



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Exploración del papel de las proteínas con dominio SPFH en la formación de balsas lipídicas y patogénesis en *Pseudomonas aeruginosa*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Rodolfo Emilio Herrera Ruiz

TUTOR PRINCIPAL

Adrián Fernando Álvarez
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Rodolfo García Contreras
[Facultad de Medicina](#)

Luis Servín González
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Enero, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en el laboratorio 226-Norte bajo la tutoría del Dr. Adrián F. Álvarez, con el que estoy especialmente agradecido no sólo por haberme guiado a lo largo de este trabajo, sino por haberme enseñado a ser profesional en el laboratorio.

Agradezco la asesoría del Dr. Dimitris Georgellis, quien siempre estuvo al pendiente de mi desarrollo en el laboratorio y con el que siempre pude contar para cualquier duda. Ambos constantemente me empujaron adelante.

Agradezco el apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo de tesis a la M en C. Claudia Rodríguez Rangel, ya que sin su dedicada atención, tanto al laboratorio como en apoyo de mis experimentos, no habría llegado a los mismos resultados.

Agradezco a los doctores Luis Servín González y Rodolfo García Contreras, miembros de mi comité tutor, por sus enriquecedoras discusiones y comentarios a lo largo del desarrollo de mi tesis. Le doy las gracias al Dr. Rodolfo y sus alumnas por haberme enseñado a trabajar con *Galleria mellonella* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Agradezco a la Dra. Gloria Soberón y a su alumno, Dr. Uriel Gutiérrez, por enseñarme a mutar a *P. aeruginosa* y por los plásmidos que amablemente nos proporcionaron para realizarlo.

Le doy las gracias a los doctores José Luis Puente García, María Soledad Funes Argüello, Sebastián Poggio Ghilarducci, Xóchitl Pérez Martínez y Liliana Pardo López, miembros del jurado de examen, por sus valiosos comentarios, que me impulsaron a entender mejor mis resultados, y a plantear más claramente las ideas de esta tesis.

Finalmente, estoy muy agradecido con mis compañeros de laboratorio por las innumerables veces que me ayudaron con mis dudas o con mis experimentos.

Agradezco el apoyo económico brindado a los proyectos:

- “Control de la expresión génica microbiana por estímulos extracelulares”. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN209918.
- “Organización y función de microdominios membranales bacterianos”. De la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN208718.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de Beca de Maestría, #785056

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Le doy las gracias sobre todo a mis padres, Xóchitl y Humberto, porque me han apoyado a lo largo de toda mi carrera, porque siempre he podido contar con ellos y por el infinito cariño que me han otorgado. Agradezco muchísimo a mi hermana, Ixchel, por todos los años que me apoyó y que tan bien pasamos, junto con mi sobrina, Natalia, cuando viví con ellas mientras cursaba mi licenciatura y mi maestría. Estoy muy agradecido con mi hermano, Leonardo, porque aunque no nos vimos tan seguido estos años, nunca dudó en extenderme la mano cuando le pedí ayuda, y por el tiempo ameno que he pasado con su familia. Finalmente, le agradezco a mis amigos cercanos Aranza, Daniela, Andrea, Mariana, David, Fernando, Alfredo, Raúl, Ángel y Freddy por sus ya largas amistades, en las que me han dado grandes lecciones y tiempos inolvidables.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	6	
Resumen	7	
Introducción y antecedentes		
La membrana celular	9	
La heterogeneidad de la membrana y las balsas lipídicas	10	
Las proteínas con dominio SPFH	15	
Microdominios membranales funcionales en bacterias	19	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	26	
Hipótesis		30
Objetivo general	30	
Objetivos particulares	30	
Resultados y discusión		
1. Búsqueda de homólogos de las proteínas con dominio SPFH de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> codificados en el genoma de <i>P. aeruginosa</i>	31	
2. Disponibilidad de cepas con interrupciones en genes que codifican proteínas con dominio SPFH	32	
3. Curvas de crecimiento	33	
4. Medición de las actividades de proteasa alcalina y elastasa	34	
5. Supervivencia de <i>Galleria mellonella</i>	36	
6. Construcción de vectores para transformar a <i>P. aeruginosa</i>	37	
7. Supervivencia de <i>G. mellonella</i> frente a cepas de EPEC con deleciones en genes que codifican proteínas con dominio SPFH	40	
Conclusiones	45	
Perspectivas	45	
Métodos	47	
Anexo 1		49
Porcentajes de identidad y de similitud entre las proteínas con dominio SPFH de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> , y las proteínas candidatas de PA14		
Anexo 2	50	
Dominios conservados en las proteínas candidatas de PA14		
Referencias	51	

LISTA DE ABREVIATURAS

A/D	Lesiones de adhesión y destrucción
AHLs	Acilhomoserín lactonas
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DRMs	Membranas resistentes a detergentes, de <i>detergent resistant membranes</i> en inglés
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
l _d	Fase líquida desordenada de la membrana
LEE	Locus de destrucción del enterocito, de <i>locus of enterocyte effacement</i> en inglés
l _o	Fase líquida ordenada de la membrana
MMFs	Microdominios membranales funcionales
OD	Densidad óptica, de <i>optical density</i> en inglés
PA14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14
SIg	Inmunoglobulina de superficie
s _o	Fase sólida ordenada de la membrana
SPFH	Estomatina, p rohibitina, f lotilina y H flK
SST2	Sistema de secreción tipo II
SST3	Sistema de secreción tipo III
SST6	Sistema de secreción tipo VI
TX100	Detergente Tritón X-100
UFC	Unidad formadora de colonia
WT	Cepa silvestre, de <i>wild type</i> en inglés

RESUMEN

Los microdominios membranales funcionales (MMFs) son andamiajes moleculares de la membrana procarionte similares a las balsas lipídicas de eucariontes. Ambos se caracterizan por segregarse del resto de la membrana, formando dominios en un estado físico altamente ordenado, a causa de la estructura de los lípidos que los componen, y por reclutar proteínas de andamiaje (como son las proteínas con dominio SPFH) que facilitan la interacción entre las proteínas que se asocian a ellas. Se ha relacionado a los MMFs con diversos procesos como la virulencia, formación de biopelículas, esporulación, adhesión celular, secreción, ensamblaje de complejos moleculares y funcionamiento de sistemas de dos componentes. Aunque el descubrimiento de los MMFs sucedió hace una década, este campo de investigación apenas se encuentra en desarrollo, y todavía es necesario determinar si existen MMFs en organismos tan ampliamente estudiados como la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa*. Por ello, en el presente trabajo se realizó una búsqueda bioinformática de las proteínas con dominio con SPFH de la cepa PA14 de *P. aeruginosa*, que resultó en el descubrimiento de nueve proteínas candidatas a ser proteínas de andamiaje; se progresó con la generación de deleciones de los genes de estas mismas proteínas; y se estudió el efecto de la interrupción de los genes que codifican algunas de estas proteínas sobre la virulencia de PA14 tanto *in vitro* como *in vivo*. La interrupción del gen *hflK* ralentizó el crecimiento de esta cepa. Las interrupciones de los genes *PA14_05890* y *PA14_60630* provocaron una menor actividad elastolítica, la cual es importante en la virulencia de PA14. Por otro lado, la interrupción del gen *PA14_05890* provocó una menor mortalidad de la larva de *G. mellonella* ante la infección con PA14. Asimismo, se descubrió que la deleción combinada de los genes de las distintas proteínas con dominio SPFH de la cepa EPEC de *E. coli* provoca una menor mortalidad en su infección a *G. mellonella* y se demostró que esto no está relacionado con el SST3 de EPEC. Este resultado sugiere que la virulencia de EPEC en el modelo de la polilla de la cera se debe a la toxina EspC. En general, los resultados obtenidos indican que podría existir una relación funcional entre las proteínas con dominio SPFH y los procesos relacionados con virulencia tanto en PA14 como en EPEC.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La membrana celular

Toda célula cuenta con una membrana que la delimita respecto al exterior y sin la cual no podría vivir. Esta membrana es una barrera semipermeable que concentra y mantiene la organización de los demás componentes de la célula. Asimismo, es fundamental en otras funciones celulares indispensables como son el ingreso de nutrientes, la expulsión de desechos, la transducción de señales, la reproducción, etc. Además de esta membrana externa, llamada membrana plasmática, casi todas las células eucariontes y algunas células procariontes cuentan con membranas internas que dividen a la célula en compartimientos (como son el núcleo y la mitocondria eucariontes y el magnetosoma procarionte)¹⁻⁴.

Pese a que el reconocimiento generalizado de la existencia de la membrana celular data del paso del siglo XIX al XX⁵, se tomará como punto de arranque para esta introducción el parteaguas ocasionado por los modelos de Singer de la década de 1970.

En 1971, partiendo de los principios termodinámicos obtenidos del estudio de la estructura de las proteínas, y sintetizándolos con una enorme cantidad de evidencias sobre las propiedades de las membranas biológicas, Singer expuso detalladamente su modelo de mosaico de la membrana celular⁶. En él, se entendía a la membrana como una bicapa en la que proteínas y fosfolípidos se alternan horizontalmente, y en la que los grupos hidrofílicos de ambos están expuestos al exterior acuoso, mientras que los hidrofóbicos son secuestrados en el interior, prácticamente sin contacto con el agua, debido sobre todo al efecto hidrofóbico causado por la interacción del agua con estos (ver Fig. 1 A).

Este modelo contrastaba con otros aceptados generalizadamente en la época, como el de Davson y Danielli, que suponía que la bicapa lipídica estaba rodeada por dos capas superficiales de proteínas (ver Fig. 1 B), lo cual no sería termodinámicamente viable. Al mismo tiempo, había escepticismo de que fuera posible generar un modelo que representara a todas las membranas biológicas, dada la enorme diversidad de lípidos y proteínas que las componen. Singer resolvió el problema abstrayendo esta diversidad, y lidiando con proteínas y lípidos ideales⁶.

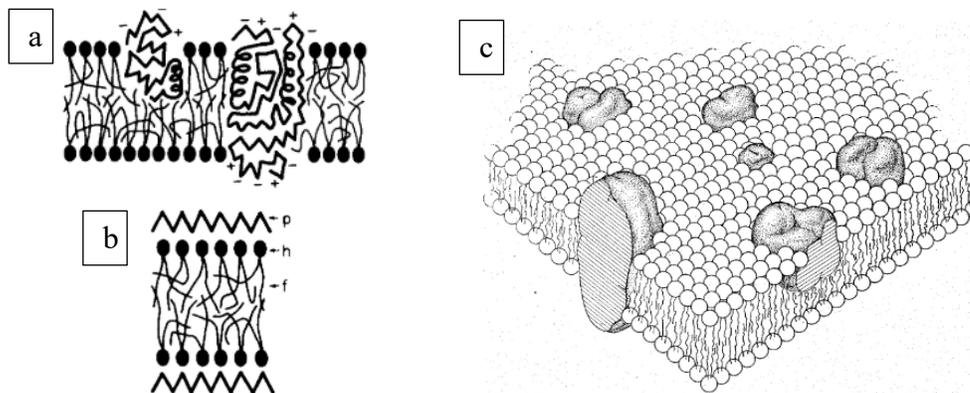


Figura 1. Modelos de la membrana celular. a) Modelo de mosaico de la membrana celular, mostrando las cargas de las proteínas en la superficie; b) modelo de Davson y Danielli, que señala las proteínas, y las cabezas y ácidos grasos de los lípidos⁶; c) modelo del mosaico fluido, representando una matriz lipídica y no proteica⁷.

Para 1972, y tras haber acumulado evidencias sobre la difusión de los componentes de las membranas, Singer y Nicolson presentaron un nuevo modelo de la membrana celular como un mosaico *fluido*. Ellos razonaron que, si la membrana es fluida, la matriz, o el soporte, del mosaico debían ser los lípidos, dado que una matriz proteica sería rígida. Con este paso adelante, hipotetizaron que, en rangos de décimas de micrómetros o más, la composición de la membrana sería homogénea⁷. El entendimiento del funcionamiento y la estructura de las membranas biológicas ha progresado mucho desde el modelo del mosaico fluido, pero sus conceptos fundamentales siguen siendo universales^{8,9}.

La heterogeneidad de la membrana y las balsas lipídicas

El concepto del mosaico fluido, al proveer de una nueva base teórica al estudio de las membranas, fomentó generaciones de experimentos, los cuales rápidamente lo completaron y eventualmente lo reconstruyeron. De hecho, incluso antes de que fuera propuesto, ya era claro que existía una diferencia en la composición proteica de las capas interna y externa de la membrana celular¹⁰. Aunque no se tomó en cuenta en la elaboración del modelo, este fenómeno sólo se pudo explicar en el marco del mosaico fluido⁵.

Pocos meses después de la publicación del modelo, se encontraron indicios de que la membrana de la cola del espermatozoide difería del resto de la membrana celular; es decir, de que no toda la membrana celular es homogénea^{11,12}. Y dos años después, Singer señaló, por un lado, varios ejemplos de membranas celulares especializadas donde existen agregados organizados de proteínas, como las uniones en hendidura, las sinapsis neuronales y la membrana púrpura de *Halobacterium*, y, por otro, la agregación de proteínas por interacciones extracelulares¹³. Aunque esto no cambiaba la estructura básica del modelo, y de hecho no había sido descartado en la propuesta del mosaico fluido⁷, sí daba las primeras muestras de que existe heterogeneidad en la membrana.

Desde 1973, experimentos en membranas artificiales mostraron que la inmiscibilidad entre lípidos distintos los lleva a formar diferentes fases, unas fluidas, con alto movimiento lateral y compuestas por lípidos con ácidos grasos muy móviles, y otras sólidas con baja difusión lateral¹⁴. En 1976, Nicolson destacó las observaciones de la separación de los lípidos de membranas biológicas en estas fases, y no descartó que pudieran secuestrar proteínas selectivamente, aunque todavía no era claro si estos dominios membranales podrían tener algún papel fisiológico. Él también recopiló las primeras pruebas de la relación de la membrana con el citoesqueleto, ya que éste controla la localización y movilidad de receptores membranales superficiales de células linfáticas, fibroblastos y eritrocitos¹⁵.

Para 1982 ya era claro que en general las proteínas y los lípidos de las membranas celulares están organizados en dominios, es decir, con una distribución lateral no homogénea, contrario a como lo había propuesto el modelo del mosaico fluido: nuevos experimentos en membranas artificiales señalaron que los lípidos cis-insaturados prefieren la fase fluida y los trans-insaturados, saturados o el colesterol prefieren la fase sólida. También se encontró que estos dominios tienen un papel fisiológico, porque al añadir lípidos de la fase fluida a la membrana se podía interrumpir la agregación de la inmunoglobulina de superficie (SIg) de linfocitos tras la unión con su ligando, un proceso que depende del citoesqueleto. A pesar de este progreso, las metodologías utilizadas todavía no podían determinar el tamaño y la diversidad de los dominios membranales¹⁶⁻¹⁸.

Dos series de avances posteriores concretaron el entendimiento de los dominios membranales. Una, originada a finales de los 80, y dirigida por Kusumi, se derivó del

rastreo de proteínas transmembranales individuales en membranas biológicas utilizando nuevas técnicas de microscopía. Se reveló que sus trayectorias no son completamente azarasas, como lo predeciría el modelo del mosaico fluido, sino que residen por algunos milisegundos dentro de compartimientos, antes de saltar a otro adyacente. Y, tras el perfeccionamiento de estos métodos años después, se mostró que sucede lo mismo con lípidos individuales, aunque a mayor velocidad. Los compartimientos de ambos son de 30-250 nm, dependiendo del tipo celular estudiado⁸.

La razón subyacente es el esqueleto de actina de la célula, que cubre por completo la superficie interna de la membrana plasmática. Ahora se sabe que lo que mantiene a las proteínas transmembranales compartimentalizadas es el choque de sus dominios citoplasmáticos con el citoesqueleto durante su viaje azaroso a través de la membrana plasmática¹⁹⁻²². Por otro lado, distintas proteínas transmembranales se anclan al citoesqueleto, inmovilizándose. Éstas funcionan como los “postes” de la “cerca” del citoesqueleto. Así, los lípidos que componen el fluido de la membrana friccionan con estos “postes”, y por ello residen, si bien por menos tiempo, en los mismos compartimientos que las proteínas transmembranales (ver Fig. 2)¹⁹⁻²².

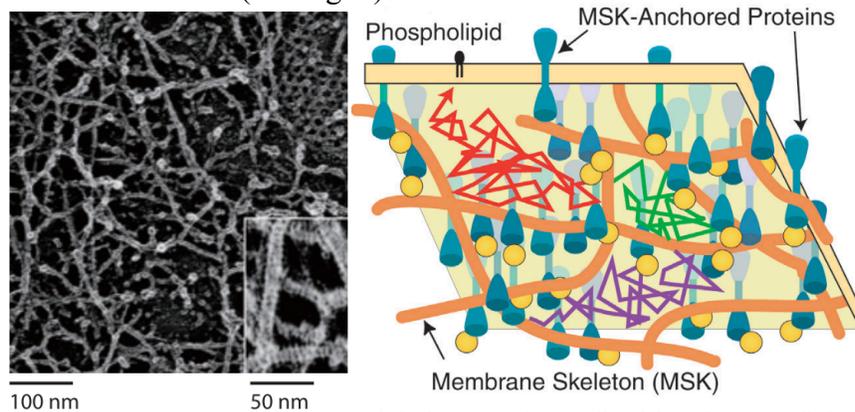


Figura 2. Izquierda, microscopía electrónica del citoesqueleto adherido a la superficie interna de la membrana plasmática, con un acercamiento que expone la estriación característica de la actina que lo compone⁸. Derecha, modelo de las “cercas” y “postes” del citoesqueleto: el citoesqueleto (naranja) y las proteínas transmembranales ancladas a él (turquesa) delimitan los compartimientos en los que residen temporalmente las proteínas y lípidos individuales. En morado, verde y rojo, se representa la trayectoria de un fosfolípido a través de distintos compartimientos²⁰.

La otra serie de progresos provino de la conjunción de dos líneas de investigación paralelas: una acerca de los distintos dominios membranales de las células epiteliales y otra acerca de las caveolas, como se verá a continuación.

Desde inicios de la década de 1980, una línea dirigida por van Meer y Simons se enfocó en entender la polarización de las membranas de las células epiteliales, que se dividen en una membrana apical y otra basolateral²³ (ver Fig. 3).

Ellos encontraron que la membrana basolateral de las células epiteliales tiene la misma composición lipídica que la de las células no polarizadas, con una mayoría de fosfatidilcolina y una minoría de glicoesfingolípidos. En cambio, la membrana apical tiene composiciones distintas en sus capas interna y externa: la capa externa está compuesta en su abrumadora mayoría por esfingolípidos, mientras que la interna tiene la misma composición que la membrana basolateral. Uniones estrechas evitan que el dominio apical se mezcle con el basolateral.

Esta asimetría se genera en el retículo endoplasmático, donde se producen los fosfolípidos, a través de flipasas que mueven la fosfatidilcolina desde la capa interna a la externa de su membrana. Ya en el aparato de Golgi, la fosfatidilcolina acaba de ser transformada en esfingomielina. Finalmente, la agregación de este esfingolípido en la capa externa del aparato de Golgi lleva a la formación de una vesícula diferenciada, que se dirige a la membrana apical. Proteínas que se pudieran asociar con los esfingolípidos serían también dirigidas a la membrana apical²³.

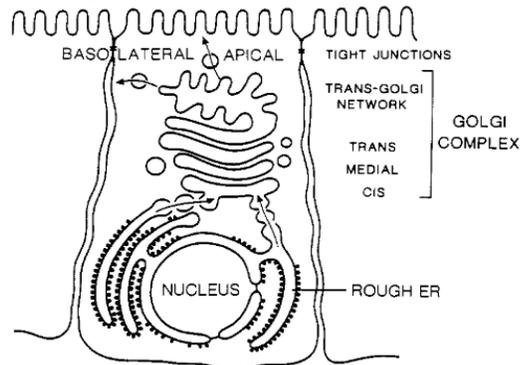


Figura 3. Representación del viaje de las membranas desde el retículo endoplasmático rugoso hasta los dominios basolateral y apical de las células epiteliales. Se señalan las uniones estrechas que dividen ambos dominios membranales²³.

La otra línea de investigación, que se desarrolló a inicios de los 90, estudió la formación de las caveolas, que son pequeñas invaginaciones de la membrana descritas desde 1953 como muy abundantes en varios tipos celulares, e involucradas con la transducción de señales. Éstas se forman como dominios membranales también enriquecidos en esfingolípidos y colesterol, pero sólo tras su unión con caveolinas, proteínas de andamiaje que se oligomerizan y pueden generar curvatura en la membrana^{24,25}. Ahora se sabe que tras la formación de dominios ricos en caveolina, la unión de las proteínas periféricas llamadas cavininas permiten estabilizar la estructura de la caveola y que la dinamina es responsable de su gemación²⁵ (ver Fig. 4). Las caveolas funcionan como plataformas moleculares reguladoras de la señalización celular, y las caveolinas incluso pueden interactuar y regular directamente diversas proteínas de señalización, además de su papel como andamiaje de las caveolas. Se las ha relacionado con el funcionamiento muscular, del tejido adiposo, del endotelio, con el cáncer, etc.²⁶⁻³¹.

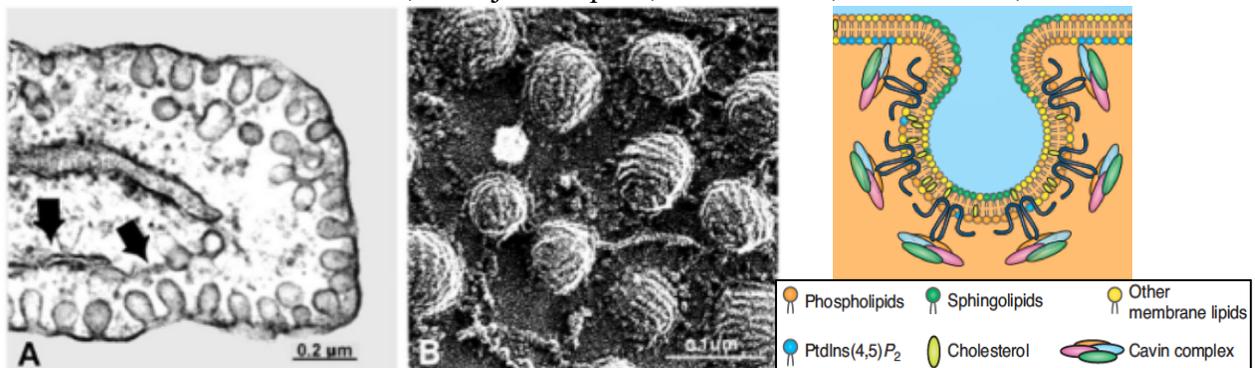


Figura 4. Izquierda y centro, microscopía electrónica de caveolas de fibroblasto (de organismo no especificado)³². Derecha, esquema de la estructura de las caveolas, con las caveolinas representadas en color negro³³.

