debido a la incorporación eficiente de los isótopos de lisina. Por lo tanto, SILAC puede utilizarse para marcar el proteoma de las cepas EHEC EDL933 mutantes en los diferentes sistemas de secreción, para estudiar la dinámica de expresión de estos al hacer comparaciones entre cada una de las mutantes y la cepa silvestre.

Las funciones del sistema de secreción tipo VI (T6SS) son muy interesantes, puesto que este es usado para inyectar proteínas efectoras hacia células eucariotas y procariontas. Este sistema se ha reportado recientemente en EHEC EDL933, en donde además se describió una proteína efectora que promueve la sobrevivencia de esta bacteria bajo condiciones de estrés oxidativo (Wan et al., 2017). Esto nos lleva a pensar que través este sistema, EHEC EDL933 puede estar secretando otras proteínas efectoras que pueden tener múltiples funciones. Por lo tanto, estudiar este sistema de secreción es muy importante para buscar nuevas proteínas efectoras que participen y favorezcan la infección de EHEC EDL933 en células epiteliales.

Se ha reportado que la expresión de los sistemas de secreción se encuentra regulada a nivel génico (Mellies et al., 1999). Por lo tanto, es necesario encontrar condiciones de cultivo que favorezcan la expresión de los sistemas de secreción en EHEC EDL933 para hacer posible su estudio desde el punto de vista proteómico.

REFERENCIAS

- Aebersold, R., and Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198.
- Bielaszewska, M., Aldick, T., Bauwens, A., and Karch, H. (2014). Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: structure, transport, biological activity and putative role in virulence. *International Journal of Medical Microbiology* 304, 521-529.
- Bielaszewska, M., Rüter, C., Kunsmann, L., Greune, L., Bauwens, A., Zhang, W., Kuczius, T., Kim, K.S., Mellmann, A., and Schmidt, M.A. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis. *PLoS pathogens* 9, e1003797.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

- Burland, V., Shao, Y., Perna, N.T., Plunkett, G., Blattner, F.R., and Sofia, H.J. (1998). The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157: H7. *Nucleic acids research* 26, 4196-4204.
- Cianfanelli, F.R., Monlezun, L., and Coulthurst, S.J. (2016). Aim, load, fire: the type VI secretion system, a bacterial nanoweapon. *Trends in microbiology* 24, 51-62.
- Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology* 13, 343.
- Costantino, N. (2003). Enhanced levels of λ Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 15748-15753.
- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 8, 26.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., and Finlay, B.B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 26, 822-880.
- Chen, X., Wei, S., Ji, Y., Guo, X., and Yang, F. (2015). Quantitative proteomics using SILAC: principles, applications, and developments. *Proteomics* 15, 3175-3192.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6640-6645.
- Doublet, B., Douard, G., Targant, H., Meunier, D., Madec, J.-Y., and Cloeckert, A. (2008). Antibiotic marker modifications of λ Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *Journal of microbiological methods* 75, 359-361.
- Douzi, B., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2012). On the path to uncover the bacterial type II secretion system. *Phil Trans R Soc B* 367, 1059-1072.
- Fan, E., Chauhan, N., Udatha, D.B., Leo, J.C., and Linke, D. (2016). Type V Secretion Systems in Bacteria. *Microbiology spectrum* 4.
- Gentschev, I., Dietrich, G., and Goebel, W. (2002). The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends in microbiology* 10, 39-45.

- Green, E.R., and Mecsas, J. (2016). Bacterial secretion systems—an overview. *Microbiology spectrum* 4.
- Grys, T.E., Walters, L.L., and Welch, R.A. (2006). Characterization of the StcE protease activity of *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of bacteriology* 188, 4646-4653.
- Guerrero-Mandujano, A., Hernández-Cortez, C., Antonio Ibarra, J., and Castro-Escarpulli, G. (2017). The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic*.
- Ho, B.T., Dong, T.G., and Mekalanos, J.J. (2014). A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell host & microbe* 15, 9-21.
- Ho, T.D., Davis, B.M., Ritchie, J.M., and Waldor, M.K. (2008). Type 2 secretion promotes enterohemorrhagic *Escherichia coli* adherence and intestinal colonization. *Infection and immunity* 76, 1858-1865.
- Izore, T., Job, V., and Dessen, A. (2011). Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure* 19, 603-612.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews Microbiology* 2, 123-140.
- Korotkov, K.V., Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology* 10, 336.
- Kuo, K.H.M., Khan, S., Rand, M.L., Mian, H.S., Brnjac, E., Sandercock, L.E., Akula, I., Julien, J.-P., Pai, E.F., and Chesney, A.E. (2016). EspP, an Extracellular Serine Protease from Enterohemorrhagic *E. coli*, Reduces Coagulation Factor Activities, Reduces Clot Strength, and Promotes Clot Lysis. *PloS one* 11, e0149830.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227, 680.
- Lanucara, F., and Eyers, C.E. (2011). Mass spectrometric-based quantitative proteomics using SILAC. In *Methods in enzymology* (Elsevier), pp. 133-150.
- Lawson, J.M. (2004). Update on *Escherichia coli* O157: H7. *Current gastroenterology reports* 6, 297-301.