Simons e Ikonen conjuntaron estas dos ramas de investigación, proponiendo en 1997 el modelo de las balsas lipídicas: éstas son dominios membranales compactos y dinámicos, enriquecidos en su capa externa con esfingolípidos y colesterol, que funcionan como plataformas de proteínas involucradas, por ejemplo, con la transducción de señales. Las proteínas asociadas con glicosilfosfatidilinositol (GPI), también se encuentran en ellas. Las balsas son estabilizadas por las interacciones de las cabezas de carbohidratos de los glicoesfingolípidos³⁴ (ver Fig. 5). Aunque se había planteado desde 1973 que podrían existir dominios de esfingolípidos en la membrana celular, no fue sino hasta que se les encontró un papel fisiológico que la propuesta tomó fuerza y despertó el interés sobre estas estructuras³⁵.

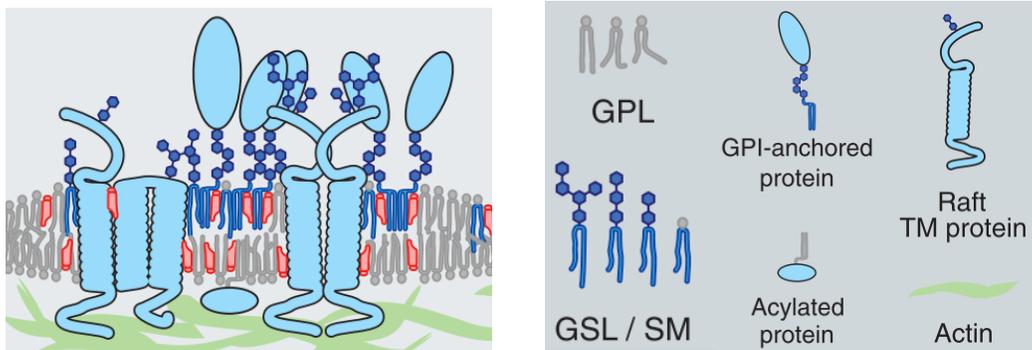


Figura 5. Estructura de las balsas lipídicas³⁰. GPL, glicerofosfolípido; GSL, glicoesfingolípidos; SM, esfingomielina. El colesterol es representado en color rojo.

La clave de por qué el colesterol y los esfingolípidos se segregan del resto de la membrana se encuentra en su estructura: el colesterol tiene una configuración anillada recta y rígida de esterol que hace menos probable que se mezcle con los lípidos insaturados, los cuales tienen ácidos grasos con dobles, o con las proteínas transmembranales, las cuales en general tienen una superficie irregular. Por ello, en membranas artificiales, el colesterol se segrega de ambos. Los glicoesfingolípidos, por su parte, se distinguen porque sus ácidos grasos tienden a estar saturados (es decir, con menos dobles). También, los esfingolípidos tienden a ser más largos que otros tipos de lípidos, por lo que la longitud de sus dominios hidrofóbicos no corresponde con la de los lípidos insaturados, y su mezcla es desfavorable energéticamente. Todo esto hace que los esfingolípidos tiendan a empaquetarse con el colesterol. Por otro lado, lo que lleva a las proteínas transmembranales hacia las balsas lipídicas generalmente son modificaciones con lípidos saturados^{20,37}.

Estas características llevan a los lípidos de la membrana celular a formar dominios en distintas fases o estados físicos que dependen de la temperatura, semejantes a los estados sólido y líquido del agua, y que pueden coexistir (ver Fig. 6). Por sí solos, los lípidos con ácidos grasos saturados y largos se empaquetan a tal grado que tienden a formar membranas en una fase sólida ordenada (s_o) o de gel, con mínimo movimiento horizontal. En contraste, los lípidos saturados junto con colesterol tienden a crear membranas en una fase líquida ordenada (l_o), en la que los lípidos tienen movilidad horizontal pero se mantienen empaquetados de forma organizada. Las balsas lipídicas se encuentran en esta fase l_o . Finalmente, los lípidos insaturados tienden a constituir membranas en una fase líquida desordenada (l_d , ver Fig. 6). Debe tomarse en cuenta que mientras más baja sea la temperatura de una membrana, más tenderá a entrar en una fase s_o y mientras más alta sea,

más tenderá a encontrarse en una fase l_d . Es decir, membranas compuestas solamente por lípidos saturados pasan a la fase l_d cuando son sometidas a altas temperaturas^{35,38,39}.

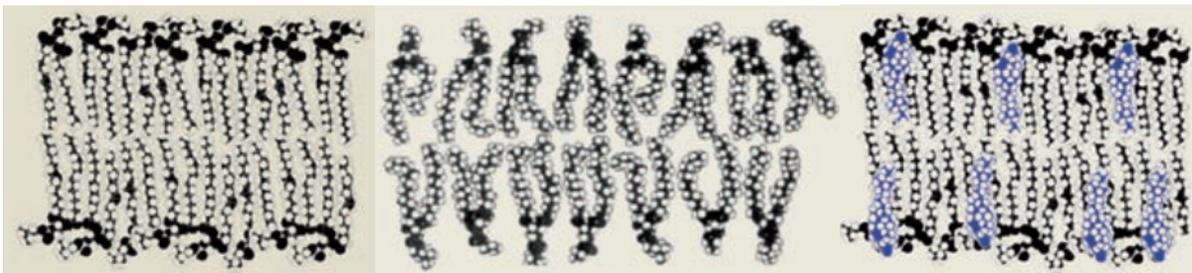


Figura 6. Representación de las distintas fases de la membrana. Desde la izquierda: sólida ordenada (s_o), líquida desordenada (l_d) y líquida ordenada (l_o , con colesterol en color azul)³⁹.

Los estados físicos de las membranas son importantes en la práctica porque permiten su separación por medio de detergentes. A bajas temperaturas (normalmente 4°C), las membranas en fase l_d son fácilmente disueltas por el detergente Tritón X-100 (TX100), resultando en pequeñas micelas compuestas por una mezcla de los lípidos y el detergente; en cambio, las fases l_o y s_o son insolubles³⁵. La extracción de las membranas que no son disueltas por el TX100 (u otros detergentes similares), las cuales son llamadas membranas resistentes a detergentes (DRMs), a bajas temperaturas, es una herramienta fundamental para aislar fases de la membrana celular que reflejan la composición de las balsas lipídicas antes de ser procesadas^{35,40,41}.

Sin embargo, ¿qué tan cercanamente las DRMs reflejan la composición de las balsas lipídicas antes de la extracción? Se han acumulado evidencias de que la extracción de DRMs no crea dominios ordenados por su propia cuenta y de que lo extraído proviene de dominios ordenados preexistentes^{35,42}:

- La concentración de esfingomielina en la que se empiezan a formar dominios L_o en una membrana artificial es la misma con la que se empiezan a aislar DRMs.
- En el mismo sentido, la formación de fases ordenadas por el colesterol en membranas artificiales correlaciona fuertemente con la insolubilidad hacia detergentes que provoca.
- Además, en experimentos con membranas artificiales, sólo se extrajeron DRMs de aquellas membranas para las que se había confirmado previamente que existían dominios ordenados y no de aquellas para las que se inhibió la formación de dominios ordenados.

La razón propuesta detrás de esto es que el TX100 no se puede empaquetar intrincadamente con los ácidos grasos saturados de las fases ordenadas a bajas temperaturas y por ello no se puede unir a ellos y disolverlos^{35,40,41}.

No obstante, las DRMs no se pueden igualar con las balsas lipídicas, como se hizo precipitadamente en su definición original³⁴. Estudios poco antes del nuevo milenio demostraron limitaciones del método^{35,40,41}:

- La cantidad de DRMs recuperadas tras la extracción con detergentes no es exactamente la misma que se encontraba en fase l_o antes del procesamiento, sino que a veces es menor.
- Se obtienen pequeñas cantidades de DRMs a 37°C, lo cual puede deberse a que a esa temperatura las balsas lipídicas no son lo suficientemente estables como para resistir el tratamiento con detergentes.

- Debido al punto anterior, la extracción de DRMs se realiza a bajas temperaturas. Sin embargo, el comportamiento de las fases de la membrana, y por lo tanto su interacción con detergentes, depende de la temperatura, por lo que las bajas temperaturas usadas en la extracción de DRMs inducen la separación de fases. Esto puede provocar la adición de lípidos y proteínas a las DRMs que no se encontraban en las balsas lipídicas.
- El uso de bajas concentraciones de TX100 hace que proteínas propias de la fase L_d de la membrana se asocien más con las DRMs, y que sea más probable extraerlas en ellas⁴³. Por ello es necesario usar proteínas de la fase L_d como controles negativos de que la extracción de DRMs no incluyó contaminantes.

Los problemas iniciales de interpretación de las DRMs, que las igualaban a las balsas lipídicas, aunados al hecho de que las balsas lipídicas, exceptuando las caveolas y las membranas apicales de células epiteliales, no han podido ser observadas, generaron mucho escepticismo sobre la existencia misma de las balsas lipídicas^{44,45}.

Una razón por la que no han podido ser observadas es porque se estima que generalmente son muy pequeñas, en el orden de 10-200 nm, fuera del rango asequible por la microscopía actual⁴⁶. Otra razón es que en células sin estimular probablemente sean aun más pequeñas (de 2-20 nm) y transitorias: se considera que con la estimulación de receptores que se encuentran en balsas lipídicas, como las proteínas ancladas a GPI, estos se oligomerizan, permitiendo el reclutamiento de más colesterol y lípidos saturados, que por las interacciones mencionadas arriba tienden a agregarse. Posteriormente, el incremento del orden en la balsa lipídica reduce el movimiento horizontal en la región y provoca que sus componentes residan por más tiempo en ella. Este modelo concuerda con las mediciones del movimiento de lípidos alrededor de las proteínas asociadas a GPI y de las observaciones de la formación de balsas más grandes tras la oligomerización de receptores^{20,46}. Actualmente se considera a las proteínas ancladas a GPI como unidades fundamentales en la formación de balsas lipídicas de mayor tamaño⁴⁷.

Por otro lado, el tamaño de las balsas lipídicas está determinado por el tamaño de los compartimientos del citoesqueleto: en un experimento con una célula sin citoesqueleto, y a 12°C, se congregaron dos dominios distintos (uno en fase l_o y otro en fase l_d) de varios micrómetros de diámetro, mucho mayores que los compartimientos del citoesqueleto²¹. Esto indica que el tamaño no es una característica definitoria de las balsas lipídicas, como sí lo es la inmiscibilidad de sus lípidos y la separación en dominios que ésta genera⁴⁶, y concuerda con la clasificación de las caveolas y las membranas apicales como balsas lipídicas.

Sin embargo, aunque en 1997 ya se había establecido el modelo de las balsas lipídicas, todavía hacía falta descubrir, exceptuando a las caveolas, otro de sus componentes esenciales: sus proteínas de andamiaje.

Las proteínas con dominio SPFH

Cuatro meses antes de que se propusiera el modelo de las balsas lipídicas se describió a las flotilinas, proteínas llamadas así por flotar en los gradientes de sacarosa que se usan para extraer DRMs. En un principio, se consideraban asociadas a caveolas porque se aislaban junto con las caveolinas aun con distintos métodos, con y sin detergentes⁴⁸.

Para 1999, un estudio bioinformático agrupó a las flotilinas dentro de una familia de proteínas membranales que se encuentra en todos los dominios de la vida y que está definida por un dominio común. Se llamó a este dominio SPFH por las proteínas que lo

contienen: estomatina, prohibitina, flotilina y HflK. Por su distribución filogenética se sugirió que podrían tener un origen antiguo en el ancestro de eucariontes y arqueas, y que fueron transferidas horizontalmente a bacterias⁴⁹.

Investigaciones a inicios de los 2000 revelaron otras varias propiedades en común de los integrantes de esta familia: se asocian a la membrana por una región hidrofóbica en su extremo amino, tienden a tener sus extremos amino y carboxilo en el citoplasma, tienen modificaciones postraduccionales que les añaden ácidos grasos saturados (miristoilaciones y palmitoilaciones), tienden a oligomerizarse, y se asocian con las balsas lipídicas, al grado de ahora ser consideradas como marcadores de éstas^{50,51}.

Estas características son similares a las de las caveolinas, por lo que en 2005 se propuso que podrían tener un papel similar, como andamiajes que organizan a las balsas lipídicas, aunque era posible que formaran balsas distintas, porque se expresan en tipos celulares donde no hay caveolas^{50,51}. Análisis posteriores de múltiples procesos celulares que las involucran evidenciaron su función como proteínas de andamiaje⁵⁰⁻⁵⁴, y para 2007 se demostró que efectivamente en células epiteliales las flotilinas forman balsas que no involucran a las caveolinas⁵⁵, por lo que ahora se considera a las caveolas más bien como un tipo particular de balsa lipídica.

Sin embargo, había quedado pendiente un estudio serio de la evolución de esta familia de proteínas. También en 2005, después de que se propusiera su función como andamiajes, se realizó una búsqueda de proteínas similares a las SPFH de animales. Se encontró que los miembros de esta familia en el reino animal tenían una similitud promedio del 89.7% entre ellas, por lo que se consideró que tenían un ancestro común. Por otro lado, las proteínas con dominio SPFH de otros organismos sólo contaban con una similitud del 26% con las de animales, por lo que fueron consideradas como productos de la evolución convergente. Para apoyar esta hipótesis se señaló que las relaciones entre las proteínas con dominio SPFH bacterianas (de las cuales analizaron 78 proteínas en 44 especies) no coincidían con la filogenia aceptada para las especies bacterianas, y que las proteínas con dominio SPFH de plantas no tenían miristolilaciones ni palmitoilaciones⁵⁶.

Pero esta hipótesis fue disputada en 2009, ya que la no coincidencia de las relaciones entre las proteínas con dominio SPFH con las relaciones evolutivas bacterianas también podría ser explicada por la transferencia horizontal de genes, que es una de las mayores causas de diversidad genética en procariontes. En el estudio de 980 genomas procariotas, representando a todos los phyla, sólo 31 genomas no contenían proteínas con dominio SPFH, por lo que se concluyó que estas proteínas son un fenómeno generalizado. Se encontraron pares de organismos cercanamente relacionados filogenéticamente, de los cuales uno no portaba ni una SPFH, mientras que el otro contaba con varias SPFH distintas: esto no puede explicarse por herencia vertical, sino por la transferencia lateral de genes⁵⁷.

Por otro lado, aunque las estomatinas o flotilinas procariontes tenían un bajo porcentaje de identidad con las eucariontes, tenían una similitud alta (por ejemplo, 29% y 69%, respectivamente, cuando se compararon las estomatinas humana y de *Escherichia coli*). Las prohibitinas de la mitocondria, por su lado, están estrechamente relacionadas a las procariontes, por lo que pudieron provenir del evento de endosimbiosis que le dio origen. Finalmente, se encontró que algunas subfamilias de las SPFH coevolucionaron con un homólogo del gen *nfeD*, una evidencia más de un origen común⁵⁷.

Así, se desarrolló una clasificación de las proteínas con dominio SPFH con 12 subfamilias, y se generó un modelo de su evolución a partir de un ancestro común (ver Fig. 7). En él, las proteínas con dominio SPFH de las subfamilias 1-5, que componen el 75% de

las proteínas con dominio SPFH procariontes, tienen un origen común: la subfamilia SPFH1, que contiene a YbbK de *E. coli*, cuenta con proteínas similares a las estomatinas eucariontes; la subfamilia SPFH2, a la que pertenece YuaG de *Bacillus subtilis*, tiene una alta similitud con las flotilinas eucariontes; SPFH3 contiene a las proteínas similares a HflK/C de *E. coli*, pero no cuenta con miembros entre las archeas o los eucariontes; SPFH4 abarca a las prohibitinas procariontes, similares a las encontradas en las mitocondrias de eucariontes; finalmente, SPFH5 contiene a la proteína YqfA de *B. subtilis*, y sólo se encuentra en los phyla bacterianos Firmicutes, Chlorobi y Planctomycetes. Las otras subfamilias son pequeñas y contienen proteínas que no han sido estudiadas, e incluso algunas que probablemente sean citoplasmáticas (SPFH 8 y 9)⁵⁷.

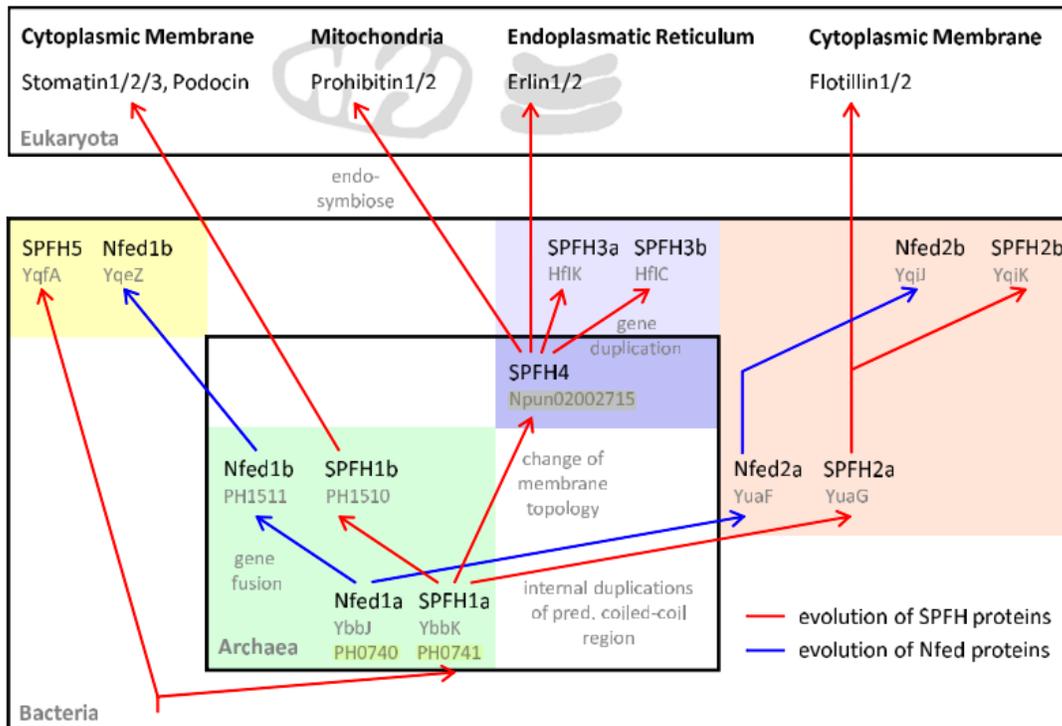


Figura 7. Modelo de la evolución de las subfamilias 1-5 de las proteínas con dominio SPFH, incluyendo su coevolución con el gen *nfeD*, en procariontes, y su transferencia posterior a eucariontes⁵⁷.

Por último, el modelo de las balsas lipídicas predice que las proteínas que las componen no deberían estar dispersas homogéneamente en la membrana celular, sino que se encontrarían focalizadas. Apenas habiéndose propuesto el modelo, experimentos con fluorescencia hicieron claro que éste es el caso (ver Fig. 8), porque las flotilinas 1 y 2 de los astrocitos de rata tienen una localización puntuada (que no coincide con la distribución de la caveolina)⁵⁸.

Pero existe una excepción, dado que las proteínas ancladas a GPI no cumplen con este patrón, y han generado controversia porque normalmente tienen una distribución uniforme en la membrana⁵⁹⁻⁶¹. Este fenómeno se explica por lo pequeñas y transitorias que son las balsas lipídicas en las que se encuentran cuando aún no se han unido a su ligando. Actualmente las proteínas ancladas a GPI son consideradas como marcadores de balsas lipídicas^{20,46}.

La localización de proteínas a través de diversas técnicas de microscopía complementa las metodologías mencionadas arriba para la caracterización de las balsas lipídicas en general, y de su composición proteica en particular.

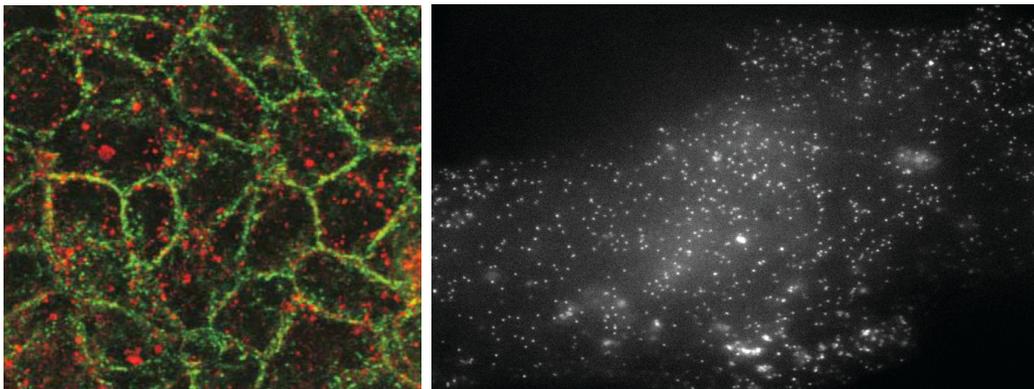


Figura 8. Distribución puntuada de las proteínas de balsas lipídicas en la membrana celular. Izquierda, ubicación de la flotilina 1 (rojo) y la caveolina 1 (verde) en células epiteliales MCDK⁵⁵. Derecha, localización de la flotilina 1-GFP en células HeLa⁵².

Estos cuarenta años de investigación dejan ver que el modelo del mosaico fluido hizo época, y representó un gran salto teórico que proveyó de una base sólida para el desarrollo posterior del entendimiento de la membrana celular⁹. Sin embargo, el abstraer las diferencias entre los lípidos, que fue clave para la creación del modelo del mosaico fluido⁷, pasó a ser insuficiente; y la hipótesis de la homogeneidad de la membrana celular en escalas de décimas de micrómetros o más⁷ terminó convirtiéndose en un obstáculo a superar por las futuras generaciones de científicos. Para desarrollar el entendimiento de la estructura y funcionamiento de la membrana celular se necesitó, no sólo entender a los lípidos en abstracto, sino también comprenderlos en su diversidad y en sus interacciones entre sí, y comprender la compartimentalización de la membrana celular causada tanto por éstas como por el citoesqueleto^{21,34}. El corolario de estas líneas de investigación fue negar la hipótesis de la homogeneidad de la membrana celular y entender que es predominantemente heterogénea^{8,9,62} (de hecho, la membrana plasmática sólo puede describirse como homogénea a escalas de 10 nm o menos⁸). Nicolson concluyó: “los componentes de las membranas celulares funcionan en diversos dominios como elementos cooperativos, dinámicos, no uniformes, no azarosos, dentro de un equilibrio termodinámico”⁶³. Este nuevo estadio teórico, que no descartó el modelo del mosaico fluido, sí lo invirtió por completo, al tiempo que lo llevó a un nivel superior que está dando base a nuevas décadas de experimentación e investigación.