- Lee, D.J., Bingle, L.E.H., Heurlier, K., Pallen, M.J., Penn, C.W., Busby, S.J.W., and Hobman, J.L. (2009). Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC microbiology* 9, 252.
- Mann, M. (2006). Innovations: Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 952.
- McWilliams, B.D., and Torres, A.G. (2014). EHEC adhesins. *Microbiology spectrum* 2, EHEC-0003.
- Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1999). The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Molecular microbiology* 33, 296-306.
- Murphy, K.C., and Campellone, K.G. (2003). Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *BMC molecular biology* 4, 11.
- Navarro-Garcia, F., Ruiz-Perez, F., Larzábal, M., and Cataldi, A. (2016). Secretion Systems of Pathogenic *Escherichia coli*. In *Escherichia coli in the Americas* (Springer), pp. 221-249.
- Navarro-Garcia, F., Serapio-Palacios, A., Ugalde-Silva, P., Tapia-Pastrana, G., and Chavez-Deñás, L. (2013). Actin cytoskeleton manipulation by effector proteins secreted by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *BioMed research international* 2013.
- Ong, S.-E., and Mann, M. (2006). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nature protocols* 1, 2650.
- Perna, N.T., Plunkett lii, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., and Kirkpatrick, H.A. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Nature* 409, 529.
- Portaliou, A.G., Tsolis, K.C., Loos, M.S., Zorzini, V., and Economou, A. (2016). Type III secretion: building and operating a remarkable nanomachine. *Trends in biochemical sciences* 41, 175-189.
- Sana, T.G., Lugo, K.A., and Monack, D.M. (2017). T6SS: The bacterial "fight club" in the host gut. *PLoS pathogens* 13, e1006325.

- Sawitzke, J.A., Costantino, N., Li, X.-t., Thomason, L.C., and Bubunencko, M. (2011). Probing cellular processes with oligo-mediated recombination and using the knowledge gained to optimize recombineering. *Journal of molecular biology* 407, 45-59.
- Sawitzke, J.A., Thomason, L.C., Costantino, N., Bubunencko, M., and Datta, S. (2007). Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. *Methods in enzymology* 421, 171-199.
- Serapio-Palacios, A., and Navarro-Garcia, F. (2016). EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, causes apoptosis and necrosis through caspase and calpain activation, including direct procaspase-3 cleavage. *MBio* 7, e00479-00416.
- Soufi, B., and Macek, B. (2014). Stable isotope labeling by amino acids applied to bacterial cell culture. In *Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)* (Springer), pp. 9-22.
- Sperandio, V., and Nguyen, Y. (2012). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, 90.
- Stevens, M.P., and Frankel, G.M. (2015). The locus of enterocyte effacement and associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E coli* (American Society of Microbiology), pp. 131-155.
- Tapia-Pastrana, G., Chavez-Dueñas, L., Lanz-Mendoza, H., Teter, K., and Navarro-Garcia, F. (2012). VirK is a Periplasmic Protein Required for Efficient Secretion of Pet from Enteroaggregative *E. coli*. *Infection and immunity*, IAI-00167.
- Thomason, L.C., Sawitzke, J.A., Li, X., Costantino, N., and Court, D.L. (2014). Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Current protocols in molecular biology* 106, 1-16.
- Wan, B., Zhang, Q., Ni, J., Li, S., Wen, D., Li, J., Xiao, H., He, P., Ou, H.-y., and Tao, J. (2017). Type VI secretion system contributes to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS). *PLoS pathogens* 13, e1006246.

Tabla 1. Sistemas de secreción y efectores de EHEC O157:H7

Efactor	Origen	Serotipo	Función	Sistema de secreción	Referencia ^a
Enterohemolisina (Ehx)	Plásmido pO157	O157:H7 EDL933	Toxina formadora de poros que media el fenotipo enterohemolítico	I	1
Metaloproteinasa de Zinc (stcE)	pO157	O157:H7 EDL933	Escinde el inhibidor de esterasa C1 (C1-INH), miembro de la familia de inhibidores de serín-proteasas, importante para la escisión de algunas glicoproteínas	II	2
YodA	Cromosoma	O157:H7 EDL933	Proteína de unión a iones metálicos como cadmio y zinc. Participa en el mantenimiento de la homeostasis de zinc	II	3-5
Tir	LEE	O157:H7	Receptor de intimina	III	6,7
EspA	LEE	O157:H7	Forma un filamento entre la bacteria y la célula hospedera para la translocación de proteínas efectoras	III	8
EspB	LEE	O157:H7	Participa con EspD en la formación del poro de translocación de efectores, sobre la membrana de la célula hospedera. Además, se une a los dominios de unión a actina de proteínas de la familia Miosina, evitando el cierre del fagosoma	III	9,10
EspD	LEE	O157:H7 EDL933	Adhesina, requerida para la fijación eficiente de EHEC a su célula diana	III	11,12
EspFu	No LEE Profago Crítico (CP-933U TccP)	O157:H7	Recluta y activa N-WASP; dirigiendo la polimerización de actina dependiente de Arp 2/3	III	6,7
EspL2	Profago	O157:H7	Interactúa con Anexina 2 e induce la condensación de los filamentos de actina, permitiendo la formación de colonias bacterianas y de estructuras tipo pseudópodos	III	13
EspF	LEE	O157:H7	Disfunción de la barrera epitelial, antifagocitosis, remodelación de la membrana celular hospedera, ruptura del núcleo, disfunción mitocondrial	III	14
EspG/EspG2	LEE	O157:H7	Asociación a tubulina y ruptura de microtúbulos bajo la zona de adherencia de la bacteria, bloquea la señalización ARF GTPasa y estimula PAKs para inhibir el tráfico endomembranas. Interactúa con GTPasas pequeñas ARF6 y Rab35 durante la infección	III	15

EspH	LEE	O157:H7	Inhibe la formación de filopodios y potencia la formación de pedestales de actina	III	16
EspJ	No LEE	O157:H7	Inhibe la transfagocitosis mediada por FcγR y CR3	III	17
EspK	No LEE Profago críptico CP- 933N (Isla-O 50)	O157:H7 EDL933	No afecta la adherencia de EHEC, ni en la nucleación de actina, aunque sí afecta la persistencia de EHEC en el intestino	III	18
EspN	No LEE	O157:H7	Desconocida	IIII	19
EspM	No LEE	O157:H7	Actividad Rho GEF, participa en la activación de RhoA, formación de pedestales y cambios en la localización de TJ	III	20,21
EspO1-1	No LEE	O157:H7	Estabiliza FA evitando el desprendimiento de enterocitos infectados	III	20
Esp O1-2	No LEE	O157:H7	Interactúa con EspM2 para modular la actividad de RhoA en la célula huésped	III	20
EspR		O157:H7	Desconocida	III	
EspV	No LEE	O157:H7	Altera la morfología celular, induce drásticas alteraciones morfológicas caracterizadas por condensación nuclear, redondeamiento celular y formación de proyecciones (tipo dentritas)	III	22
EspW	No LEE	O157:H7	Interactúa con Kif15 en el sitio de fijación bacteriano, activando Rac1, modificando el citoesqueleto de actina esencial para mantener la forma de la célula durante la infección.	III	23
EspX		O157:H7	Desconocida	III	19
EspY		O157:H7	Desconocida	III	19
EspZ	LEE	O157:H7	Potencia la señalización de β1integrina y FAK para inhibir apoptosis y citotoxicidad celular	III	24,25
Map	LEE	O157:H7	GEF-Cdc42 que induce la formación transitoria de filopodios, ruptura mitocondrial, inactivación de SGLT-1, ruptura de TJ	III	26
NleA/EspI	No LEE	O157:H7	Inhibe el tráfico de proteínas integrales de membrana, proteínas destinadas para secreción o proteínas que serán distribuidas hacia otros compartimentos celulares, ruptura de TJ	III	27
NleB	No LEE	O157:H7	Inhibe activación de NF-kB inducida por TNF-α	III	28,29
NleC	No LEE	O157:H7	Metaloproteasa que escinde p65 (RelA),c-Rel, p50 e IκB, para inhibir la activación de NF-kB	III	29
NleD	No LEE	O157:H7	Metaloproteasa que escinde JNK para inhibir la activación de AP-1	III	29
NleE	No LEE	O157:H7	Bloquea la degradación de IκB para inhibir la activación de NF-kB	III	29
NleF	No LEE	O157:H7	Inhibidor de apoptosis y de la activación de caspasas. Se une al receptor para COPI-vesículas, Tmp21, retardando la secreción de proteínas	III	30