Pero, a pesar de todo este progreso, todavía es necesario concretar aun más nuestro entendimiento de la membrana y las balsas lipídicas (las balsas de la membrana nuclear y mitocondrial apenas han sido estudiadas⁶⁴). Particularmente, desde el origen del concepto de las balsas lipídicas, se creía que éstas eran un fenómeno exclusivamente eucarionte^{34,65}, dado que los procariontes generalmente no cuentan con colesterol ni esfingolípidos, y porque no se creía que la célula procarionte, que no está compartimentalizada al grado de la eucarionte, contara con tal complejidad en su membrana⁶⁶.

De hecho, durante la ola de investigación de los 70 y 80 sobre el citoesqueleto, se creía que éste era un nivel de complejidad exclusivo de eucariontes, y se daban razones similares para descartar su existencia en procariontes. Pero esta noción empezó a cambiar

desde 1992, cuando se encontraron proteínas en *E. coli* similares a las del citoesqueleto eucarionte, y ahora su existencia es un hecho⁶⁷.

Microdominios membranales funcionales en bacterias

Las membranas bacterianas no sólo carecen de esfingolípidos y colesterol, sino que tienen una composición y estructura particulares (ver Fig. 9). Las bacterias Gram negativas tienen dos membranas: la membrana interna está compuesta principalmente por fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y cardiolipina, mientras que la membrana externa contiene fosfatidiletanolamina en su capa interna y lipopolisacáridos en su capa externa. Entre ambas, existe una pared celular compuesta de peptidoglicanos. En cambio, las bacterias Gram positivas sólo tienen una membrana, compuesta principalmente por fosfatidilglicerol y cardiolipina. Rodeándola también cuentan con una pared celular de peptidoglicanos, pero de mayor calibre⁶⁸. Las bacterias Gram positivas retienen el colorante de la tinción de Gram porque tienen una mayor pared celular¹.

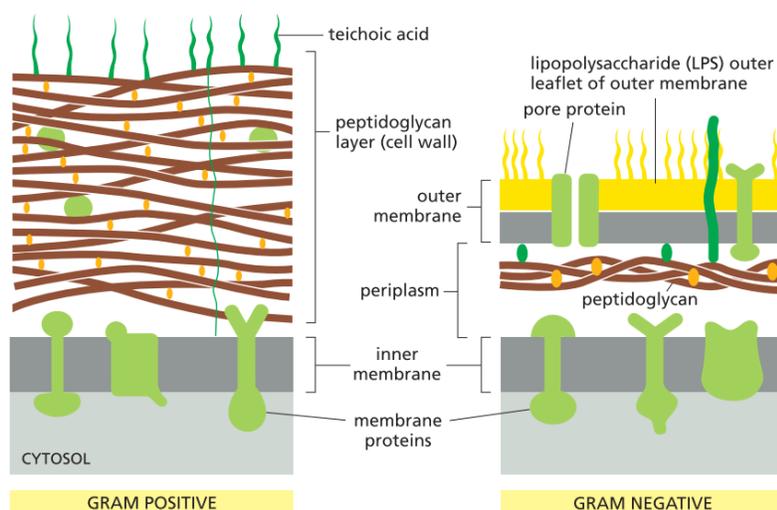


Figura 9. Representación esquemática de la membrana de bacterias Gram positivas y negativas¹.

Desde inicios de la década de 2000 se encontró que la cardiolipina y la fosfatidiletanolamina forman dominios en la membrana bacteriana. Por su estructura, ambos lípidos tienden a concentrarse en las regiones con una forma cóncava, como los polos de los bacilos. Incluso proteínas específicas son secuestradas en estos dominios⁶⁸.

Con esta evidencia, y la identificación generalizada de proteínas con dominio SPFH en procariontes, se daba un indicio de la existencia de balsas lipídicas en bacterias. Por ello, en 2009 se analizó en la bacteria Gram positiva *B. subtilis* la localización de YuaG⁶⁹, proteína destacada previamente por tener la mayor identidad de secuencia a las flotilinas de animales, del 36%⁵⁶. Se describió que YuaG está focalizada en la membrana, pero la cantidad de focos encontrados durante la fase exponencial del cultivo es baja, y empieza a aumentar desde la fase estacionaria. Cuando midieron la transcripción del operón *yuaFGL*, también encontraron que inicia durante la fase estacionaria (ver Fig. 10).

En otro respecto, analizando la localización tridimensional de YuaG, notaron que sigue un patrón en espiral alrededor de la membrana, no aleatorio, y más bien dinámico. Pero, comparando los patrones de la cardiolipina y los focos de YuaG, notaron que no corresponden completamente, por lo que concluyeron que normalmente YuaG no se

encuentra en estos dominios. Finalmente, reportaron que la eliminación de YuaG ralentiza la esporulación de *B. subtilis* y la transcripción de genes que la regulan, y altera la formación de septa de células en división⁶⁹.

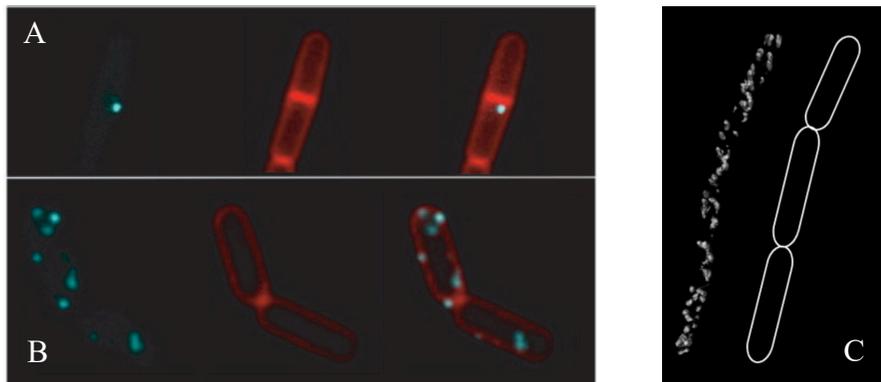


Figura 10. Localización de YuaG (azul) en la membrana (rojo) de *B. subtilis*. A) En cultivo en fase exponencial. B) Durante la fase estacionaria. C) Reconstrucción 3D de los focos de YuaG en la membrana⁶⁹.

En 2010, López y Kolter encontraron los lípidos responsables de la localización focalizada de YuaG⁷⁰. Su estudio inició tras la serendipia de que la nistatina, que es un antifúngico, interrumpió la formación de biopelículas de *B. subtilis*. La formación de biopelículas está controlada por la cinasa KinC, que fosforila al regulador de respuesta Spo0A, el cual activa la formación de biopelículas cuando está fosforilado.

Previamente se había descrito a la nistatina como capaz de secuestrar esteroides, por lo que se sugirió que interrumpía la formación de balsas lipídicas⁴⁰; pero *B. subtilis* no tiene esteroides. Por ello, buscaron moléculas similares a los esteroides e interrumpieron las vías de síntesis que encontraron. Una de ellas, de lípidos carotenoides provenientes del escualeno, al ser interrumpida tenía el mismo efecto que la nistatina, y este efecto se encontraba río arriba de la fosforilación de Spo0A, es decir, directamente sobre la actividad de la cinasa. Ya se había reportado que KinC tenía una localización focalizada en la membrana, por lo que se pensó que podría encontrarse en dominios similares a las balsas lipídicas y por ello los carotenoides eran necesarios en su función.

Es más, YuaG colocaliza con KinC. Por todo esto, y su distribución heterogénea, YuaG fue renombrada como FloT. Por otro lado, YqfA, la otra proteína con dominio SPFH de *B. subtilis* (renombrada como FloA), también colocaliza con KinC y FloT. La eliminación de ambas flotilinas provocó la interrupción de la formación de biopelículas y la pérdida del patrón de distribución heterogénea de KinC en la membrana. Deletar una sola flotilina no provocaba ese efecto. El fenotipo fue restaurado parcialmente con la sobreexpresión de la cinasa de histidinas KinC.

Con esto, se demostró la existencia de microdominios membranales funcionales (MMFs) en bacterias, similares a las balsas lipídicas de eucariotes⁷⁰. Se les llamó MMFs porque, aunque tienen una estructura similar a las balsas lipídicas, su función podría diferir⁶⁶. En el mismo estudio, mostraron que la flotilina de *Staphylococcus aureus* y YqiK de *E. coli* también tienen una distribución puntuada en la membrana celular, sugiriendo la existencia de MMFs en otras bacterias.

Desde entonces, esta nueva línea de investigación ha explorado cada vez más profundamente las similitudes entre las balsas lipídicas eucariotas y los MMFs procariontas.

Respecto a la misma *B. subtilis*, en 2012, el mismo equipo encontró que el efecto de la delección de ambas flotilinas sobre la formación de biopelículas y la esporulación es más severo que la eliminación sólo de *kinC*, a diferencia de como se había reportado antes, por lo que sospecharon que la falta de flotilinas afecta otras proteínas⁷¹.

Haciendo espectrometría de masas de las proteínas en las DRMs de *B. subtilis*, se encontró a la proteasa FtsH, que al degradar a las proteasas RapA, RapB, RapE y Spo0E, incrementa los niveles de Spo0A fosforilado. Su presencia en DRMs depende de las flotilinas, con las que interactúa, y sin ellas disminuyen los niveles de FtsH en la célula. Deletar a *ftsH* afecta severamente la esporulación y la formación de biopelículas, de la misma forma que con las flotilinas. Es interesante que en *E. coli* la oligomerización de FtsH depende de HflK. Por otro lado, encontraron que FloT y FloA tienen un movimiento libre en la membrana, excepto cuando se encuentran en los septa de las bacterias en división, donde están estáticas⁷¹.

El mismo año, otro equipo describió que tanto *floT* como *floA* de *B. subtilis* tienen genes similares a *nfeD* río arriba de ellas, y se les llamó *nfeD2* y *nfeD1b*, respectivamente. La proteína NfeD2 también tiene una localización puntuada, que colocaliza un 90% de las veces con FloT. Además, la interrupción de FloT hizo que NfeD2 se distribuyera homogéneamente en la membrana, pero la ausencia de NfeD2 no afectó la localización de FloT, por lo que se piensa que FloT recluta a NfeD2 y tienen una función conjunta. En cambio, NfeD1b parece no localizarse en la membrana y es independiente de las flotilinas⁷².

Además, encontraron que el movimiento de FloT y FloA en la membrana es aleatorio, más bien regido por el movimiento browniano, y es independiente el uno del otro. A nivel celular, la delección de *floA/T* distorsiona la forma de las células y de su membrana, disminuye su movilidad, reduce su capacidad de transferir genes a través de competencia y ralentiza su crecimiento⁷².

Pero el estudio de los MMFs no ha estado restringido a *B. subtilis*, sino que se ha extendido a varias otras especies. En el año 2010 se mostró que *Borrelia burgdorferi*, bacteria Gram negativa causante de la enfermedad de Lyme, cuenta con MMFs de colesterol en su membrana externa, de alrededor de 100 nm de diámetro, y se dio evidencia directa de su existencia a través de métodos de microscopía. También se mostró que la proteína de membrana externa OspB es esencial en el mantenimiento de estos MMFs⁷³. Sin embargo, este caso es inusual porque las espiroquetas no pueden sintetizar colesterol, sino que *B. burgdorferi* más bien lo obtiene de su hospedero⁷⁴. Hay otras bacterias que también manipulan la célula del hospedero y adquieren colesterol y/o esfingolípidos de ella, como *Chlamydia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*⁷⁵ o *Helicobacter pylori*⁷⁶.

En 2013, se encontró que la proteína con dominio SPFH Cj0268c de la bacteria Gram negativa *Campylobacter jejuni*, que es la principal causa de diarrea bacteriana, participa en la virulencia de esta bacteria *in vitro*. En particular, las cepas en las que se deletó este gen son 40% menos capaces de adherirse a células de colon humano que las cepas silvestres y son menos resistentes al tratamiento con TX100, sin que sean afectadas su motilidad, autoaglutinación o bombas de eflujo. Expresar heterológicamente esta proteína en *E. coli* provocó que duplicara su capacidad de adhesión en células del colon⁷⁷. El año siguiente, el mismo grupo demostró que la cepa de *C. jejuni* en la que se eliminó *cj0268c* provoca una patología menos severa en el intestino de ratones gnotobióticos infectados, lo que demostró por primera vez *in vivo* la relación de esta proteína con la virulencia de *C. jejuni*⁷⁸.

En 2015, una investigación dirigida por Simons demostró la existencia de MMFs en la membrana externa de *Methylobacterium extorquens*, una bacteria Gram negativa asociada con plantas. Aunque no produce esfingolípidos ni colesterol, tiene otros lípidos similares: los hopanoides son isoprenoides estructuralmente homólogos a los esteroides, que también promueven la organización de la membrana, y el lípido A tiene una estructura muy similar a la de los esfingolípidos. Ambos interactúan favorablemente entre sí, y el lípido A tiene repulsión por los lípidos insaturados. Es más, las cepas incapaces de producir hopanoides tienen un transporte deficiente hacia el exterior de la célula⁷⁹.

En 2016, se investigó la existencia de MMFs en *Bacillus anthracis*, la bacteria Gram positiva responsable del ántrax. Ésta tiene una sola flotilina, FlotP, que está enriquecida en DRMs y tiene una localización puntuada en la membrana. Además, el ácido zaragóxico, que inhibe la síntesis de escualenos, disminuyó en más del 40% la secreción de toxinas, al mismo tiempo que disminuyó la expresión de FlotP y la desapareció de la membrana⁸⁰.

En 2017, el grupo de López demostró la existencia de MMFs en *Staphylococcus aureus*, que es Gram positiva. Esta bacteria tiene sólo una flotilina, FloA, con 84% de identidad a la FloA de *B. subtilis*, también con una localización puntuada en la membrana. Mostraron que FloA es la responsable de anclar el degradosoma de *S. aureus* a la membrana, al funcionar como andamiaje de la endoribonucleasa Rny, con la que colocaliza. De todo el degradosoma, sólo Rny interactúa con FloA. Y al deletar a FloA, Rny perdió su distribución heterogénea en la membrana y dejó de encontrarse exclusivamente en DRMs. Al mismo tiempo, se disminuyó la oligomerización del degradosoma, y ARNs no codificantes que éste regula no fueron degradados⁸¹.

En pruebas *in vivo*, tanto en ratones como en larvas de *Galleria mellonella*, la polilla de la cera, la delección de FloA disminuyó la patogenicidad de la bacteria. Usar moléculas que perturban la formación de balsas lipídicas (como el ácido zaragóxico o la miltefosina) tuvo un efecto similar al de eliminar a FloA, tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, no sólo demostraron una conexión más entre los MMFs y la virulencia bacteriana, sino también una nueva forma de combatir sus infecciones⁸¹.

Un obstáculo para estudiar los MMFs en bacterias Gram negativas es la presencia de la membrana externa, que también es resistente a la disolución por detergentes. Sin embargo, en 2016 en nuestro laboratorio se desarrolló un método para aislar las DRMs de estas bacterias, primero separando las membranas interna y externa para luego obtener DRMs de la membrana interna. El método se probó en *E. coli* (cuya HflC se encuentra focalizada en los polos de la célula) y en *Vibrio alginolyticus*⁸².

Continuando con ese trabajo, el año pasado se demostró la existencia de MMFs en *E. coli*. Se realizó un estudio proteómico de las DRMs de su membrana interna. Tres de las cuatro proteínas con dominio SPFH de *E. coli* se encontraron en la proteómica; YqiK probablemente no fue detectada porque tiene una expresión baja. Las demás proteínas encontradas sobre todo están involucradas con el transporte membranal, el metabolismo de energía, de la pared celular, y secreción. Además, se analizó la localización en la membrana de algunas de las proteínas que se encontraban enriquecidas en las DRMs, y todas tuvieron una localización puntuada en la membrana⁸³. Por último, también se encontró que la delección de las flotilinas *hflK* y *hflC* de *E. coli*, pero no su eliminación individual, provoca la activación temprana del sistema de dos componentes BarA/UvrY y que éste se mantenga activado durante etapas tardías de la fase estacionaria (Georgellis *et al*, no publicado), por

lo que éstas podrían estar involucradas en ser andamiajes de proteínas capaces de reprimir este sistema.

Como podemos ver, a pesar de que las bacterias no producen colesterol o esfingolípidos, se ha demostrado la existencia en ellas de lípidos similares estructural y funcionalmente (carotenoides, hopanoides y lípido A). Por otro lado, varios miembros de las proteínas con dominio SPFH bacterianas juegan el mismo papel que sus contrapartes eucariontes, como andamiajes moleculares. Estos dos componentes llevan a la formación de dominios membranales semejantes a las balsas lipídicas, segregados del resto de la membrana, y esenciales en el funcionamiento de diversas vías regulatorias de la función celular (ver Fig. 11)⁶⁶. La tarea ahora es desarrollar el conocimiento de los MMFs, por ejemplo, explorando si existen en otras bacterias. Sigue como pregunta abierta si existe una interacción entre el citoesqueleto bacteriano y los MMFs.

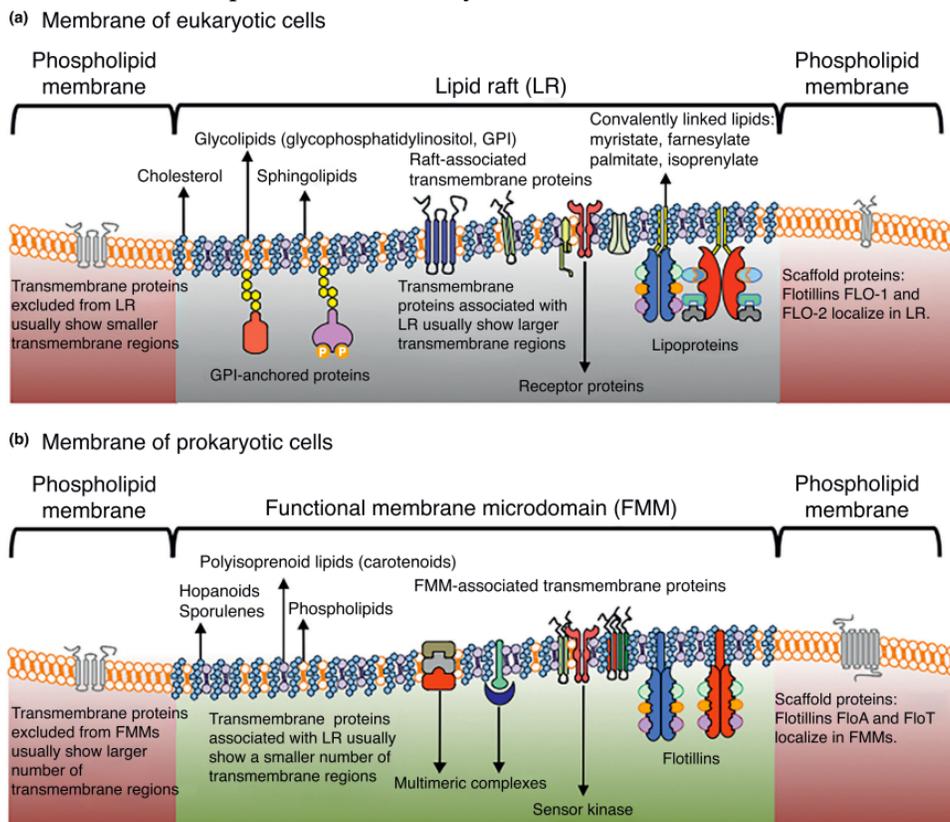


Figura 11. Comparación estructural de las balsas lipídicas eucariontes y los MMFs de bacterias. Los MMFs están compuestos por lípidos similares a los esfingolípidos y al colesterol de las balsas lipídicas. Las proteínas con dominio SPFH de los MMFs tienen la misma función de andamiaje que las de balsas lipídicas, aunque se asocian a ellos a través de sus terminales amino, y no a través de lípidos unidos covalentemente. Finalmente, las proteínas asociadas a MMFs tienden a ser multiméricas, a diferencia de las asociadas a balsas lipídicas⁶⁶.

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa extremadamente versátil, capaz de vivir en ambientes acuáticos⁸⁴, terrestres y como parásito de plantas⁸⁵ y de humanos⁸⁶. Como patógeno de humanos, causa severas infecciones en pacientes inmunodeprimidos, con quemaduras graves o con fibrosis quística y produce altas tasas de mortalidad por neumonías nosocomiales⁸⁴.

Sus infecciones pueden ser agudas o crónicas, lo que en gran parte depende del modo de vida adoptado por la bacteria. El modo de vida planctónico progresa a través de la adherencia de la bacteria a las células del hospedero por medio de fimbrias o flagelos, la inyección de factores de virulencia directamente a las células del hospedero por medio del sistema de secreción tipo III (SST3), y la secreción de otros factores de virulencia al medio, como la elastasa LasB, que ayuda a degradar los tejidos infectados. Entre estos tejidos se encuentra el endotelio de los vasos sanguíneos, que si es degradado por los factores de virulencia de *P. aeruginosa* puede ser una vía de entrada al torrente sanguíneo. Este modo de vida despierta rápidamente la respuesta inmune del hospedero y está más asociado a las infecciones agudas⁸⁶. El SST3 es una máquina molecular, también conocida como inyectisoma, que cuenta con un apéndice similar a una aguja capaz de formar un poro a través de la membrana de la célula objetivo e inyectar toxinas^{87,88}. Sólo se han descrito cuatro proteínas efectoras inyectadas por el SST3 de *P. aeruginosa*: ExoU, ExoY, ExoS y ExoT. Éstas provocan la destrucción de tejidos, obstaculizan la respuesta inmune y evitan la reparación de los daños que provocan^{89,90}.

En cambio, el modo de vida de formación de biopelículas está más asociado a las infecciones crónicas, dado que tiene un crecimiento más lento y menos agresivo. Estas infecciones pueden persistir por décadas sin llegar al torrente sanguíneo. Las biopelículas son una matriz extracelular de polisacáridos, proteínas y ADN que encapsula sésiles a las células, las protege de antibióticos, de las condiciones ambientales y del sistema inmune, y permite que compartan recursos entre ellas (ver Fig. 12 A)^{86,91}. En las biopelículas, los ramnolípidos (que son una clase de glicolípidos con ramnosa conocidos por su capacidad de provocar hemólisis) funcionan como “escudos”, que provocan la lisis de los leucocitos polimorfonucleares que de otra forma fagocitarían a las bacterias⁹¹. En este modo de vida también se expresa el sistema de secreción tipo VI (SST6), que es una máquina molecular contráctil y reusable capaz de perforar la membrana de una célula colindante y traspasar proteínas efectoras. Su principal función es matar células de otras especies, sean procariotas o eucariotas^{92,93}.

En los pacientes con fibrosis quística, una enfermedad genética donde la depuración mucociliar de los pulmones se encuentra perjudicada, se acumulan placas de mucosidad donde las bacterias pueden prosperar. El 60% de los adultos con fibrosis quística cuentan con una infección crónica de *P. aeruginosa* y ésta es su causa principal de mortalidad^{94,95}. En estos pacientes, la evolución de las cepas presentes de *P. aeruginosa* es esencial en el establecimiento de la infección crónica. Los cambios fenotípicos más asociados a este proceso son la resistencia a antibióticos, la menor expresión de factores de virulencia, la sobreproducción de alginato (que es un componente de las biopelículas) y la pérdida de motilidad^{95,96}.

Esto no significa que exista una línea divisoria absoluta entre los distintos modos de vida de *P. aeruginosa*, sino que la transición de una fase a otra es un proceso flexible donde pueden coexistir características de ambas. Es más, en las biopelículas se da una diferenciación en subpoblaciones que cuentan con distintas características fenotípicas⁸⁶.

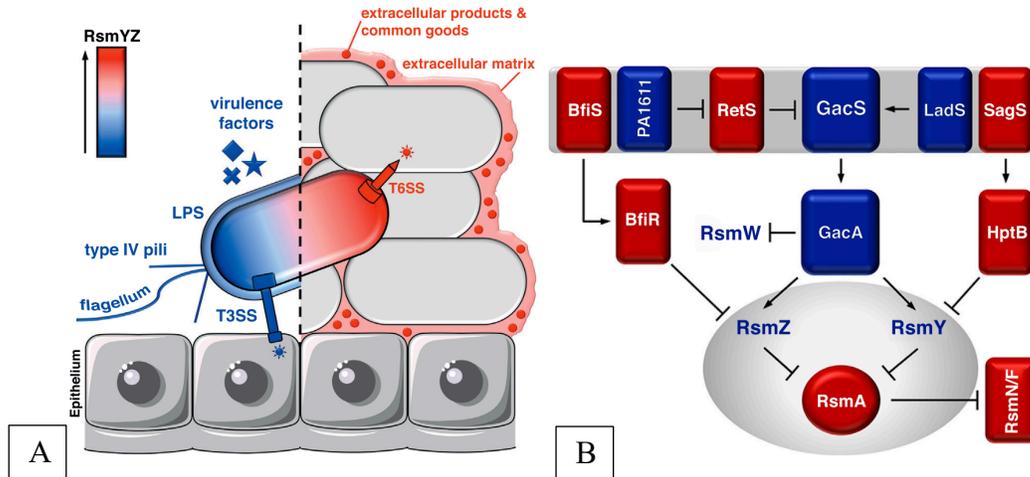


Figura 12. Modos de vida de *P. aeruginosa* y su regulación maestra. A) Los modos de vida planctónico (azul) y sésil (rojo) dependen de los niveles de *rsmYZ* regulados por B) el sistema de dos componentes GacS/GacA y su red de regulación. En azul se muestran los componentes de la red que, cuando son eliminados genéticamente, perjudican la formación de biopelículas, y en rojo aquellos que cuando son eliminados incrementan masivamente la formación de biopelículas⁸⁶.

El sistema de dos componentes GacS/GacA y su regulación sobre la proteína RsmA son centrales en la virulencia de *P. aeruginosa* y en la modulación de sus dos modos de vida⁸⁶. De hecho, la eliminación del gen *gacA* resultó en una disminución significativa de la virulencia de *P. aeruginosa* en los modelos de infección de ratón, *Arabidopsis thaliana*⁹⁷, *Caenorhabditis elegans*⁹⁸ y *G. mellonella*⁹⁹.

GacS es una cinasa sensora (cuya activación en *Pseudomonas fluorescens* se ha relacionado con intermediarios del ciclo de Krebs¹⁰⁰) que tras autofosforilarse puede fosforilar a su vez al regulador de respuesta GacA. GacA fosforilado activa la expresión de los ARNs pequeños RsmY y RsmZ, los cuales son capaces de secuestrar a la proteína RsmA. RsmA regula positivamente los factores de virulencia relacionados con la fase planctónica y regula negativamente aquellos relacionados con la fase sésil. Lo lleva a cabo regulando negativamente diversos ARNs codificantes compitiendo por ellos con el ribosoma^{86,101}. Además, las cinasas sensoras BfiS, PA1611, RetS, LadS y SagS contribuyen a la regulación de este sistema central (ver Fig. 12 B). El sistema GacS/GacA es homólogo al sistema de dos componentes BarA/UvrY de *E. coli*, el cual activa la transcripción de los ARNs pequeños CsrB y CsrC, que secuestran a CsrA^{86,102}.

El sistema regulatorio GacS/GacA también regula positivamente los sistemas de percepción de quórum Las y Rhl (ver Fig. 13). RsmA regula negativamente la síntesis de las acilhomoserín lactonas (AHLs) de estos sistemas¹⁰³. Las AHLs son ácidos grasos unidos al grupo homoserín lactona; el sistema Las cuenta con la homoserín lactona *N*-3-oxo-dodecanoil, también conocida como 3-oxo-C12-HSL, y el sistema Rhl con la homoserín lactona *N*-butanoil (o C4-HSL)¹⁰⁴.

Cuando la concentración de 3-oxo-C12-HSL llega a un nivel umbral, es capaz de unirse al regulador LasR, permitiendo su unión al ADN. LasR regula positivamente la transcripción de muchos genes relacionados con virulencia, como las elastasas y la proteasa alcalina, o la exotoxina A. También induce la transcripción de LasI, el productor de las

AHLs que se unieron a LasR en un principio, creando un circuito de retroalimentación positiva¹⁰⁴.

Por otro lado, LasR regula positivamente la transcripción de RhIR, el regulador del sistema de percepción de quórum Rhl, que produce la C4-HSL a través del gen RhII, y que induce la producción de ramnolípidos, pero reprime el ensamblaje y función del SST3¹⁰⁴.

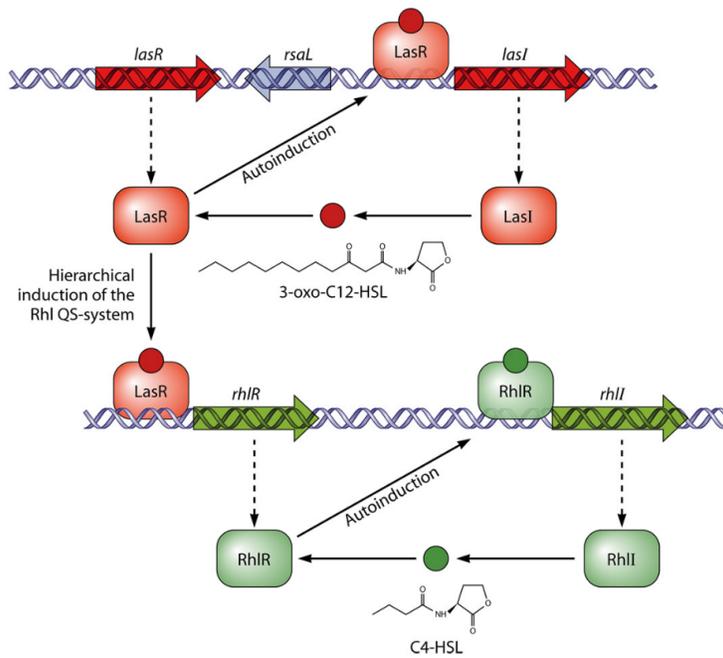


Figura 13. Función de los sistemas de percepción de quórum Las y Rhl de *P. aeruginosa*¹⁰⁴.

P. aeruginosa tiene una de las redes de regulación más complejas y estudiadas entre los microorganismos¹⁰⁴. De sus 6.3 Mb en el genoma, el 10% está dedicado a sistemas de regulación, y de todos sus sistemas de dos componentes, que involucran a 64 cinasas sensoras, 72 reguladores de respuesta y 3 proteínas de fosforelevo, el 50% está relacionado con su virulencia¹⁰⁵.

***E. coli* enteropatógena (EPEC)**

E. coli es una bacteria Gram negativa que normalmente habita en ambientes terrestres, acuáticos, sedimentos, comida, y como comensal en el intestino de animales de sangre caliente y de reptiles. Sin embargo, algunas de sus cepas han evolucionado hacia un modo de vida patógeno, y causan una amplia gama de enfermedades. Estas cepas generalmente son clasificadas por patotipos, es decir, por compartir un conjunto de factores de virulencia, y no por formar grupos monofiléticos^{106,107}.

EPEC es uno de los principales agentes causales de diarrea en infantes, sobre los que provoca una alta mortalidad en países del Tercer Mundo^{106,108,109}. EPEC y EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) se distinguen de los demás patotipos de *E. coli* por provocar lesiones de adhesión y destrucción (A/D) en el tejido epitelial del intestino: en ellas, la célula epitelial pierde sus microvellosidades y padece un rearrreglo de su citoesqueleto de forma que la bacteria termina adherida íntimamente a su membrana, sobre un pedestal de actina acumulada bajo la membrana eucarionte (ver Fig. 14 C)^{106,108}. La diferencia fundamental entre EPEC y EHEC es que esta última es capaz de producir la toxina Shiga,

la cual es un fuerte inhibidor del ribosoma en la célula del hospedero y se encuentra codificada en dos bacteriófagos integrados al cromosoma¹¹⁰. También se diferencian porque EHEC infecta el colon, mientras que EPEC infecta el intestino delgado¹⁰⁶.

Hay muchos factores de virulencia involucrados con las lesiones A/D de EPEC: bajo las condiciones del intestino, se induce la expresión del pilus tipo IV (también llamado BFP por *bundle-forming pilus*), el cual, junto con el flagelo, permite que la bacteria se adhiera de forma inicial a una célula intestinal. Después, es activado el sistema de secreción tipo III (SST3), un complejo molecular también conocido como inyectisoma^{106,108,111}. Éste último tiene un cuerpo basal multiproteico que atraviesa ambas membranas de la bacteria, un complejo citoplasmático de ATPasa que provee de energía al sistema, un filamento de aguja extracelular compuesto por múltiples subunidades de la proteína EspA, y un poro de translocación conformado por el heterolígmero de EspB y EspD, las cuales cuentan con dominios transmembranales que permiten atravesar la membrana de la célula intestinal (ver Fig. 14 A)¹¹².

El inyectisoma permite la secreción de proteínas efectoras directamente al interior de la célula eucarionte. Entre ellas se encuentra Tir, que se dirige a la membrana de la célula epitelial y se une con la intimina de la membrana externa de la bacteria, así adhiriendo estrechamente ambas células. Tir también provoca la nucleación de elementos del citoesqueleto eucarionte a partir de ella, llevando así a la formación del pedestal de actina (ver Fig. 14 B y C)^{106,108,111}.

Las demás proteínas efectoras/toxinas inyectadas por el SST3, no sólo provocan el rearrreglo del citoesqueleto eucarionte, apoyando así a la formación de la lesión A/D, sino que participan también en la evasión del sistema inmune: provocan la inhibición de la inflamación, de la fagocitosis, de la secreción de citoquinas, de las vías endógenas y exógenas de apoptosis, y evitan la activación del inflamosoma¹¹⁴. La única toxina de la que se ha reportado un mecanismo de secreción independiente al SST3 es la proteína EspC, que provoca daños en el citoesqueleto de células epiteliales¹¹⁵.

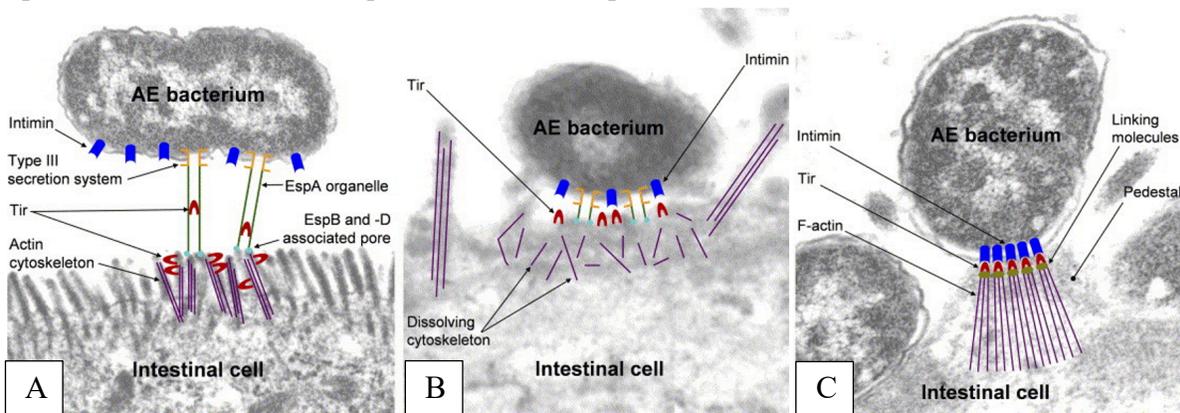


Figura 14. Proceso general de la formación de lesiones A/D¹¹³, ver descripción en el texto.

La base genética de las lesiones A/D es el locus de destrucción del enterocito (*LEE*), una isla de patogenicidad de 35-43 kb compuesto por cinco operones con 41 marcos abiertos de lectura: los operones *LEE1-3* codifican el SST3, junto con la ATPasa del sistema, llamada EscN; *LEE4* codifica las proteínas EspA, EspB y EspD; y *LEE5* codifica a la intimina y a Tir. Además, *LEE1* codifica al regulador maestro de la expresión de esta isla

de patogenicidad, llamado Ler, que activa la expresión de los locus *LEE2-5*, así como la expresión de otras proteínas relacionadas con la virulencia, incluida EspC (Fig. 15)¹⁰⁹.

La base genética del pilus tipo IV se encuentra en el plásmido EAF, que contiene los 14 genes que lo codifican, su regulador positivo, *perA*, y a otro activador de Ler, llamado *perC*. Es interesante que Ler reprime la expresión de *per*, en un circuito de retroalimentación negativa¹⁰⁹.

Ler es controlado por GrlA (regulador global de Ler), el cual activa su transcripción. Al mismo tiempo, Ler estimula la expresión de GrlA, en un ciclo de retroalimentación positiva. Por su lado, *grlA* es controlado por distintos sistemas que reflejan las condiciones ambientales: las bajas concentraciones de magnesio aumentan la expresión del ARN pequeño MgrR, que estabiliza el transcrito de *grlA*; la abundancia de cationes de hierro reprime a RhyB, evitando así que éste reprima al operón *grlRA*; el sistema de dos componentes BarA/UvrY, que es activado en la transición de la fase exponencial a la estacionaria por la acumulación de acetato en el medio, reprime a CsrA través de los ARNs pequeños CsrB y CsrC¹⁰², y así evita que CsrA reprima a *grlA*. Por ello, distintos medios de cultivo afectan la expresión de los factores de virulencia de EPEC: la transcripción de *grlA* es casi 30 veces más alta en el medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) que en el medio LB (Luria-Bertani); de la misma forma, la transcripción de *perA* es 25 veces más alta en DMEM¹¹⁶.

Finalmente, el funcionamiento del sistema de dos componentes Cpx, que responde a distintas formas de estrés celular, al mal plegamiento de proteínas de la membrana, e incluso a la adhesión celular, regula negativamente los operones de LEE, y especialmente a *LEE1*, *LEE4* y *LEE5*¹¹⁷, y reprime la transcripción de los genes *bfp*¹¹⁸.

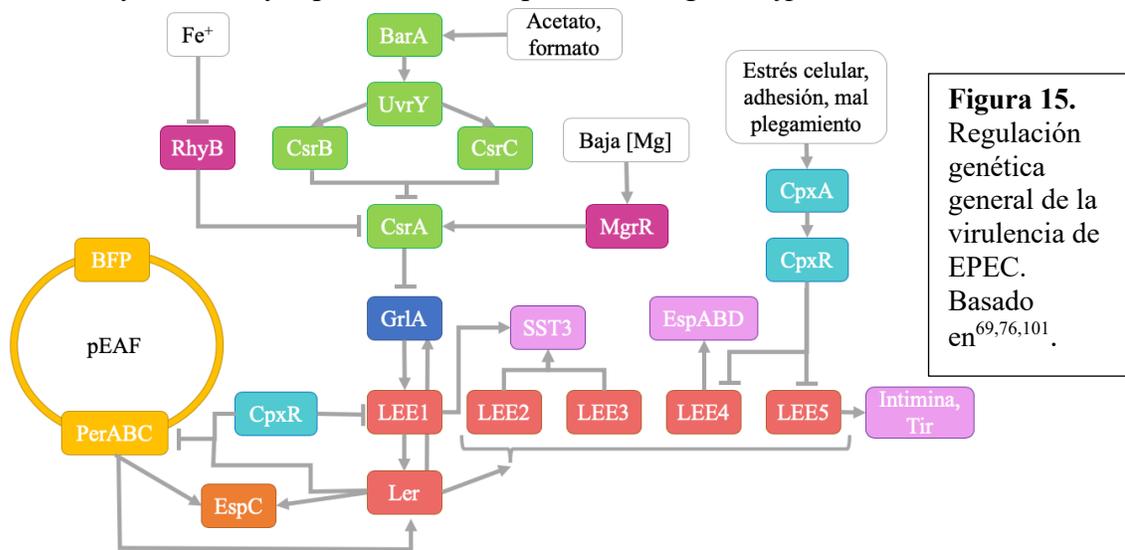


Figura 15. Regulación genética general de la virulencia de EPEC. Basado en^{69,76,101}.

Como se abordó en las secciones pasadas, el entendimiento de los MMFs en bacterias, que representa una continuación de la investigación acerca de las balsas lipídicas en eucariontes, apenas se está desarrollando. Hay muchas preguntas abiertas al respecto, pero una de ellas es si existen MMFs en otras especies bacterianas, cuál es su composición y con qué funciones cuentan. Responder estas preguntas respecto a *P. aeruginosa* abriría otro campo de investigación relacionado con la tan estudiada virulencia de esta bacteria y permitiría desarrollar el entendimiento de los MMFs en general. En este trabajo, se empezó a analizar la existencia de MMFs en esta bacteria, partiendo de sus proteínas con dominio SPFH y el efecto de su interrupción sobre su virulencia.

HIPÓTESIS

Existen proteínas con dominio SPFH en *P. aeruginosa*, y esto es una evidencia de la posible existencia de MMFs en ella. La eliminación de estas proteínas, sobre todo si son deleciones múltiples, tiene efectos sobre la virulencia de esta bacteria. Esto puede involucrar al sistema de dos componentes GacS/GacA, homólogo del sistema BarA/UvrY de *E. coli*, en el que ya se encontró una relación con las proteínas con dominio SPFH.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y deletar los genes que codifican proteínas con dominio SPFH en el genoma de *P. aeruginosa* y evaluar su impacto en la expresión de factores de virulencia y patogénesis.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Hacer una búsqueda informática de proteínas con dominio SPFH, ortólogas a las reportadas en otras bacterias, en el genoma de *P. aeruginosa*.
2. Construir cepas con eliminaciones individuales y múltiples en los genes identificados como codificantes para proteínas con dominio SPFH.
3. Estudiar el efecto de las eliminaciones sencillas o múltiples de estos genes sobre:
 - a. El crecimiento de la bacteria
 - b. La actividad de los factores de virulencia proteasa alcalina y elastasa.
 - c. La capacidad de esta bacteria de causar mortalidad en larvas de la polilla de la cera, *G. mellonella*.
4. Analizar la capacidad de las cepas con deleciones en los genes de proteínas con dominio SPFH de la bacteria *E. coli* enteropatógena para causar mortalidad en larvas de *G. mellonella*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Búsqueda de homólogos de las proteínas con dominio SPFH de *E. coli* y *B. subtilis* codificados en el genoma de *P. aeruginosa*

Se realizó una búsqueda de homólogos de las proteínas con dominio SPFH de *E. coli* y *B. subtilis* codificados en el genoma de la cepa UCBPP-PA14 de *P. aeruginosa* (PA14). Se seleccionó la cepa PA14 para este estudio por sus altos niveles de virulencia, comparada a otras cepas de la misma especie (incluyendo PAO1)⁹⁷, y porque es el genotipo más frecuentemente encontrado en muestras de diversos ambientes a nivel mundial¹¹⁹. Esta cepa se aisló originalmente de una quemadura infectada de un paciente hospitalizado, y se reportó por primera vez en 1977 como una de las cepas de *P. aeruginosa* más virulentas para plantas, lo cual fue relacionado con su diseminación hasta el humano^{120,121}.

La búsqueda de homólogos se llevó a cabo mediante la herramienta BioCyc BLAST¹²², por medio de un Blast-p de las diversas proteínas con dominio SPFH reportadas de *E. coli* (HflK, HflC, YbbK y YqiK⁸³) y de *B. subtilis* (FloT y FloA⁷⁰) contra las proteínas codificadas en el genoma de PA14, utilizando los parámetros estándares (ver porcentajes de identidad en el Anexo 1). Las secuencias resultantes fueron analizadas con la herramienta Conserved Domains Search de NCBI^{123–126}; aquellas con dominio SPFH fueron categorizadas como proteínas con dominio SPFH candidatas de PA14 (ver dominios encontrados en el Anexo 2). Se encontraron las siguientes proteínas, etiquetadas de acuerdo a su nomenclatura en la Pseudomonas Genome Database¹²⁷:

Etiqueta del locus	Tipo de dominio SPFH	Proteína modelo con mayor identidad
PA14_05890	Eslipinas similares a estomatina	YbbK de <i>E. coli</i>
PA14_16180	YqiK	YqiK de <i>E. coli</i>
PA14_33070	HflK	HflK de <i>E. coli</i>
PA14_33080	HflC	HflC de <i>E. coli</i>
PA14_33110	HflK	HflK de <i>E. coli</i>
PA14_41420	HflC	HflC de <i>E. coli</i>
PA14_60630	Eslipinas similares a estomatina	YbbK de <i>E. coli</i>
PA14_65270 (HflC)	HflC	HflC de <i>E. coli</i>
PA14_65280 (HflK)	HflK	HflK de <i>E. coli</i>

Las proteínas con dominio SPFH de *E. coli* tuvieron una mayor identidad con las candidatas de PA14 que lo que lo hicieron las proteínas con dominio SPFH de *B. subtilis*. De hecho, respecto a *B. subtilis*, sólo se encontraron proteínas con dominio SPFH cuando se utilizó a FloT como modelo. Esto es razonable, ya que *E. coli* evolutivamente es mucho

más cercana a *P. aeruginosa*: ambas pertenecen a la clase Gammaproteobacteria, mientras que *B. subtilis* pertenece a otro phylum (Firmicutes).