NleG/NleI	No LEE	O157:H7	E3 ubiquitin ligasas análogo a enzimas eucariotas RING-finger y U-box	III	31
NleH	No LEE	O157:H7	Une al inhibidor 1 de Bax para bloquear apoptosis, secuestra RPS3 para inhibir la señalización NF-kB	III	29
NleL (EspX7)	No LEE (Profago Sp6)	O157:H7	E3 ubiquitin-ligasa que modula la formación de pedestales	III	32
Serin proteasa (espP)	pO157	O157:H7	Esp P es capaz de escindir pepsina A y el factor de coagulación V; la degradación de este factor de coagulación puede contribuir a la hemorragia mucosa. Efecto citopático	Va (SPATE)	33
EhaA (adhesina)	Isla O	O157:H7 EDL933	Induce la agregación celular para la formación de biofilm a través de interacciones EhaA-EhaA	Va (AIDA)	34
EhaB		O157:H7 EDL933	Induce la formación de biofilm; pero interactúa con proteínas de ECM como colágeno y laminina	Va (AIDA)	34
EhaC		O157:H7 EDL933	Participa en la colonización	Va (AIDA)	34
EhaD		O157:H7 EDL933	Adhesión, colonización y formación de biofilm	Va (AIDA)	34
EhaG (Miembro de las adhesinas autotransportadoras trimericas)		O157:H7 EDL933	Adhesina (epitelo colorectal) que media la formación de biofilm, agregación celular. Se adhiere a laminina, fibronectina, fibrinógeno y colágenos tipo I, II, III y V.	Vc	35
UpaG EhaJ		O157:H7 EDL933	Proteína AT glicosilada que media la adherencia a nivel de proteínas de ECM Glicosilación parece ser importante para la formación de biofilm, pero no para la adhesión a ECM	Va (AIDA)	36
Homólogo del antígeno de unión a calcio 43 (Cah)	Isla O	O157:H7 EDL933	Causa autoagregación bacteriana y es capaz de unirse a Ca ²⁺ en solución. Podría participar en la adhesión	Va	34
Intimina	LEE (eae)	O157:H7		Ve	19
KatN (catalasa-Mn)	Cromosoma	O157:H7	Decrementa el nivel de ROS de células hospederas, para facilitar la sobrevivencia de EHEC en células fagocíticas	VI	37

^aReferencias de la tabla:

1. Bielaszewska, M., et al., Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: structure, transport, biological activity and putative role in virulence. *Int J Med Microbiol*, 2014. 304(5-6): p. 521-9. Gryns, T.E., et al., The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun*, 2005. 73(3): p. 1295-303.

2. Ho, T.D., et al., Type 2 secretion promotes enterohemorrhagic *Escherichia coli* adherence and intestinal colonization. *Infect Immun*, 2008. 76(5): p. 1858-65.
3. Korotkov, K.V. and W.G. Hol, Crystal structure of the pilotin from the enterohemorrhagic *Escherichia coli* type II secretion system. *J Struct Biol*, 2013. 182(2): p. 186-91.
4. Lim, J., et al., YkgM and ZinT proteins are required for maintaining intracellular zinc concentration and producing curli in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 under zinc deficient conditions. *Int J Food Microbiol*, 2011. 149(2): p. 159-70.
5. Vingadassalom, D., et al., Insulin receptor tyrosine kinase substrate links the *E. coli* O157:H7 actin assembly effectors Tir and EspF(U) during pedestal formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(16): p. 6754-9
6. Weiss, S.M., et al., IRSp53 links the enterohemorrhagic *E. coli* effectors Tir and EspFU for actin pedestal formation. *Cell Host Microbe*, 2009. 5(3): p. 244-58.
7. Sharma, V.K., et al., Contributions of EspA Filaments and Curli Fimbriae in Cellular Adherence and Biofilm Formation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS One*, 2016. 11(2): p. e0149745.
8. Wong, A.R.C., et al., Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Molecular microbiology*, 2011. 80(6): p. 1420-1438.
9. Hamaguchi, M., et al., Molecular basis of actin reorganization promoted by binding of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* EspB to alpha-catenin. *FEBS J*, 2008. 275(24): p. 62607.
10. Kresse, A. U., et al., The EspD protein of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. *Infection and immunity*, 1999. 67(9): p. 4834-4842.
11. Wachter, C., et al, Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 1999. 31(6): p. 1695-1707.
12. Tobe, T., Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: role of EspL2 in adherence and an alternative pathway for modulating cytoskeleton through Annexin A2 function. *FEBS J*, 2010. 277(11): p. 2403-8.