El hecho de que en PA14 haya una cantidad mucho mayor de genes de proteínas con dominio SPFH que en *E. coli* o *B. subtilis* es posiblemente una consecuencia de la regulación genética más compleja de *P. aeruginosa*. Sin embargo, es necesario analizar la función, localización y estructura de estas proteínas antes de considerarlas como proteínas de andamiaje similares a las proteínas con dominio SPFH propias de las balsas lipídicas o los MMFs.

Dada la coevolución de las proteínas NfeD y las proteínas con dominio SPFH, es interesante señalar que en el mismo operón e inmediatamente río arriba del gen *PA14_05890* se encuentra un gen similar a *nfeD*, *PA14_05880* (ver Fig. 16). Al mismo tiempo, también es interesante porque previamente se ha demostrado en *B. subtilis* que las proteínas codificadas por los genes *nfeD2* y *floT*, que se encuentran en el mismo operón, interactúan: NfeD2 es reclutada por FloT a puntos focalizados de la membrana y puede tener un papel en el ensamblaje de los andamiajes de FloT⁷². Aunque esto último no sucede en todos los pares de proteínas con dominio SPFH y NfeD⁷², es una evidencia que tomar en cuenta.

2. Disponibilidad de cepas con interrupciones en genes que codifican proteínas con dominio SPFH

Se solicitaron cepas con interrupciones en los genes identificados en la sección anterior. Estas cepas provenían de la colección de Ausubel¹²⁸ y fueron creadas por inserción de transposón. Hubo cepas disponibles con interrupciones en los genes *hflK*, *PA14_05890*, *PA14_60630* y *PA14_33070* (ver Fig. 16).

Es necesario hacer notar que éstas son cepas en las que un solo gen se encuentra interrumpido, mientras que los efectos reportados en *B. subtilis* y en *E. coli* se encontraron en eliminaciones múltiples (Georgellis *et al*, no publicado, y ⁷⁰). Además, como son mutaciones por transposón, no es posible saber si la interrupción afectó también los genes del mismo operón pero río abajo del gen blanco. Por ello, como veremos más adelante, al mismo tiempo que se analizaban los fenotipos de las cepas de la colección de Ausubel también se progresó con la creación de eliminaciones individuales propias de estos mismos genes.

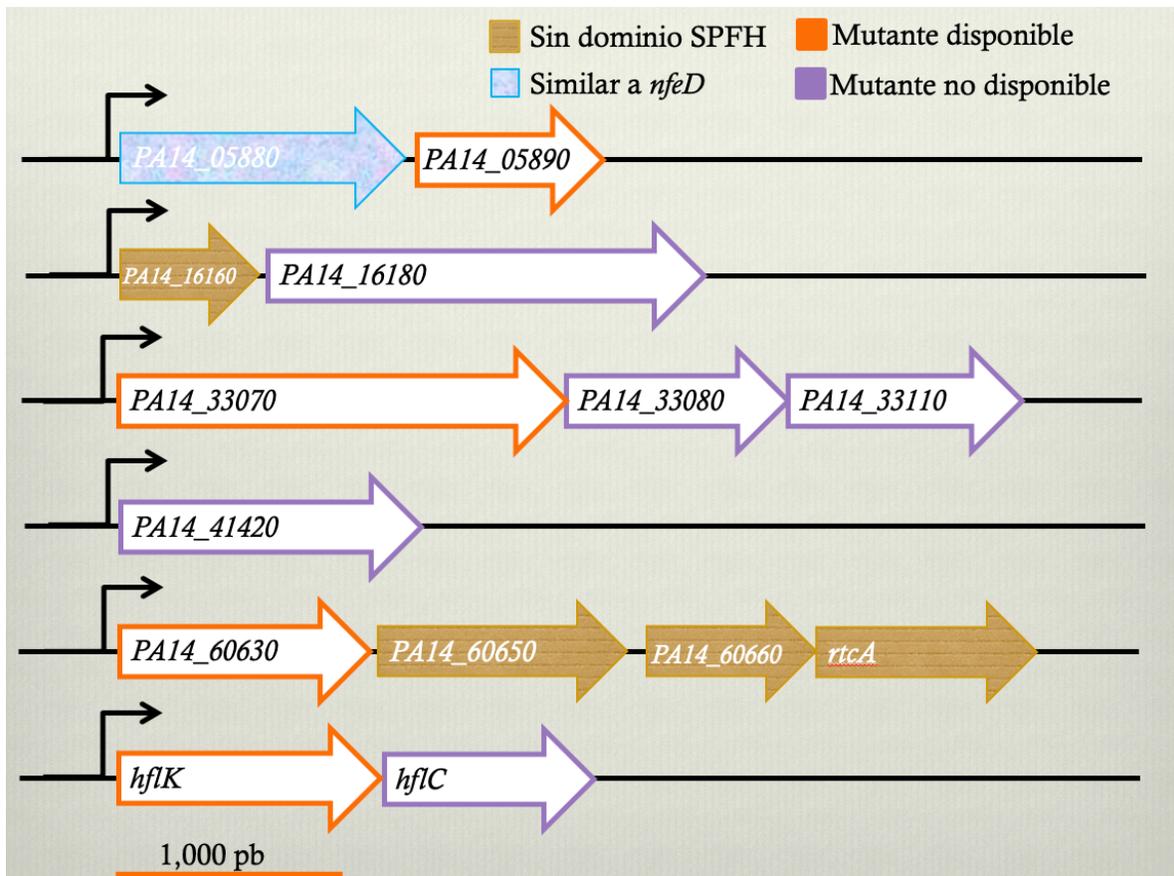


Figura 16. Representación de los operones de PA14 donde existen proteínas con dominio SPFH. Se presentan en naranja las cepas con interrupciones individuales provenientes de la colección de Ausubel que se encontraban disponibles para los siguientes experimentos, y en morado las no disponibles. En azul se muestra la única proteína identificada como parte de la superfamilia NfeD en estos operones. En café se representan los genes de estos operones cuyas proteínas no contaban con dominio SPFH ni podían identificarse como parte de la superfamilia NfeD.

3. Curvas de crecimiento

Para iniciar la caracterización fenotípica de las cepas con interrupciones en genes que codifican proteínas con dominio SPFH de PA14, se realizaron curvas de crecimiento a 37°C en medio LB de cada una de ellas, y de la cepa silvestre (WT) y la cepa con interrupción en *gacA* como controles. Se usó la cepa con interrupción en *gacA* como control porque, como se describió previamente, este gen es necesario en la regulación maestra de los modos de patogenicidad de *P. aeruginosa*, y se ha reportado que su eliminación provoca una virulencia disminuida⁹⁷. De todas las cepas analizadas, sólo la cepa con interrupción en *hflK* tuvo un crecimiento más lento que la WT (ver Fig. 17). A pesar de que el crecimiento ralentizado se puede deber a muchas razones, es una evidencia para ser analizada junto con otros fenotipos. El cambio en la variabilidad de los resultados puede explicarse porque a partir de la OD₆₀₀ de 0.8 aproximadamente, se tuvieron que llevar a cabo las mediciones realizando diluciones para no superar el rango de medición del espectrofotómetro, y eso llevó consigo un error agregado.

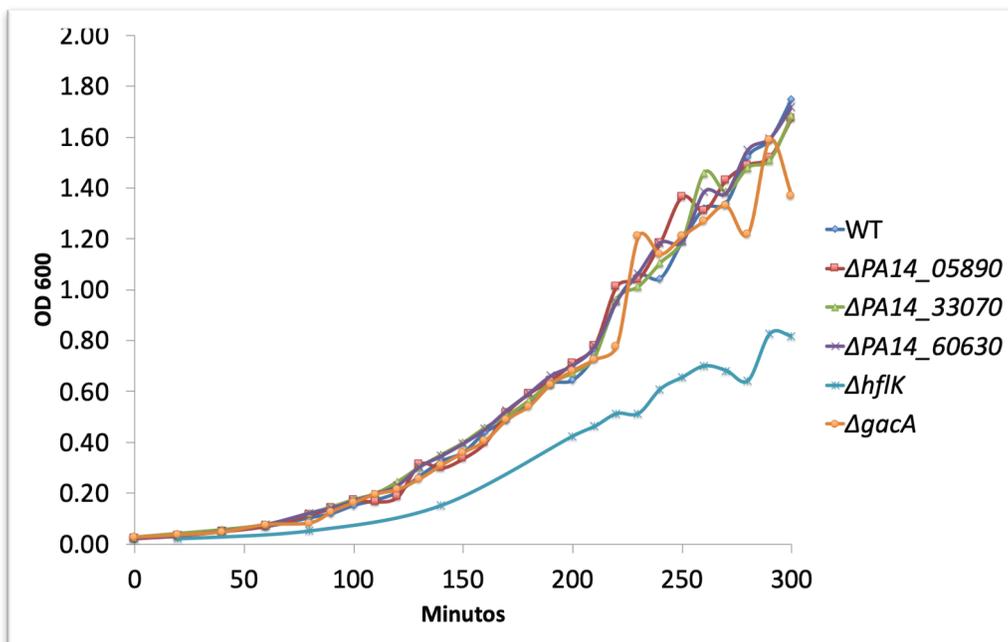


Figura 17. Curva de crecimiento de cepas con inserción de transposón en genes de proteínas con dominio SPFH de PA14 en medio LB. Los datos son el promedio de los valores obtenidos en dos experimentos independientes.

4. Medición de las actividades de proteasa alcalina y elastasa

Posteriormente, se evaluó si estas mismas interrupciones tuvieron algún efecto sobre las actividades de proteasa alcalina (Fig. 18 A) o de elastasa (Fig. 18 B). Aunque la actividad de proteasa alcalina sólo depende de la proteasa AprA, la actividad de elastasa depende de dos proteasas, LasA y LasB. Sin embargo, LasA no posee toda la capacidad elastolítica de LasB, y por ello comúnmente son denominadas estafilolisina y elastasa, respectivamente. LasA actúa de forma sinérgica incrementando la actividad de LasB⁸⁷. Los ensayos que mostramos a continuación no distinguen entre las actividades de estas dos elastasas.

AprA, LasA y LasB son importantes factores de virulencia de *P. aeruginosa* expresados durante la fase estacionaria. Las elastasas degradan proteínas que forman parte de las barreras físicas del hospedero, incluyendo el colágeno, e inhiben la quimiotaxis de los monocitos hacia el sitio de infección. La proteasa alcalina también degrada proteínas del hospedero, e incluso la flagelina monomérica de la bacteria, así evitando la detección por el sistema inmune⁸⁸.

Tanto la expresión genética de las elastasas como de la proteasa alcalina son reguladas directamente por el sistema de percepción de quórum Las. Otros estudios han demostrado que la eliminación genética del regulador transcripcional LasR provocó la ausencia del ARNm de las elastasas LasA¹²⁹, LasB¹³⁰ y de la proteasa alcalina AprA¹³¹ en las células de *P. aeruginosa*.

Se evaluaron las actividades de proteasa alcalina y elastasa incubando los sobrenadantes resultantes de la centrifugación de cultivos de toda la noche con sustratos para estas enzimas unidos a colorantes detectables por espectrofotometría, utilizados ampliamente para el estudio de *P. aeruginosa*. Así, la medición de la densidad óptica (OD)

del resultado de la reacción en la longitud de onda específica para el colorante utilizado permitía determinar cuantitativamente la actividad de elastasa o proteasa de la cepa dada. Los resultados se expresaron como la OD medida del resultado de cada reacción dividida entre la OD₆₀₀ del cultivo justo antes de ser centrifugado (Fig. 18).

Respecto a la actividad de la proteasa alcalina no se encontraron diferencias significativas entre ninguna cepa. Sin embargo, es probable que los ensayos hayan estado saturados porque tampoco se encontraron diferencias entre la WT y la cepa con interrupción en *gacA*. El sistema GacS/GacA regula positivamente el sistema de percepción de quórum mediado por LasR, el cual activa la expresión de la proteasa alcalina¹³¹, por lo que se esperaba que una cepa con *gacA* interrumpido contara con una actividad de proteasa alcalina disminuida.

En cuanto a las mediciones de actividad de elastasa, tres cepas tuvieron actividades significativamente menores respecto a la WT: las interrupciones de los genes *PA14_05890*, *PA14_60630* (las cuales cuentan con un dominio SPFH tipo eslipina) y *gacA*. Las interrupciones de los genes *PA14_33070* y *hflK* no provocaron efectos significativos.

El efecto sobre la interrupción de *gacA* coincide con lo reportado previamente¹³². Por otro lado, ya que las proteínas con dominio SPFH se asocian con la formación de microdominios membranales, estos resultados sugieren que estas dos proteínas podrían ser necesarias para el correcto ensamblaje de MMFs, que a su vez serían necesarios en el funcionamiento de las vías de señalización que regulan la expresión de las elastasas.

Por otro lado, como las elastasas son secretadas al medio extracelular, y es ahí donde fue medida su actividad, también es posible que la interrupción de estas proteínas con dominio SPFH afecte la biogénesis o el funcionamiento del SST2, que las transporta al exterior, o de los sistemas Sec o Tat, que las traslocan al periplasma. El SST2 es una nanomáquina molecular muy relacionada con los pili tipo IV o fimbrias, el cual secreta proteínas desde el periplasma, por lo que necesita que éstas previamente sean traslocadas al periplasma por medio de las vías Sec o Tat. *P. aeruginosa* cuenta con dos SST2 (Xcp y Hxc), de los cuales sólo el sistema Xcp secreta las elastasas, dado que el sistema Hxc sólo secreta un sustrato, la fosfatasa alcalina LapA^{133,134}.

En este sentido, sería interesante evaluar en el futuro si la actividad del sistema GacS/GacA o la secreción por los sistemas Sec, Tac o el SST2, se ven afectadas por la interrupción de estas proteínas con dominio SPFH.

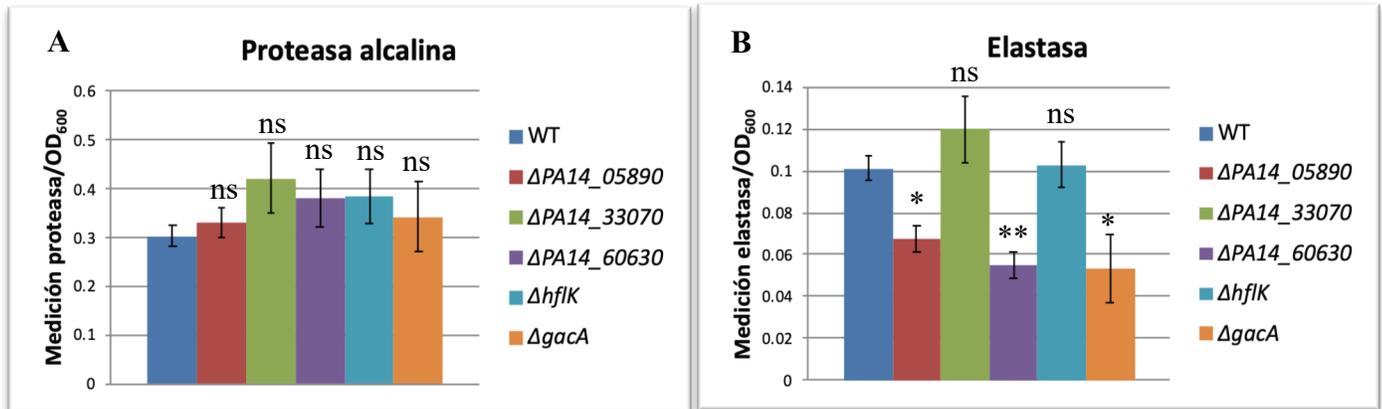


Figura 18. Actividades de proteasa alcalina (A) y elastasa (B) en sobrenadantes de cepas de PA14 con interrupciones en los genes que codifican proteínas con dominio SPFH, expresadas como OD medición/OD₆₀₀ del cultivo de toda la noche. Cada experimento fue repetido al menos 3 veces. Se indica el nivel de significancia estadística utilizando la prueba t de Student, comparando con la WT: ns, $P > 0.05$; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$.

5. Supervivencia de *Galleria mellonella*

El último fenotipo analizado en las cepas de colección fue el de su virulencia en las larvas de la polilla de la cera, *G. mellonella*. Previamente, Ausubel *et al* validaron el uso de este organismo para analizar los efectos de las eliminaciones de diversos genes de *P. aeruginosa* sobre su patogenicidad, dada la correspondencia de sus resultados con los encontrados con los modelos de quemadura en ratones⁹⁹ y de infección de células CHO (provenientes de mamíferos)¹³⁵, con una mayor correlación a estos últimos que los modelos en plantas o en *C. elegans*.

Se inyectaron cantidades estandarizadas de las cepas con interrupciones en proteínas con dominio SPFH a 10 larvas para cada experimento. Posteriormente, se siguió la supervivencia de éstas durante 5 días, cada 24 horas. La cepa WT tuvo un efecto consistente a lo largo de todos los experimentos, en el que menos del 20% de las larvas de *G. mellonella* sobrevivieron cuando se inyectaron 23 unidades formadoras de colonias (UFCs), pero alrededor del 80% sobrevivieron cuando se les inyectaron 3 UFCs (Fig. 19).

Las interrupciones de los genes *PA14_60630* (Fig. 19 A), *PA14_33070* (Fig. 19 B), y *hflK* (Fig. 19 C), no tuvieron ningún efecto significativo sobre la supervivencia de *G. mellonella*. En cambio, la interrupción del gen *PA14_05890* (Fig. 19 D) causó una mortalidad significativamente menor de las larvas que la cepa WT, demostrando que la disminución de la virulencia de PA14 provocada por la interrupción individual de proteínas con dominio SPFH tiene un efecto *in vivo*.

Esto puede estar relacionado con el hecho de que se encontró una menor actividad de elastasa en esta misma cepa. Como otro estudio mostró¹³⁶, el uso de inhibidores de la elastasa LasB son efectivos para disminuir la mortalidad de *G. mellonella* tras la infección de PA14. Pero el hecho de que en el presente estudio la interrupción de *PA14_60630*, también con una menor actividad de elastasa, no provocara ningún efecto, indica que existen otros fenotipos involucrados con la disminución de la virulencia *in vivo* de la cepa con interrupción en *PA14_05890*, además de la actividad de elastasa, por lo que sería interesante evaluar en el futuro si esta interrupción afectó la regulación, secreción o funcionamiento de otros factores de virulencia.

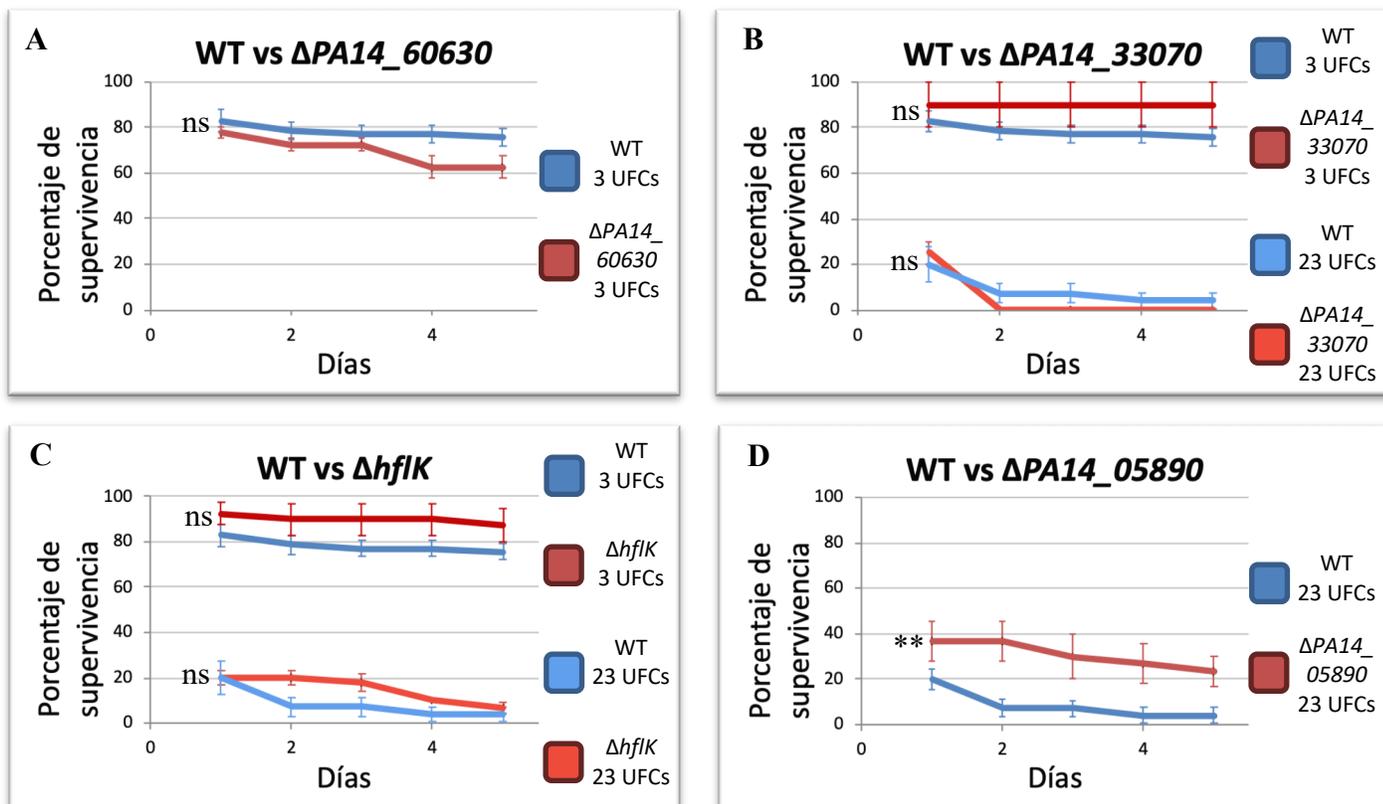


Figura 19. Curva de supervivencia de *G. mellonella* tras inyección con PA14 WT, comparada con las curvas de supervivencia provocadas por las cepas con interrupciones en los genes *PA14_60630* (A) *PA14_33070* (B), *hflK* (C), y *PA14_05890* (D). Se inyectaron 23 UFCs (± 4.78 UFCs) o 3 UFCs (± 0.44 UFCs) a cada larva de *G. mellonella*. Cada experimento fue repetido al menos 3 veces. Se indica el nivel de significancia estadística utilizando la prueba de Mantel-Cox, comparando con la cepa WT: ns, $P > 0.05$; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$.

6. Construcción de vectores para transformar a *P. aeruginosa*

Mientras se analizaban las cepas de colección, se trabajó en la eliminación de los operones completos donde se encuentran codificadas las proteínas con dominio SPFH *hflK* y *hflC*; *PA14_33070*, *PA14_33080* y *PA14_33110*; y en la eliminación del gen *PA14_16180*. Para realizarlo, se crearon vectores capaces de provocar el remplazo de estos genes por otro de resistencia a antibiótico en el cromosoma de *P. aeruginosa*, cuando ésta es transformada con el vector, y tras dos eventos de recombinación.

Se partió del plásmido suicida en *P. aeruginosa* pEx18Ap. En él se clonó entre los sitios de restricción SmaI-BamHI el gen de resistencia a apramicina/gentamicina *aac(3)IV*, proveniente del plásmido pIJ773 (ver Fig. 20). Ésta fue la base para proceder con tres clonaciones distintas para cada grupo de genes mencionado, agregando las regiones flanqueantes río arriba y río abajo de los operones seleccionados de forma que se localizaran alrededor del gen *aac(3)IV*. Las regiones río arriba de los genes de proteínas con dominio SPFH se clonaron como BamHI-HindIII, y las regiones río abajo se clonaron con extremos romos como EcoRI-EcoRI a excepción del caso de *hflKC*, que fue clonada como NotI-SmaI, con extremos romos por medio de Klenow. Los insertos de las regiones

flanqueantes río arriba fueron productos de PCR purificados y fosforilados, y los río abajo fueron productos de PCR insertados a pGEM. Con las clonaciones de extremos romos se desfosforilaron los extremos del plásmido para que no se religaran.

Al acercarse la finalización de los vectores completos para eliminar estos tres grupos de genes, se procedió a estandarizar en el laboratorio el proceso de electroporación de PA14 con el plásmido pBBR1MCS-3, de resistencia a tetraciclina. Habiéndolo logrado, se electroporaron los vectores construidos para que, tras dos selecciones de las células recombinantes, se generaran las nuevas cepas con deleciones; pero las transformaciones realizadas no tuvieron recombinaciones exitosas. Expertos en la transformación de *P. aeruginosa* nos explicaron que en la práctica la transformación de esta especie por medio de células quimiocompetentes es más efectiva que por medio de electroporación.

En un principio se había intentado construir el producto que contuviera el gen de resistencia *aac(3)IV* y las regiones flanqueantes de los operones seleccionados a través de PCRs que los fusionaran. Sin embargo, este procedimiento no fue exitoso y por ello se procedió con las clonaciones. Es decir, uno de los cebadores para amplificar la región río arriba del gen a eliminar compartía 20 nucleótidos con la secuencia del gen *aac(3)IV*. Lo mismo se hizo con la región río abajo del gen a eliminar, pero su cebador compartía 20 nucleótidos del otro extremo de la secuencia del gen *aac(3)IV*. Este traslapamiento permitiría que, tras haber sido desnaturalizados, los productos de PCR de la región río arriba (o río abajo) del gen a eliminar y el producto de PCR del gen *aac(3)IV* se pudieran hibridar por un extremo. Así, realizar una PCR con los cebadores de los extremos no hibridados permitiría unir estos dos productos de PCR. De esta forma se podría haber procedido para generar un solo producto de PCR que contara con la región río arriba del gen a eliminar, el gen de resistencia reemplazando el gen a eliminar, y la región río abajo del gen a eliminar. Posteriormente, este producto se habría clonado al plásmido suicida pEx18Ap para realizar la transformación de *P. aeruginosa* que llevaría a cabo a una doble recombinación y el remplazo del gen a eliminar con el gen de resistencia *aac(3)IV*. Sin embargo, como se notó previamente, a pesar de intentar realizar este procedimiento con diversas condiciones, no fue exitoso, y por ello se procedió a fusionar estos productos a través de clonaciones.

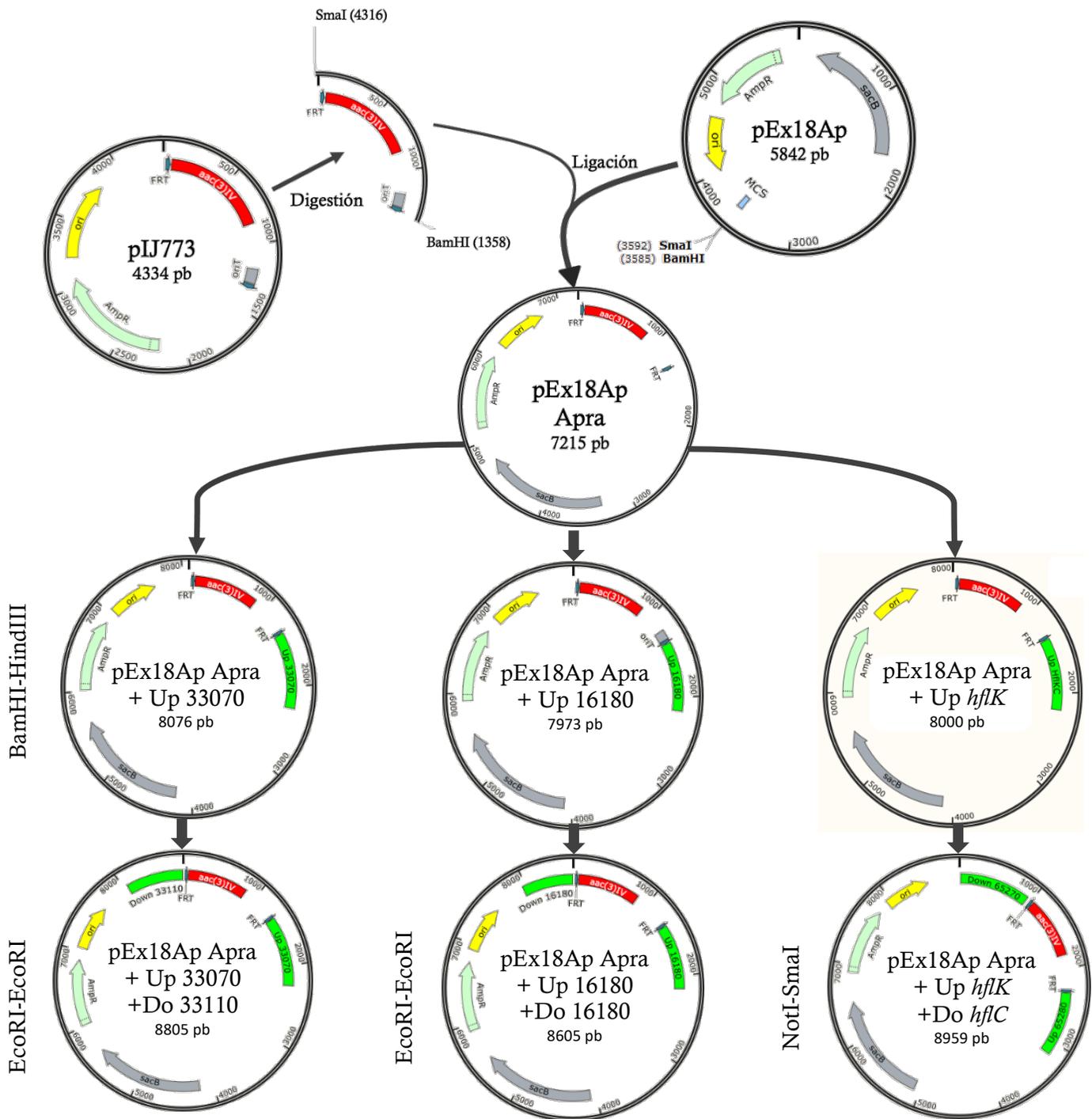


Figura 20. Pasos en la construcción de vectores para la eliminación de genes de proteínas con dominio SPFH de PA14. Ver descripción en el texto

7. Supervivencia de *G. mellonella* frente a cepas de EPEC con deleciones en genes que codifican proteínas con dominio SPFH

Para estudiar el efecto de la deleción de proteínas con dominio SPFH sobre la virulencia bacteriana en otro modelo, se realizaron experimentos con EPEC. Tanto la cepa no patógena de *E. coli* como EPEC cuentan con cuatro proteínas con dominio SPFH: HflK, HflC, YbbK y YqiK (Fig. 21). Cepas de EPEC con deleciones individuales y múltiples en estas proteínas ya habían sido construidas previamente en el laboratorio. Otras investigaciones han mostrado el uso de *G. mellonella* como modelo para estudiar la virulencia de EPEC¹³⁷⁻¹³⁹.

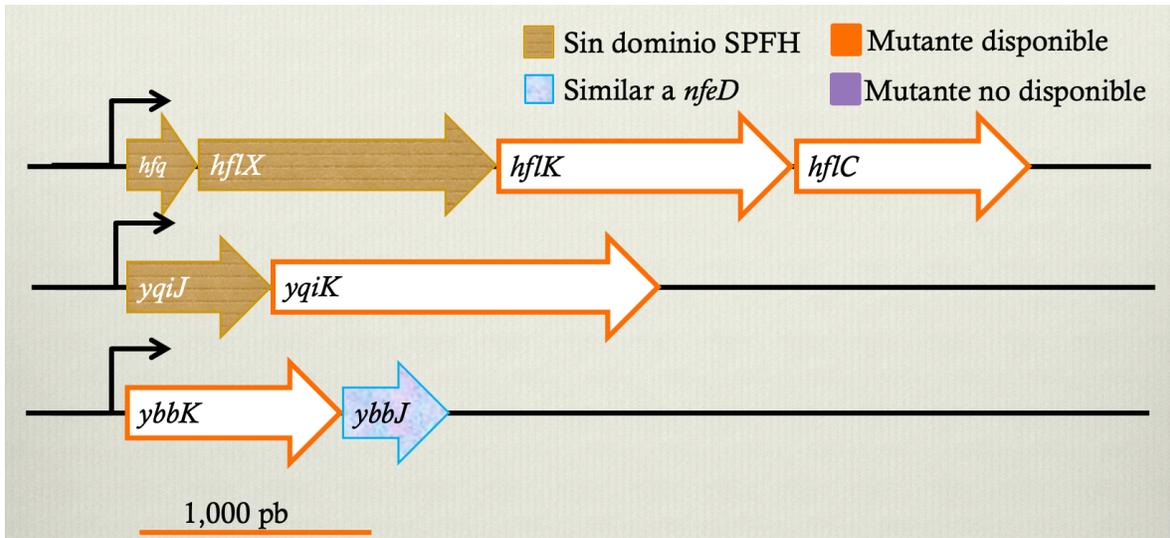


Figura 21. Representación de los operones de EPEC donde se codifican proteínas con dominio SPFH.

Primeramente, se comparó la mortalidad provocada a larvas de *G. mellonella* por la cepa silvestre con la provocada por una cepa con deleciones en los cuatro genes que codifican proteínas con dominio SPFH ($\Delta hflKC\Delta ybbK\Delta yqiK$). Ambas cepas fueron cultivadas en medio DMEM suplementado (ver métodos), necesario para la expresión de sus factores de patogenicidad. Utilizando tanto 10^5 como 10^6 UFCs de estas cepas, la deleción de todas las proteínas con dominio SPFH provocó una mortalidad significativamente menor (Figs. 22 A, B y C).

Habiendo comprobado que la cepa MG1655 de *E. coli* no provoca mortalidad bajo las condiciones evaluadas para EPEC (no mostrado), se entiende que efectivamente los factores de virulencia de esta última son los responsables. Esto es importante porque las larvas de *G. mellonella* no son particularmente sensibles a EPEC, ya que para provocar mortalidad se necesita de 10^5 UFCs, es decir, cuatro órdenes de magnitud más que con *P. aeruginosa*.

Dado el efecto de la cepa $\Delta hflKC\Delta ybbK\Delta yqiK$, se realizó el mismo experimento con las cepas disponibles $\Delta hflKC$ y $\Delta ybbK\Delta yqiK$. Así, se descubrió que ambas provocan una mortalidad significativamente menor que la WT (Fig. 22 D). Al mismo tiempo, la cepa $\Delta ybbK\Delta yqiK$ provocó una mortalidad significativamente menor que la cepa $\Delta hflKC$.

Entonces, se siguió el mismo procedimiento para comparar las cepas $\Delta ybbK$, por un lado, y $\Delta yqiK$, por el otro. De nuevo, ambas provocaron una mortalidad significativamente

menor que la cepa WT, con la cepa $\Delta yqiK$ teniendo un efecto significativamente menor al de la cepa $\Delta ybbK$ (Fig. 22 E).

Por último, para empezar a comprender las razones por las que existen estos efectos, se evaluó la mortalidad provocada por la cepa con la delección del gen *escN*, el cual es necesario en el funcionamiento del SST3 de EPEC, pero no se encontraron diferencias significativas (Fig. 22 F). Esto indica que el SST3 no es el que está provocando la mortalidad de *G. mellonella*, sino que debe ser otro factor de virulencia de EPEC.

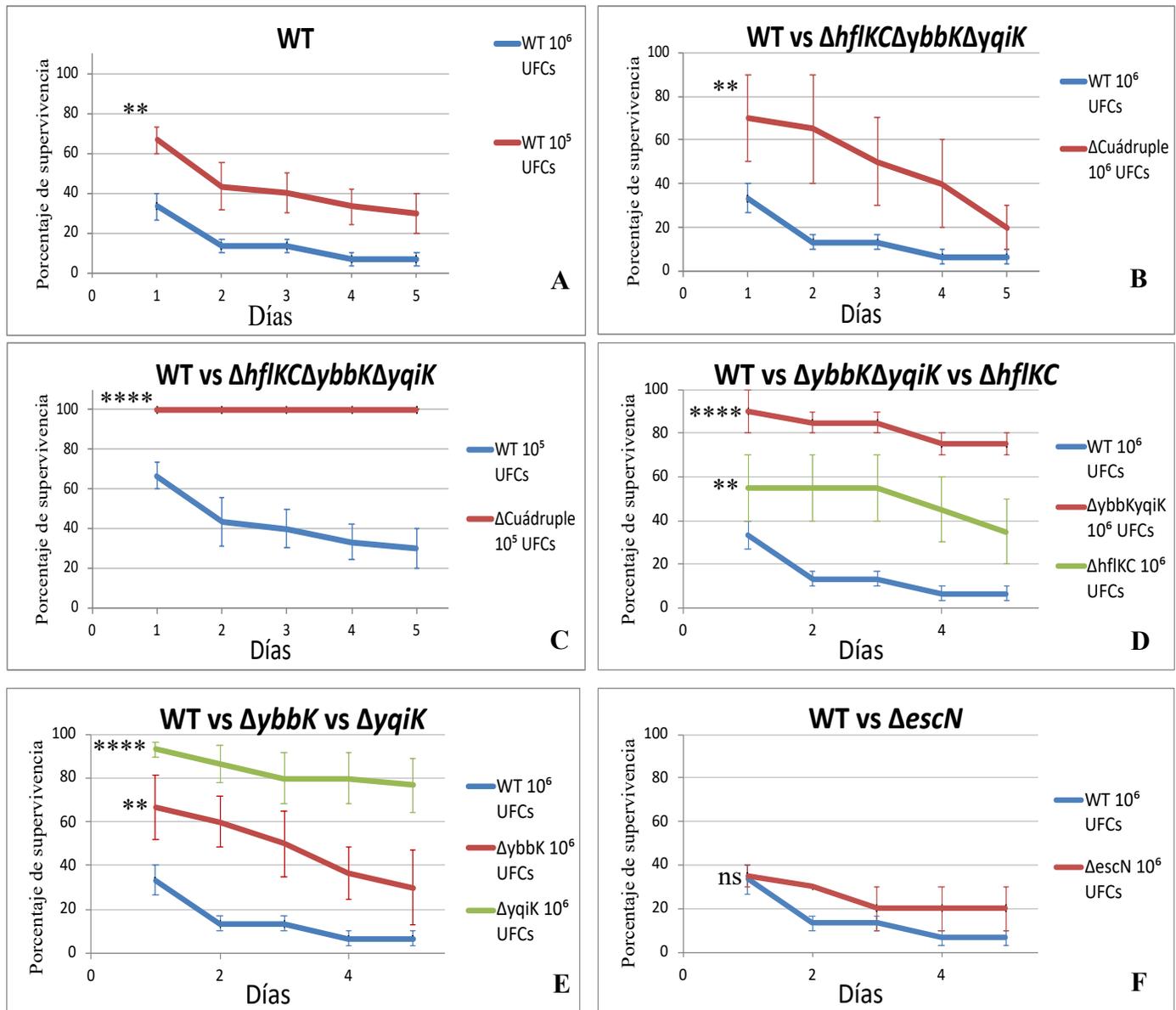


Figura 22. Curva de supervivencia de *G. mellonella* tras inyección con 10^5 y 10^6 UFCs de EPEC WT (A) y comparación de éstas con las de las cepas $\Delta hflKC\Delta ybbK\Delta yqiK$ (B y C), $\Delta ybbK\Delta yqiK$ y $\Delta hflKC$ (D), $\Delta ybbK$ y $\Delta yqiK$ (E), y $\Delta escN$ (F). Experimentos repetidos al menos dos veces. Se indica el nivel de significancia estadística utilizando la prueba de Mantel-Cox, comparando con la cepa WT: ns, $P > 0.05$; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$.

Este último resultado contradice lo que se obtuvo en el primer estudio de la virulencia de EPEC sobre *G. mellonella*, realizado por Leuko y Raivio en 2012. En él, la cepa $\Delta escN$ provocó una mortalidad aproximadamente 100 veces menor que la WT¹³⁷. Esto significaría que el SST3 juega un papel importante en la mortalidad de *G. mellonella* provocada por EPEC. Sin embargo, en este mismo estudio no se encontró ninguna célula de EPEC adherida a ningún tejido de *G. mellonella*, un fenómeno que se esperaría si es que el SST3 mediara la virulencia en este modelo. Es más, Leuko y Raivio también reportaron que la irrupción de la vía Cpx, la cual sobreexpresa los genes del SST3¹¹⁷, no aumentó la mortalidad provocada por EPEC a *G. mellonella*, como se esperaría si este sistema de secreción jugara un papel en su virulencia, sino que la disminuyó ligeramente (ver Fig. 23).

Estudios posteriores tampoco han favorecido la hipótesis del papel del SST3 en la virulencia de EPEC sobre *G. mellonella*: en una investigación realizada en 2014 con EHEC, otros investigadores no encontraron ningún efecto significativo sobre la mortalidad de *G. mellonella* tras haber eliminado a *escN* o tras haber sobreexpresado su SST3¹⁴⁰. En 2016, otra investigación demostró que *G. mellonella* es un buen modelo para el estudio de la patogenicidad de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), una *E. coli* patógena que no cuenta con el SST3¹⁴¹. Finalmente, nuestros resultados son muy claros en que la cepa $\Delta escN$ no tiene ningún efecto. Esto lleva a pensar que el papel del SST3 en la virulencia de EPEC sobre *G. mellonella* es menor de lo que se reportó originalmente.

Por otro lado, las fimbrias de EPEC, otro mecanismo de su virulencia, también han sido estudiadas con relación a la patogenicidad contra *G. mellonella*: Leuko y Raivio reportaron que las cepas de EPEC que tenían eliminados los genes que codifican las fimbrias (*bfpA-L*), contaban con la misma virulencia en *G. mellonella* que la cepa WT¹³⁷. Es más, cepas atípicas de EPEC, que característicamente no cuentan con fimbrias, también provocan mortalidad en las larvas de *G. mellonella*, de la misma forma que la EPEC típica¹³⁸.

Este conjunto de evidencias hace pensar que ninguno de estos dos sistemas es responsable de la virulencia de EPEC sobre *G. mellonella*. Y esto corresponde con el conocimiento establecido acerca de la patogenicidad bacteriana en los insectos: en general, las bacterias que no son patógenos naturales de un insecto, es decir, que no cuentan con mecanismos que les permitan ingresar a él a menos que sea por una herida, y que son llamados patógenos potenciales u oportunistas, lo matan al secretar toxinas en su hemolinfa, provocando la lisis celular, así liberando nutrientes para las bacterias en división, y provocando una septicemia; no por mecanismos especializados, como lo hacen los patógenos naturales^{142,143}.

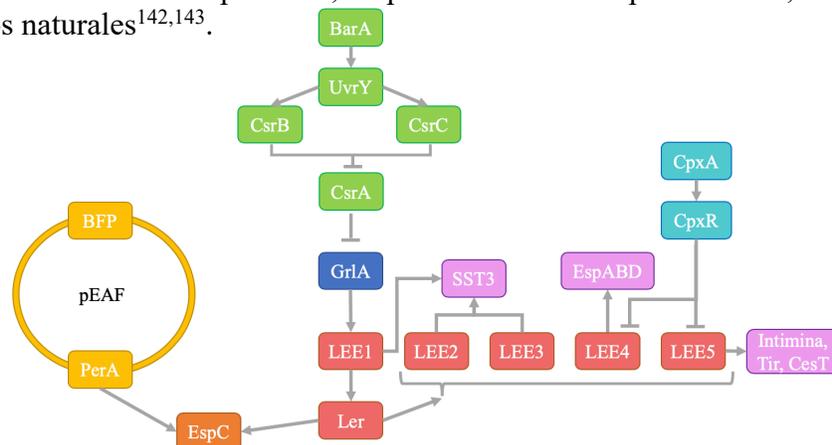


Figura 23. Esquema de la regulación de la virulencia de EPEC discutida aquí. Basado en^{102,109,144}.

Así, se hace necesario cambiar la atención hacia la principal toxina de EPEC: EspC, miembro de la familia de las proteasas de serinas de *Enterobacteriaceae*, todas las cuales se encuentran relacionadas con la virulencia¹⁴⁵.

De las seis proteínas que se sabe que secreta EPEC, sólo EspC tiene un mecanismo de secreción independiente del SST3, llamado de autotransporte o SST5a. Este proceso inicia cuando la toxina, por su secuencia señal, es dirigida a la membrana interna, normalmente dependiendo de la chaperona SecB, y es transportada al periplasma por el sistema Sec. En el periplasma, la proteína adquiere una conformación de barril β , similar al de proteínas de la membrana externa (como PhoE en *E. coli*), que le permite insertarse en la membrana externa. Finalmente, el extremo amino de la proteína, que contiene el dominio efector, puede pasar a través del poro que forma su propio barril β , ser escindido y liberado. Se llama sistema de autotransporte porque, una vez en el periplasma, su secreción al medio extracelular no necesita de fuentes de energía o de chaperonas accesorias¹⁴⁵.

EspC puede ingresar a las células sin necesidad del SST3, aunque no lo hace eficientemente, y causa daño a las células epiteliales a través de su actividad de proteasa de serinas sobre la espectrina α II (también llamada fodrina), del citoesqueleto¹¹⁵. Aunque es menos tóxica que su homóloga en EAEC, llamada Pet¹¹⁵, es capaz por sí sola de provocar muerte celular¹⁴⁶.