13. Zhao, S., et al., The N-terminal domain of EspF induces host cell apoptosis after infection with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. PLoS One, 2013. 8(1): p. e55164.
14. Furniss, R.C., et al., Enterohaemorrhagic *E. coli* modulates an ARF6:Rab35 signaling axis to prevent recycling endosome maturation during infection. J Mol Biol, 2016. 428(17): p. 3399-407.
15. Wong, A.R., et al., The enteropathogenic *E. coli* effector EspH promotes actin pedestal formation and elongation via WASP-interacting protein (WIP). Cell Microbiol, 2012. 14(7): p. 1051-70.
16. Wong, A.R., et al., Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. Mol Microbiol, 2011. 80(6): p. 1420-38
17. Vlisidou, I., et al., Identification and characterization of EspK, a type III secreted effector protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. FEMS Microbiol Lett, 2006. 263(1): p. 32-40.
18. Stevens, M. P., & Frankel, G. M., The locus of enterocyte effacement and associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli*. American Society of Microbiology, 2015. pp: 131-155
19. Morita-Ishihara, T., et al., EspO1-2 regulates EspM2-mediated RhoA activity to stabilize formation of focal adhesions in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected host cells. PLoS One, 2013. 8(2): p. e55960.
20. Arbeloa, A., et al., Distribution of espM and espT among enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. J Med Microbiol, 2009. 58(Pt 8): p. 988-95.
21. Arbeloa, A., et al., Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* type III secretion effector EspV induces radical morphological changes in eukaryotic cells. Infect Immun, 2011. 79(3): p. 1067-76.
22. Sandu, P., et al., The enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effector EspW triggers actin remodeling in a Rac1 dependent manner. Infect Immun, 2017.
23. Berger, C.N., et al., EspZ of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* regulates type III secretion system protein translocation. MBio, 2012. 3(5).
24. Shames, S.R., et al., The pathogenic *E. coli* type III effector EspZ interacts with host CD98 and facilitates host cell prosurvival signalling. Cell Microbiol, 2010. 12(9): p. 1322-39.

25. Ugalde-Silva, P., O. Gonzalez-Lugo, and F. Navarro-Garcia, Tight Junction Disruption Induced by Type 3 Secretion System Effectors Injected by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016. 6: p. 87
26. Wells, T.J., et al., The *Escherichia coli* O157: H7 EhaB autotransporter protein binds to laminin and collagen I and induces a serum IgA response in O157: H7 challenged cattle. *Environmental microbiology*, 2009. 11(7): p. 1803-1814.
27. Gao, X., et al., NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF-kappaB activation. *Cell Host Microbe*, 2013. 13(1): p. 87-99.
28. Paton, A.W., et al., Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* strains that Are virulent for humans. *infection and immunity*, 2001. 69(11): p. 6999-7009.
29. Song, T., et al., A Type III Effector NleF from EHEC Inhibits epithelial inflammatory cell death by targeting caspase-4. *Biomed Res Int*. 2017: p. 4101745.
30. Wu, B., et al., NleG type 3 effectors from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* are U-Box E3 ubiquitin ligases. *PLoS Pathog*, 2010. 6(6): p. e1000960.
31. Piscatelli, H., et al., The EHEC type III effector NleL is an E3 ubiquitin ligase that modulates pedestal formation. *PLoS One*, 2011. 6(4): p. e19331.
32. Kuo, K.H., et al., EspP, an extracellular serine protease from Enterohemorrhagic *E. coli*, Reduces Coagulation Factor Activities, Reduces Clot Strength, and Promotes Clot Lysis. *PLoS One*, 2016. 11(3): p. e0149830.
33. McWilliams, B. D., & Torres, A. G. EHEC adhesins. *Microbiology spectrum*, 2014. 2(2).
34. Totsika, M., et al., Molecular characterization of the EhaG and UpaG trimeric autotransporter proteins from pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2012. 78(7): p. 2179-89.
35. Easton, D.M., et al., Characterization of EhaJ, a new autotransporter protein from enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 2011. 2: p. 120.
36. Wan, B., et al., Type VI secretion system contributes to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS). *PLoS Pathog*, 2017. 13(3): p. e1006246.