El hecho de que la citotoxicidad y secreción de EspC sean independientes del SST3 da una posible explicación a nuestro resultado de que la virulencia de EPEC en *G. mellonella* no se ve disminuida por una delección de *escN*. Si fuera cierto que la virulencia de EPEC en la polilla de la cera no depende del SST3, sino de la toxina EspC, esto explicaría por qué es necesario inyectar cantidades tan altas de UFCs de EPEC para provocar la mortalidad de *G. mellonella*, ya que esta toxina es poco efectiva cuando sólo se encuentra en el medio extracelular. Para contrastar: en los estudios *in vivo* con conejos, el uso de 10^5 UFCs de EPEC, la misma cantidad utilizada en nuestro estudio para *G. mellonella*, provocan una enfermedad y una pérdida de peso tan severas que se hace obligatoria la eutanasia de todos los sujetos experimentales¹⁴⁷.

Es más, esto explicaría por qué nuestros resultados son tan contundentes en EPEC y no en PA14: un efecto sobre la elastasa de PA14 no representa un cambio cualitativo respecto al arsenal de toxinas con las que cuenta esta bacteria. En cambio, EPEC sólo cuenta con una toxina no secretada por el SST3, y afectarla cambiaría drásticamente su virulencia.

Es decir, estas evidencias apuntan hacia una posible conexión entre el funcionamiento de las proteínas con dominio SPFH de EPEC y la regulación o secreción de EspC, la cual debería ser probada experimentalmente en el futuro.

Respecto a la regulación de EspC, se mencionó previamente que en nuestro propio laboratorio se ha encontrado una conexión entre los MMFs y el sistema de dos componentes BarA/UvrY, uno de los reguladores centrales de la virulencia de EPEC, ya que la eliminación doble de *hflKC* en la cepa WT de *E. coli* provoca la activación temprana del sistema de dos componentes BarA/UvrY y que éste se mantenga activado durante etapas tardías de la fase estacionaria (Georgellis *et al*, no publicado). Sin embargo, no se esperaría que este efecto sobre el sistema BarA/UvrY regulara negativamente la expresión genética de *espC* (Fig. 23): la activación prolongada del sistema BarA/UvrY provocaría la prolongación de la ventana de tiempo en la que se da el secuestro de la proteína reguladora CsrA, la cual entonces no podría inhibir traduccionalmente a *grlA*, el cual por lo tanto podría activar la transcripción de *ler*, que finalmente activaría la transcripción de *espC*¹⁰⁹.

En cambio, respecto a la secreción de EspC, aunque hasta ahora no se ha reportado ninguna conexión directa entre el SST5 y las balsas lipídicas o los MMFs, nuestro laboratorio reportó que componentes del sistema de secreción Sec, del que depende la traslocación de EspC al periplasma, se encuentran en la proteómica de las DRMs de *E. coli*⁸³. Es decir, que posiblemente la eliminación de las proteínas con dominio SPFH de EPEC podría afectar al sistema Sec, lo que interrumpiría la secreción de EspC, explicando en parte nuestros resultados. Esto concordaría con los resultados obtenidos por otros investigadores con *B. subtilis*, ya que la cepa carente de los genes que codifican sus proteínas con dominio SPFH y la cepa $\Delta yisP$, el gen necesario en la producción de lípidos carotenoides de esta bacteria, contaban con una secreción proteica disminuida por un 25-40%¹⁴⁸. Es más, la presencia de componentes del sistema Sec en las DRMs de bacterias ya se ha reportado previamente en *B. subtilis*⁶⁶, *S. aureus*^{70Supl.}, *E. coli*⁸³, y *B. burgdorferi*¹⁴⁹. Sin embargo, es importante remarcar que éstas sólo son hipótesis, que deberían ponerse a prueba experimentalmente en el futuro.

Por otro lado, es necesario resaltar el detalle de que nuestros resultados muestran la existencia de dos niveles distintos y definidos de supervivencia de *G. mellonella* provocados por las distintas cepas de EPEC con deleciones en proteínas con dominio SPFH: uno que progresa del 100 al 80% a lo largo de la curva de supervivencia, representado por la cepa $\Delta yqiK$, y otro que progresa del 60 al 30%, representado por las cepas $\Delta ybbK$, $\Delta hflKC$, y $\Delta hflKC\Delta ybbK\Delta yqiK$. Y es necesario notar que ninguna de estas deleciones anuló por completo la virulencia de EPEC. Esto indica que pueden existir, por un lado, dos formas (o más) distintas en las que la eliminación de estas proteínas con dominio SPFH afecta la virulencia de EPEC, y/o, incluso, la existencia otras toxinas o factores de virulencia de EPEC; de las 27 proteínas secretadas por EPEC, sólo unas pocas son secretadas por un mecanismo independiente al SST3 no caracterizado todavía¹⁵⁰.

CONCLUSIONES

- La interrupción del gen *hflK* de PA14 ralentizó su crecimiento.
- Las interrupciones individuales en los genes que codifican las proteínas con dominio SPFH *PA14_05890* y *PA14_60630* disminuyeron significativamente la actividad de elastasa encontrada en los sobrenadantes de PA14.
- La interrupción de *PA14_05890* provoca una mortalidad significativamente menor sobre el modelo *G. mellonella*.
- Se construyeron vectores para la posterior eliminación de genes de otras proteínas con dominio SPFH en PA14.
- Le eliminación de los genes que codifican las proteínas con dominio SPFH de EPEC causó una disminución significativa de su mortalidad sobre *G. mellonella*, por medio de una vía independiente del SST3.

PERSPECTIVAS

- Para analizar más detalladamente el papel de las proteínas con dominio SPFH de PA14 en su virulencia, finalizar la construcción de las cepas con eliminaciones en los genes que codifican estas proteínas para analizar sus fenotipos. Como se señaló, es probable que transformar a PA14 por medio de células quimiocompetentes sea más eficiente para realizar el remplazo de los genes de proteínas con dominio SPFH con genes de resistencia a antibióticos. En este proceso, habría que prestar especial atención en el gen *PA14_16180*, cuya proteína cuenta con un dominio SPFH tipo YqiK, debido a la fuerte disminución que la deleción de *yqiK* provocó en la virulencia de EPEC.
- Dado que la localización focalizada de las proteínas con dominio SPFH de PA14 en su membrana y su presencia en DRMs serían evidencias de la existencia de MMFs en esta bacteria, generar fusiones de los genes de proteínas con dominio SPFH de PA14 con genes reporteros para determinar su localización en la membrana y en DRMs.
- Comprobar si la interrupción de los genes *PA14_05890* y *PA14_60630* tiene efectos sobre el funcionamiento del sistema GacS/GacA de PA14. Esto debido a que la interrupción de estos genes afectó la actividad del factor de virulencia elastasa, a que la expresión de la elastasa está regulada en última instancia por el sistema de dos componentes GacS/GacA, y a que en resultados no publicados de nuestro laboratorio la eliminación de los genes *HflK* y *HflC* de *E. coli* afectó el funcionamiento del sistema de dos componentes BarA/UvrY (homólogo al sistema GacS/GacA de *P. aeruginosa*). Esto podría realizarse en las cepas con interrupciones en estos genes a través de fusiones transcripcionales de *lacZ* a *rsmY* o *rsmZ*, y ensayos para medir la actividad de β -galactosidasa.
- Dado que una hipótesis que surge con este estudio es que los efectos encontrados tanto en la disminución de la virulencia de EPEC como en la actividad de elastasa de PA14 tras la eliminación o interrupción de genes que codifican proteínas con dominio SPFH podrían explicarse por un efecto sobre el sistema Sec, estudiar si las

cepas mutantes de EPEC o PA14 donde se encontraron estos efectos realmente pueden afectar su funcionamiento. Esto se determinó previamente en *B. subtilis*, analizando si componentes del sistema Sec interactúan con FloT (antes llamada YuaG), determinando si colocalizan en la membrana, y midiendo la eficiencia de secreción en las cepas de *B. subtilis* donde se deletó el gen de esta proteína con dominio SPFH¹⁴⁸.

- Analizar el efecto de la delección individual de los genes *hflK* y *hflC* en EPEC sobre su virulencia en *G. mellonella*, ya que estos experimentos no pudieron realizarse en este estudio.
- Utilizar de nuevo el modelo de *G. mellonella* para evaluar la hipótesis de que la toxina de EPEC, EspC, posiblemente sea responsable por la virulencia de esta bacteria en el modelo de la polilla de la cera. Esto podría realizarse con una cepa de EPEC con una eliminación del gen *espC*.

MÉTODOS

Curva de crecimiento

A partir de un cultivo de toda la noche (16 horas) de la cepa de interés, realizado en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C y en agitación a 250 rpm, se inocularon 30 mL de medio LB estéril de forma que el medio inoculado contara con una OD₆₀₀ de 0.025. Este nuevo cultivo se incubó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL a 37°C y en agitación a 250 rpm. A partir del inicio de la incubación, se tomaron muestras cada 20 minutos para medir su OD₆₀₀ hasta que el cultivo alcanzó una OD₆₀₀ de 0.1; desde ese momento las mediciones se realizaron cada 10 minutos.

Medición de actividades de proteasa alcalina y elastasa de *P. aeruginosa*

Se midió la OD₆₀₀ de un cultivo de toda la noche (16 horas), realizado en medio Luria-Bertani a 37°C y en agitación a 250 rpm, de la cepa elegida, para inmediatamente después centrifugar 1 mL de él por 5 min a 7,000 rpm (4,000 xg) y aislar el sobrenadante resultante. Este sobrenadante se utilizó tanto para medir la actividad de proteasa alcalina como de elastasa.

Para la reacción de proteasa alcalina, se añadieron 50 µL de ese sobrenadante a un tubo tipo Eppendorf junto con 950 µL de amortiguador para proteasa alcalina (Tris-HCl 20 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 8.0) y entre 5.5 y 6.5 mg de Hide-Remazol Brilliant Blue. La reacción se dejó progresar por 30 min a 37°C y en agitación a 250 rpm. Tras ello, se centrifugó la reacción por 5 min a 13,000 rpm (13,800 xg) y se separó el sobrenadante del sustrato residual de la enzima. Finalmente, se midió este sobrenadante a 595 nm en un espectrofotómetro. Si esta OD superaba el rango de medición del espectrofotómetro, se realizaba una dilución 1:1 con amortiguador de proteasa alcalina para repetir la medición, subsecuentemente corrigiendo la OD resultante multiplicándola por 2. Todo este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra analizada, y si es que los duplicados diferían ampliamente en sus resultados, esos datos se desechaban. Como control, se siguió el mismo procedimiento partiendo con 50 µL de medio LB en vez del sobrenadante del cultivo de toda la noche centrifugado. Protocolo basado en¹⁵¹.

Para la reacción de elastasa, se tomaron 100 µL del sobrenadante proveniente del cultivo de toda la noche centrifugado y se diluyeron 1:10 con amortiguador de elastasa (Tris-HCl 100 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.5), para después tomar 50 µL de esta dilución y agregarlos a un tubo tipo Eppendorf junto con 950 µL de amortiguador de elastasa y entre 5.5 y 6.5 mg de Elastin-Congo red. La reacción se dejó incubando por 2 horas a 37°C y en agitación a 250 rpm, asegurándose cada 30 min de resuspender el sustrato si es que se había precipitado al fondo del tubo. Tras ello, se centrifugó esta incubación a 13,000 rpm (13,800 xg) por 3 min y se separó el sobrenadante del sustrato residual de la enzima. Finalmente, se midió este sobrenadante a 495 nm en un espectrofotómetro. Si esta OD superaba el rango de medición del espectrofotómetro, se realizaba una dilución 1:1 con amortiguador de elastasa para repetir la medición, subsecuentemente corrigiendo la OD resultante multiplicándola por 2. Todo este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra analizada, y si es que los duplicados diferían ampliamente en sus resultados, esos datos se desechaban. Como control, se siguió el mismo procedimiento partiendo con 100 µL de medio LB en vez del sobrenadante del cultivo de toda la noche centrifugado. Protocolo basado en¹⁵².

Los resultados de ambos ensayos se expresaron como OD de la reacción/OD₆₀₀ del cultivo y se evaluó su significancia estadística utilizando la prueba t de Student.

Infección de *G. mellonella* con PA14

Un cultivo de toda la noche (16 horas) de la cepa requerida, realizado en LB a 37° y en agitación a 250 rpm, fue diluido con este mismo medio de cultivo para que contara con una OD₆₀₀ de 1, confirmando de nuevo esta OD₆₀₀ final en el espectrofotómetro. A partir de ella, se realizó una serie de diluciones 1:10 en solución salina al 0.9% estéril hasta la séptima dilución (10⁻⁷). Posteriormente, se inyectó con jeringas de insulina de 0.3 mL a 10 larvas (en su último estadio) de

G. mellonella con 20µL de la dilución seleccionada (10^{-6} o 10^{-7}). La inyección se realizó en el centro de la larva entre las últimas y las penúltimas pseudopatas, con una inclinación de 45 grados, de forma que la aguja llegara al centro de la larva. Tras inyectar, se sembraron por duplicado 100µL de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} en placas con LB agar al 1.5% para contar UFCs. Finalmente, se incubaron las larvas inyectadas en grupos de 5 a 37°C en cajas Petri y se les dio seguimiento cada 24 horas por 5 días, registrando su curva de supervivencia. Como control, en cada experimento se inyectaron 5 larvas con solución salina siguiendo el mismo procedimiento. Se analizó la significancia estadística de las curvas de supervivencia utilizando la prueba de Mantel-Cox. Basado en^{153,154}.

Infección de *G. mellonella* con EPEC

Se incubó un cultivo de toda la noche (16 horas) de la cepa requerida de EPEC en LB, a 37°C y en agitación a 250 rpm. Posteriormente, se inoculó la cepa en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco), suplementado con 1% de LB y 4 mg/litro de clorhidrato de piridoxal (Sigma), que es necesario para la expresión de su virulencia, de forma que el medio inoculado contara con una OD₆₀₀ de 0.05. Este nuevo cultivo se incubó a 37°C y en agitación a 250 rpm hasta que llegara a una OD₆₀₀ entre 0.5 y 0.6. Para detener su crecimiento, se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó a 6,500 rpm (3,450 xg) por 5 min, para inmediatamente remover el DMEM suplementado y remplazarlo con 1 mL de solución salina al 0.9% estéril. A partir de ella, se realizó una serie de diluciones 1:10 con solución salina estéril al 0.9% hasta la séptima dilución (10^{-7}). Se inyectaron 10 larvas (en su último estadio) de *G. mellonella* con 20µL de la dilución 10^0 y 10 larvas con la dilución 10^{-1} . Tras inyectar, se sembraron por duplicado 100µL de las diluciones 10^{-7} y 10^{-6} en cajas Petri con LB agar al 1.5% para contar UFCs. Finalmente, se incubaron en grupos de 5 las larvas inyectadas a 37°C en cajas Petri y se les dio seguimiento cada 24 horas por 5 días, registrando su curva de supervivencia. Se analizó la significancia estadística de las curvas de supervivencia utilizando la prueba de Mantel-Cox. Basado en¹³⁷⁻¹³⁹.

Anexo 1. Porcentajes de identidad y de similitud entre las proteínas con dominio SPFH de *E. coli* y *B. subtilis*, y las proteínas candidatas de PA14

Candidatas en el genoma de PA14, tamaño (localización en el genoma)	Tipo de dominio SPFH	Identidad con HfPK de <i>E. coli</i> (de 419 a.á.)	Similitud con HfPK de <i>E. coli</i> (de 419 a.á.)	Identidad con HfPC de <i>E. coli</i> (de 334 a.á.)	Similitud con HfPC de <i>E. coli</i> (de 334 a.á.)	Identidad con YbbK de <i>E. coli</i> (de 305 a.á.)	Similitud con YbbK de <i>E. coli</i> (de 305 a.á.)	Identidad con YqiK de <i>E. coli</i> (de 553 a.á.)	Similitud con YqiK de <i>E. coli</i> (de 553 a.á.)	Identidad con FloT de <i>B. subtilis</i> (de 509 a.á.)	Similitud con FloT de <i>B. subtilis</i> (de 509 a.á.)
PA14_05890, de 264 a.á. (522,237 – 523,031)	Eslipinas similares a estomatina	27% en 169 a.á. (45 identidades)	47% en 169 a.á. (80 similitudes)	22% en 236 a.á. (53 identidades)	43% en 236 a.á. (101 similitudes)	40% en 166 a.á. (66 identidades)	63% en 166 a.á. (105 similitudes)	—	—	22% en 183 a.á. (40 identidades)	42% en 183 a.á. (76 similitudes)
PA14_16180, de 688 a.á. (1,376,662 – 1,378,728)	YqiK	—	—	—	—	—	—	29% en 442 a.á. (128 identidades)	50% en 442 a.á. (219 similitudes)	25% en 304 a.á. (77 identidades)	48% en 304 a.á. (147 similitudes)
PA14_33070, de 666 a.á. (2,895,611 – 2,897,611)	HfPK	22% en 304 a.á. (67 identidades)	35% en 304 a.á. (106 similitudes)	—	—	22% en 291 a.á. (65 identidades)	39% en 291 a.á. (113 similitudes)	—	—	—	—
PA14_33080, de 337 a.á. (2,897,623 – 2,898,636)	HfPC	26% en 265 a.á. (69 identidades)	44% en 265 a.á. (117 similitudes)	24% en 307 a.á. (73 identidades)	46% en 307 a.á. (141 similitudes)	23% en 232 a.á. (54 identidades)	45% en 232 a.á. (104 similitudes)	—	—	—	—
PA14_33110, de 346 a.á. (2,898,633 – 2,899,673)	HfPK	24% en 306 a.á. (73 identidades)	37% en 306 a.á. (114 similitudes)	—	—	—	—	—	—	—	—
PA14_41420, de 443 a.á. (3,693,088 – 3,694,419)	HfPC	—	—	35% en 97 a.á. (34 identidades)	52% en 97 a.á. (50 similitudes)	—	—	—	—	—	—
PA14_60630, de 381 a.á. (5,403,895 – 5,405,040)	Eslipinas similares a estomatina	—	—	25% en 72 a.á. (18 identidades)	50% en 72 a.á. (36 similitudes)	22% en 125 a.á. (28 identidades)	51% en 125 a.á. (64 similitudes)	—	—	—	—
PA14_65270, HfPC, de 289 a.á. (5,816,307 – 5,817,176)	HfPC	25% en 173 a.á. (44 identidades)	53% en 173 a.á. (91 similitudes)	39% en 327 a.á. (128 identidades)	60% en 327 a.á. (197 similitudes)	28% en 217 a.á. (61 identidades)	52% en 217 a.á. (113 similitudes)	—	—	—	—
PA14_65280, HfPK, de 400 a.á. (5,817,176 – 5,818,378)	HfPK	47% en 367 a.á. (171 identidades)	62% en 367 a.á. (228 similitudes)	23% en 311 a.á. (71 identidades)	41% en 311 a.á. (127 similitudes)	23% en 230 a.á. (54 identidades)	48% en 230 a.á. (110 similitudes)	—	—	—	—

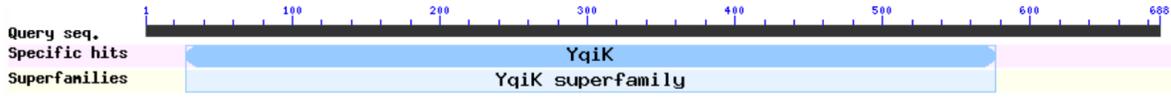
Las proteínas de PA14 con mayor puntaje (en bits), como resultado del PSI-BLAST, se ilustran con los colores más oscuros.

Anexo 2. Dominios conservados en las proteínas candidatas de PA14

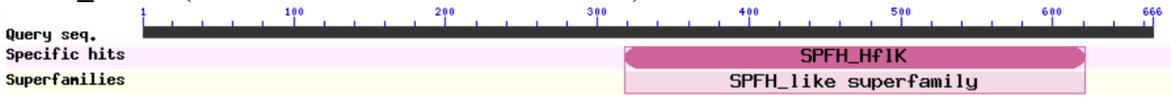
PA14_05890 (con dominio SPFH en aá. 53-230)



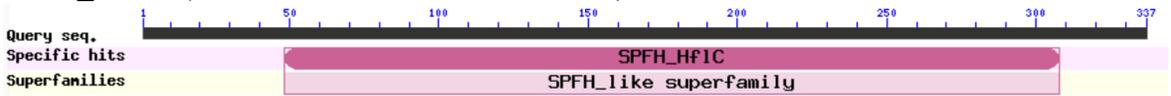
PA14_16180 (con dominio YqiK, miembro de los dominios SPFH, en aá. 28-577)



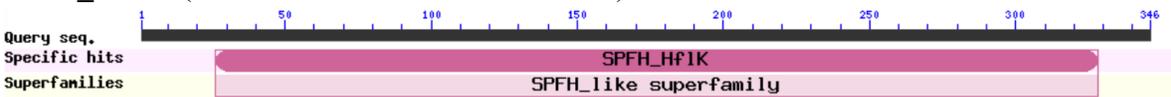
PA14_33070 (con dominio SPFH en aá. 318-621)



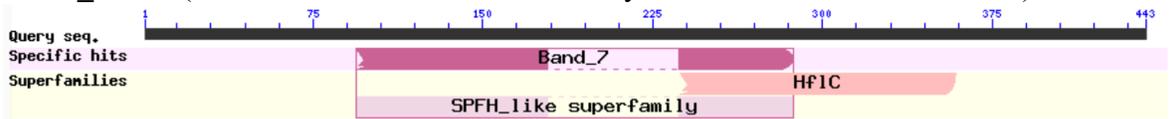
PA14_33080 (con dominio SPFH en aá. 48-308)



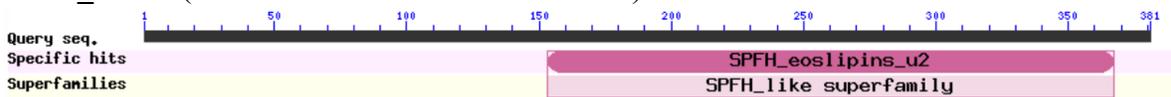
PA14_33110 (con dominio SPFH en aá. 26-328)



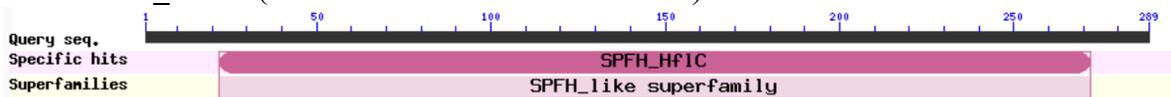
PA14_41420 (con dominio SPFH en aá. 94-287 y dominio HfIC en aá. 237-359)



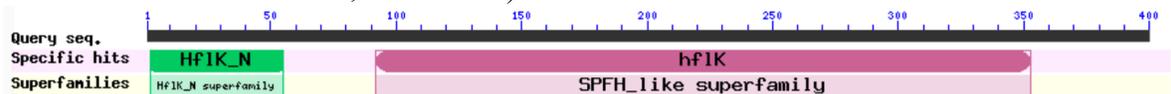
PA14_60630 (con dominio SPFH en aá. 153-367)



HfIC/PA14_65270 (con dominio SPFH en aá. 22-272)



HfIK/PA14_65280 (con dominio SPFH en aá. 92-353 y dominio HfIK_N, que ancla HfIK a la membrana en bacterias, en aá. 2-55)



REFERENCIAS

1. Alberts, B. *et al. Molecular Biology of the Cell*. (Garland Science, 2015).
2. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J. J. & Stryer, L. *Biochemistry*. (W. H. Freeman and Company, 2015).
3. Koonin, E. V. The origins of cellular life. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **106**, 27–41 (2014).
4. Murat, D., Byrne, M. & Komeili, A. Cell biology of prokaryotic organelles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–18 (2010).
5. Lombard, J. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biol. Direct* **9**, 32 (2014).
6. Singer, S. J. *The Molecular Organization of Biological Membranes. Structure and Function of Biological Membranes* (1971). doi:10.1016/b978-0-12-598650-2.50009-0.
7. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (80-)*. **175**, 720–731 (1972).
8. Kusumi, A. *et al.* Dynamic Organizing Principles of the Plasma Membrane that Regulate Signal Transduction: Commemorating the Fortieth Anniversary of Singer and Nicolson’s Fluid-Mosaic Model. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 215–250 (2012).
9. Nicolson, G. L. The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 1451–1466 (2014).
10. Stoerkenius, W. & Engelman, D. M. Current Models for the Structure of Biological Membranes. *J. Cell Biol.* **42**, 613–646 (1969).
11. Yanagimachi, R., Noda, Y. D., Fujimoto, M. & Nicolson, G. L. The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa. *Am. J. Anat.* **135**, 497–519 (1972).
12. Yanagimachi, R., Nicolson, G. L., Noda, Y. D. & Fujimoto, M. Electron microscopic observations of the distribution of acidic anionic residues on hamster spermatozoa and eggs before and during fertilization. *J. Ultrastructure Res.* **43**, 344–353 (1973).
13. Singer, S. J. The Molecular Organization of Membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **43**, 805–833 (1974).
14. Wu, S. H. wei & McConnell, H. M. Phase Separations in Phospholipid Membranes. *Biochemistry* **14**, 847–854 (1975).
15. Nicolson, G. L. Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **457**, 57–108 (1976).
16. Karnovsky, M. J., Kleinfeld, A. M., Hoover, R. L. & Klausner, R. D. The concept of lipid domains in membranes. *J. Cell Biol.* **94**, 1–6 (1982).
17. Klausner, R. D., Bhalla, D. K., Dragsten, P., Hoover, R. L. & Karnovsky, M. J. Model for capping derived from inhibition of surface receptor capping by free fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 437–441 (1980).
18. Klausner, R. D., Kleinfeld, A. M., Hoover, R. L. & Karnovsky, M. J. Lipid domains in membranes. Evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis. *J. Biol. Chem.* **255**, 1286–1295 (1980).
19. Kusumi, A. & Sako, Y. Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 566–574 (1996).

20. Kusumi, A., Koyama-Honda, I. & Suzuki, K. Molecular Dynamics and Interactions for Creation of Stimulation-Induced Stabilized Rafts from Small Unstable Steady-State Rafts Elucidating the Sizes and Lifetimes of Rafts Is the Key to Understanding How They Work. *Traffic* **5**, 213–230 (2004).
21. Kusumi, A., Suzuki, K. G. N., Kasai, R. S., Ritchie, K. & Fujiwara, T. K. Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 604–615 (2011).
22. Jacobson, K., Sheets, E. D. & Simson, R. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science (80-.)*. **268**, 1441–1442 (1995).
23. Simons, K. & Van Meer, G. Lipid Sorting in Epithelial Cells. *Biochemistry* **27**, 6197–6202 (1988).
24. Parton, R. G. Caveolae and caveolins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 542–548 (1996).
25. Parton, R. G., Tillu, V. A. & Collins, B. M. Caveolae. *Curr. Biol.* **28**, R402–R405 (2018).
26. Parat, M. & Riggins, G. J. Caveolin-1, caveolae, and glioblastoma. **14**, 679–688 (2012).
27. Minshall, R. D., Sessa, W. C., Stan, R. V., Anderson, R. G. W. & Malik, A. B. Caveolin regulation of endothelial function. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **285**, 1179–1183 (2003).
28. Oliveira, S. D. S. & Minshall, R. D. *Caveolin and Endothelial NO Signaling. Current Topics in Membranes* vol. 82 (Elsevier Inc., 2018).
29. Van Golen, K. L. Is caveolin-1 a viable therapeutic target to reduce cancer metastasis? *Expert Opin. Ther. Targets* **10**, 709–721 (2006).
30. Filippini, A. & D’allessio, A. Caveolae and lipid rafts in endothelium: Valuable organelles for multiple functions. *Biomolecules* **10**, 1–16 (2020).
31. Parton, R. G. Caveolae: Structure, Function, and Relationship to Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **34**, 111–136 (2018).
32. Anderson, R. G. W. The Caveolae Membrane System. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199–225 (1998).
33. Bastiani, M. & Parton, R. G. Caveolae at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 3831–3836 (2010).
34. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
35. London, E. & Brown, D. A. Insolubility of lipids in Triton X-100: Physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1508**, 182–195 (2000).
36. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science (80-.)*. **327**, 46–50 (2010).
37. Pasenkiewicz-Gierula, M., Subczynski, W. K. & Kusumi, A. Influence of phospholipid unsaturation on the cholesterol distribution in membranes. *Biochimie* **73**, 1311–1316 (1991).
38. Panasiewicz, M., Domek, H., Fedoryszak-Kuśka, N. & Tadeusz, P. Membranes, detergent resistant membrane fraction, and lipid rafts. *Postępy Nauk Med.* 929–935 (2011).
39. Van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
40. Brown, D. A. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals.

- Physiology* **21**, 430–439 (2006).
41. Lichtenberg, D., Goñi, F. M. & Heerklotz, H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 430–436 (2005).
 42. Xu, X. & London, E. The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry* **39**, 843–849 (2000).
 43. Arni, S., Keilbaugh, S. A., Ostermeyer, A. G. & Brown, D. A. Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *J. Biol. Chem.* **273**, 28478–28485 (1998).
 44. Leslie, M. Do Lipid Rafts Exist? *Science (80-.)*. **334**, 1046–1047 (2011).
 45. Munro, S. Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell* **115**, 377–388 (2003).
 46. Kusumi, A. *et al.* Defining raft domains in the plasma membrane. *Traffic* **21**, 106–137 (2020).
 47. Suzuki, K. G. N. *et al.* Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 774–783 (2012).
 48. Bickel, P. E. *et al.* Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 13793–13802 (1997).
 49. Tavernarakis, N., Driscoll, M. & Kyrpidis, N. C. The SPFH domain: Implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 425–427 (1999).
 50. Browman, D. T., Hoegg, M. B. & Robbins, S. M. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol.* **17**, 394–402 (2007).
 51. Langhorst, M. F., Reuter, A. & Stuermer, C. A. O. Scaffolding microdomains and beyond: The function of reggie/flotillin proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2228–2240 (2005).
 52. Otto, G. P. & Nichols, B. J. The roles of flotillin microdomains-endocytosis and beyond. *J. Cell Sci.* **124**, 3933–3940 (2011).
 53. Stuermer, C. A. O. & Plattner, H. The ‘lipid raft’ microdomain proteins reggie-1 and reggie-2 (flotillins) are scaffolds for protein interaction and signaling. *Biochem. Soc. Symp.* **72**, 109–118 (2005).
 54. Babuke, T. & Tikkanen, R. Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **86**, 525–532 (2007).
 55. Fernow, I., Icking, A. & Tikkanen, R. Reggie-1 and reggie-2 localize in non-caveolar rafts in epithelial cells: Cellular localization is not dependent on the expression of caveolin proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **86**, 345–352 (2007).
 56. Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O. & Málaga-Trillo, E. Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: Convergent evolution of the SPFH domain. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 343–357 (2006).
 57. Hinderhofer, M. *et al.* Evolution of prokaryotic SPFH proteins. *BMC Evol. Biol.* **9**, 1–18 (2009).
 58. Lang, D. M. *et al.* Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J. Neurobiol.* **37**, 502–523 (1998).
 59. Glebov, O. O. & Nichols, B. J. Distribution of lipid raft markers in live cells. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 673–675 (2004).

60. Kenworthy, A. K., Petranova, N. & Edidin, M. High-Resolution FRET Microscopy of Cholera Toxin B-Subunit and GPI-anchored Proteins in Cell Plasma Membranes. *Cell* **111**, 1645–1655 (2000).
61. Sharma, P. *et al.* Nanoscale Organization of Multiple GPI-Anchored Proteins in Living Cell Membranes. *Cell* **116**, 577–589 (2004).
62. Lingwood, D., Kaiser, H. J., Levental, I. & Simons, K. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 955–960 (2009).
63. Nicolson, G. Update of the 1972 Singer-Nicolson Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure. *Discoveries* **1**, 1–14 (2013).
64. Santos, A. L. & Preta, G. Lipids in the cell: organisation regulates function. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 1909–1927 (2018).
65. Pike, L. J. Rafts defined: A report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lipid Res.* **47**, 1597–1598 (2006).
66. Lopez, D. & Koch, G. Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview. *Curr. Opin. Microbiol.* **36**, 76–84 (2017).
67. Erickson, H. P. & Kozminski, K. G. The discovery of the prokaryotic cytoskeleton : 25th anniversary. **28**, 357–358 (2017).
68. Epan, R. M. & Epan, R. F. Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Mol. Biosyst.* **5**, 580–587 (2009).
69. Donovan, C. & Bramkamp, M. Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue. *Microbiology* **155**, 1786–1799 (2009).
70. López, D. & Kolter, R. Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev.* **24**, 1893–1902 (2010).
71. Yepes, A. *et al.* The biofilm formation defect of a *Bacillus subtilis* flotillin-defective mutant involves the protease FtsH. *Mol. Microbiol.* **86**, 457–471 (2012).
72. Dempwolff, F., Möller, H. M. & Graumann, P. L. Synthetic Motility and Cell Shape Defects Associated with Deletions of Flotillin / Reggie Paralogs in *Bacillus subtilis* and Interplay of These Proteins with NfeD Proteins. *J. Bacteriol.* **194**, 4652–4661 (2012).
73. Larocca, T. J. *et al.* Cholesterol lipids of *Borrelia burgdorferi* form lipid rafts and are required for the bactericidal activity of a complement-independent antibody. *Cell Host Microbe* **8**, 331–342 (2010).
74. Crowley, J. T. *et al.* Lipid Exchange between *Borrelia burgdorferi* and Host Cells. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
75. Samanta, D., Mulye, M., Clemente, T. M., Justis, A. V & Gilk, S. D. Manipulation of Host Cholesterol by Obligate Intracellular Bacteria. **7**, 1–14 (2017).
76. Hutton, M. L. *et al.* A *Helicobacter pylori* Homolog of Eukaryotic Flotillin Is Involved in Cholesterol Accumulation , Epithelial Cell Responses and Host Colonization. **7**, 1–13 (2017).
77. Tareen, A. M. *et al.* The *Campylobacter jejuni* Cj0268c protein is required for adhesion and invasion in vitro. *PLoS One* **8**, (2013).
78. Heimesaat, M. M. *et al.* Impact of *Campylobacter jejuni* cj0268c knockout mutation on intestinal colonization, translocation, and induction of immunopathology in gnotobiotic IL-10 deficient mice. *PLoS One* **9**, 1–8 (2014).
79. Sáenz, J. P. *et al.* Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 11971–11976 (2015).
80. Somani, V. K., Aggarwal, S., Singh, D., Prasad, T. & Bhatnagar, R. Identification of

- novel raft marker protein, FlotP in *Bacillus anthracis*. *Front. Microbiol.* **7**, 1–18 (2016).
81. Koch, G. *et al.* Attenuating *Staphylococcus aureus* Virulence by Targeting Flotillin Protein Scaffold Activity. *Cell Chem. Biol.* **24**, 845-857.e6 (2017).
 82. Guzmán-Flores, J. E., Alvarez, A. F., Poggio, S., Gavilanes-Ruiz, M. & Georgellis, D. Isolation of detergent-resistant membranes (DRMs) from *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **518**, 1–8 (2017).
 83. Guzmán-Flores, J. E. *et al.* Proteomic analysis of *Escherichia coli* detergent-resistant membranes (DRM). *PLoS One* **14**, 1–18 (2019).
 84. Mena, K. D. & Gerba, C. P. Risk Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in Water. in *Reviews of environmental contamination and toxicology* vol. 201 71–115 (2009).
 85. Walker, T. S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*-Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiol.* **134**, 320–331 (2004).
 86. Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A. & Filloux, A. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Opin. Microbiol.* **41**, 15–20 (2018).
 87. Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* **67**, 159–173 (2013).
 88. Al-Wrafy, F., Brzozowska, E., Górska, S. & Gamian, A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **71**, 78–91 (2017).
 89. Engel, J. & Balachandran, P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 61–66 (2009).
 90. Morrow, K. A., Frank, D. W., Balczon, R. & Stevens, T. The *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme Y: A Promiscuous Nucleotidyl Cyclase Edema Factor and Virulence Determinant. in *Handbook of Experimental Pharmacology* 67–85 (2016). doi:10.1007/164_2016_5003.
 91. Alhede, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M. & Alhede, M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mechanisms of immune evasion. Advances in Applied Microbiology* vol. 86 (Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved., 2014).
 92. Wang, J., Brodmann, M. & Basler, M. Assembly and subcellular localization of bacterial type VI secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **73**, 621–638 (2019).
 93. Casabona, M.-G., Elsen, S., Cogoni, V. & Attrée, I. P. *aeruginosa* Type VI Secretion Machinery: Another Deadly Syringe. in *Pseudomonas* 75–97 (Springer Netherlands, 2015). doi:10.1007/978-94-017-9555-5_4.
 94. Lund-Palau, H. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Rev. Respir. Med.* **10**, 685–697 (2016).
 95. Dettman, J. R. & Kassen, R. Evolutionary genomics of niche-specific adaptation to the cystic fibrosis lung in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biol. Evol.* (2020) doi:10.1093/molbev/msaa226.
 96. Bragonzi, A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 138–145 (2009).
 97. Rahme, L. G. *et al.* Common Virulence Factors for Bacterial Pathogenicity in Plants and Animals. *Science (80-.)*. **268**, 1899–1902 (1995).
 98. Tan, M. W., Rahme, L. G., Sternberg, J. A., Tompkins, R. G. & Ausubel, F. M.

- Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 2408–2413 (1999).
99. Jander, G., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J. Bacteriol.* **182**, 3843–3845 (2000).
 100. Takeuchi, K. *et al.* Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* **284**, 34976–34985 (2009).
 101. Kay, E. *et al.* Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 6026–6033 (2006).
 102. Camacho, M. I., Georgellis, D. & Álvarez, A. F. El circuito regulatorio BarA/UvrY-CsrA en *Escherichia coli* y sus homólogos en las γ -proteobacterias. *TIP* **19**, 15–23 (2016).
 103. Pessi, G. *et al.* The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 6676–6683 (2001).
 104. Nadal Jimenez, P. *et al.* The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 46–65 (2012).
 105. Francis, V. I., Stevenson, E. C. & Porter, S. L. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **364**, 1–22 (2017).
 106. Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140 (2004).
 107. Leimbach, A., Hacker, J. & Dobrindt, U. *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. in *Between Pathogenicity and Commensalism* vol. 358 3–32 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2013).
 108. Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A. & Vargas-Remolina, L. V. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev. Chil. infectología* **33**, 438–450 (2016).
 109. Platenkamp, A. & Mellies, J. L. Environment Controls LEE Regulation in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* **9**, 1–15 (2018).
 110. Pacheco, A. R. & Sperandio, V. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 81 (2012).
 111. Vidal, J. E. & Canizález-román, A. Patogénesis molecular , epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. **49**, (2007).
 112. Slater, S. L., Sågfors, A. M., Pollard, D. J., Ruano-Gallego, D. & Frankel, G. The Type III Secretion System of Pathogenic *Escherichia coli*. in *Current Topics in Microbiology and Immunology* vol. 416 51–72 (2018).
 113. Wales, A. D., Woodward, M. J. & Pearson, G. R. Attaching-effacing bacteria in animals. *J. Comp. Pathol.* **132**, 1–26 (2005).
 114. Pearson, J. S., Giogha, C., Lung, T. W. F. & Hartland, E. L. The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. **50**, 493 (2016).
 115. Navarro-García, F., Canizalez-Roman, A., Sui, B. Q., Nataro, J. P. & Azamar, Y. The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative *E. coli*. *Infect. Immun.* **72**, 3609–3621 (2004).
 116. Hazen, T. H. *et al.* RNA-Seq analysis of isolate- and growth phase-specific differences in the global transcriptomes of enteropathogenic *Escherichia coli*

- prototype isolates. *Front. Microbiol.* **6**, 1–19 (2015).
117. MacRitchie, D. M., Ward, J. D., Nevesinjac, A. Z. & Raivio, T. L. Activation of the Cpx envelope stress response down-regulates expression of several locus of enterocyte effacement-encoded genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **76**, 1465–1475 (2008).
 118. Vogt, S. L. *et al.* The Cpx envelope stress response both facilitates and inhibits elaboration of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus. *Mol. Microbiol.* **76**, 1095–1110 (2010).
 119. Wiehlmann, L. *et al.* Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8101–8106 (2007).
 120. Mathee, K. Forensic investigation into the origin of *pseudomonas aeruginosa* PA14 — Old but not lost. *J. Med. Microbiol.* **67**, 1019–1021 (2018).
 121. Schroth, M. N., Cho, J. J., Green, S. K. & Kominos, S. D. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural areas. *J. Med. Microbiol.* **67**, 1191–1201 (2018).
 122. Altschul, S. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
 123. Marchler-Bauer, A. & Bryant, S. H. CD-Search: Protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* **32**, 327–331 (2004).
 124. Marchler-Bauer, A. *et al.* CDD: A Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* **39**, 225–229 (2011).
 125. Marchler-Bauer, A. *et al.* CDD: NCBI’s conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* **43**, D222–D226 (2015).
 126. Marchler-Bauer, A. *et al.* CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* **45**, D200–D203 (2017).
 127. Winsor, G. L. *et al.* Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* **44**, D646–D653 (2016).
 128. Liberati, N. T. *et al.* An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2833–2838 (2006).
 129. Toder, D. S., Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol. Microbiol.* **5**, 2003–2010 (1991).
 130. Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol.* **173**, 3000–3009 (1991).
 131. Gambello, M. J., Kaye, S. & Iglewski, B. H. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect. Immun.* **61**, 1180–1184 (1993).
 132. Heurlier, K. *et al.* The Global Posttranscriptional Regulator RsmA Modulates Production of Virulence Determinants and N-Acylhomoserine Lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 6676–6683 (2001).
 133. Bleves, S. *et al.* Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 534–543 (2010).
 134. Pena, R. T. *et al.* Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).

135. Miyata, S., Casey, M., Frank, D. W., Ausubel, F. M. & Drenkard, E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* **71**, 2404–2413 (2003).
136. Kany, A. M. *et al.* Binding Mode Characterization and Early in Vivo Evaluation of Fragment-Like Thiols as Inhibitors of the Virulence Factor LasB from *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* **4**, 988–997 (2018).
137. Leuko, S. & Raivio, T. L. Mutations that impact the enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx envelope stress response attenuate virulence in *Galleria mellonella*. *Infect. Immun.* **80**, 3077–3085 (2012).
138. Younas, M. *et al.* Characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* of clinical origin from the pediatric population in Pakistan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **110**, 414–420 (2016).
139. Scalfaro, C., Iacobino, A., Nardis, C. & Franciosa, G. *Galleria mellonella* as an in vivo model for assessing the protective activity of probiotics against gastrointestinal bacterial pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **364**, 1–21 (2017).
140. Morgan, J. K., Ortiz, J. A. & Riordan, J. T. The role for TolA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and virulence gene transcription. *Microb. Pathog.* **77**, 42–52 (2014).
141. Guerrieri, C. G. *et al.* Typical and Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Are Both Virulent in the *Galleria mellonella* Model. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
142. Vega F., F. E. & Kaya, H. K. *Insect Pathology Second edition.* (2012). doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.05001-6>.
143. Boucias, D. G. & Pendland, J. C. *Principles of Insect Pathology.* (Springer US, 1998). doi:10.1007/978-1-4615-4915-4.
144. Vidal, J. E. & Navarro-García, F. EspC translocation into epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* requires a concerted participation of type V and III secretion systems. *Cell. Microbiol.* **10**, 1975–1986 (2008).
145. Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 692–744 (2004).
146. Navarro-Garcia, F., Serapio-Palacios, A., Vidal, J. E., Isabel Salazar, M. & Tapia-Pastrana, G. EspC promotes epithelial cell detachment by enteropathogenic *Escherichia coli* via sequential cleavages of a cytoskeletal protein and then focal adhesion proteins. *Infect. Immun.* **82**, 2255–2265 (2014).
147. Zhu, C., Feng, S., Thate, T. E., Kaper, J. B. & Boedeker, E. C. Towards a vaccine for attaching/effacing *Escherichia coli*: a LEE encoded regulator (ler) mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* is attenuated, immunogenic, and protects rabbits from lethal challenge with the wild-type virulent strain. *Vaccine* **24**, 3845–3855 (2006).
148. Bach, J. N. & Bramkamp, M. Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Mol. Microbiol.* **88**, 1205–1217 (2013).
149. Toledo, A., Coleman, J. L. & Benach, J. L. The lipid raft proteome of *Borrelia burgdorferi*. 3662–3675 (2015) doi:10.1002/pmic.201500093.
150. Deng, W. *et al.* Quantitative proteomic analysis of type III secretome of enteropathogenic *Escherichia coli* reveals an expanded effector repertoire for attaching/effacing bacterial pathogens. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, 692–709 (2012).

151. Howe, T. R. & Iglewski, B. H. Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect. Immun.* **43**, 1058–1063 (1984).
152. Ohman, D. E., Cryz, S. J. & Iglewski, B. H. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J. Bacteriol.* **142**, 836–842 (1980).
153. Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Cool, R. H. & Quax, W. J. Assessing *Pseudomonas* Virulence with Nonmammalian Host: *Galleria mellonella*. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 1149 681–688 (2014).
154. Saucedo-Mora, M. A. *et al.* Selection of Functional Quorum Sensing Systems by Lysogenic Bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **8**, 1–10 (2017).