



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

ESTUDIO DE LA PROTEÍNA CODIFICADA POR  
EL GEN *orf4* DE LA ISLA DE PATOGENICIDAD  
*LEE* DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

LCG. JOSÉ EDUARDO SOTO GUZMÁN

**TUTORA:**

DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

CIUDAD UNIVERSITARIA MÉXICO, D. F.  
SEPTIEMBRE 2012



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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Bertha González Pedrajo y el apoyo técnico de la Dra. Norma Espinosa Sánchez, en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante la realización del mismo se contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 371466.

El comité tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por los doctores Bertha González Pedrajo, Soledad Funes Argüello y José Luis Puente García.

El trabajo se desarrolló con el apoyo técnico de los miembros de la Unidad de Biología Molecular: Dra. Laura Ongay Larios, Biól. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera; de la Unidad de Cómputo: Biól. Gerardo Coello Coutiño, Ing. Juan Barbosa Castillo e Ing. Ivette Rosas Arciniega así como del Taller de Manenimiento: Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides.

Para la realización del presente proyecto de investigación se contó con el apoyo de los donativos IN212911 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, 81847 del CONACyT y un apoyo complementario de la Fundación Miguel Alemán, A.C.

<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<i>Escherichia coli</i> como patógeno .....	10
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC) .....	12
Lesión de adherencia y esfacelamiento A/E.....	12
Isla de patogenicidad LEE.....	14
Origen evolutivo del LEE .....	14
Sistema de secreción tipo III (SST3) .....	15
SST3 como tema común en la interacción de bacterias con hospederos eucariontes .....	16
SST3 de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena .....	17
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>19</b>
Orf4 es esencial para el funcionamiento del SST3 .....	19
Posibles equivalentes funcionales de Orf4 en otros SST3 .....	20
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
Objetivo general .....	24
Objetivos específicos.....	24
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
Búsqueda de proteínas homólogas a Orf4.....	25
Contexto genómico de <i>orf4</i> .....	27
Fenotipo de EPEC $\Delta$ <i>orf4</i> .....	29
Efecto multicopia de Orf4 en la secreción de EPEC.....	32
Efecto de Orf4 en la motilidad bacteriana .....	35
La sobreproducción de EscI o de EscN en la mutante $\Delta$ <i>orf4</i> no restaura el fenotipo de secreción.....	38
Purificación de la proteína recombinante His-Orf4 .....	41
Búsqueda de interacciones de Orf4 con otros componentes del SST3 de EPEC.....	44
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
Cepas bacterianas .....	50
Vectores.....	52
Construcciones.....	53
Medios de cultivo.....	53
Manipulación de DNA .....	53
Purificación de Orf4 .....	54

Cuantificación de la proteína .....	56
Generación de anticuerpos policlonales.....	56
Inmunodetección .....	57
Ensayo de secreción .....	57
Pruebas de motilidad .....	58
Ensayo de doble híbrido en levadura .....	58
Análisis bioinformático.....	60
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>61</b>

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Mi casa. Por mi raza hablará el espíritu.

A la Dra. Bertha González por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto en su laboratorio. Su guía fue vital para que este trabajo llegara a buen puerto.

Al Dr. José Luis Puente por haberme escuchado y orientado durante la primera parte de este trayecto. Agradezco también sus aportaciones a este trabajo.

A la Dra. Soledad Funes por sus valiosos comentarios a este escrito que, sin duda, contribuyeron de manera importante a enriquecer la calidad del mismo.

A mis compañeros de laboratorio: Norma, Eli, Mariana, Julia y Clau por haberme brindado su apoyo siempre que lo requerí. En especial quisiera agradecer a Miguel quien además de establecer las bases para el estudio de Orf4 en el laboratorio, fue quien (no sin una buena dosis de paciencia) me guió por el intrincado mundo de la biología experimental. Importante mencionar también que sin el trabajo previo de todos ellos difícilmente hubiera tenido los cimientos y herramientas suficientes para concluir este estudio.

A Jazmín cuyo cariño es uno de los impulsos más importantes de mi vida. :\*

A mis amigos de hoy y siempre. En especial a Roberto Galindo por siempre estar ahí, donde se necesita a los amigos.

Finalmente quiero agradecer y dedicar este trabajo a mi familia. A mi Jefa, a mi papá, a Karich y a mi Cicia. Su afecto y cariño constante ha sido mi soporte siempre. Ellos han sido fundamentales para concluir cada uno de mis proyectos. Ésta es sólo otra oportunidad para darles las gracias.

## Lista de abreviaturas

<b>A/E</b>	Adherencia y esfacelamiento (del inglés <i>Attaching and Effacing</i> )
<b>aa</b>	Aminoácido
<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>BLAST</b>	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales (del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
<b>Cm</b>	Cloranfenicol
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
<b>IP</b>	Isla de patogenicidad
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>LEE</b>	Locus de esfacelamiento del enterocito (del inglés <i>Locus of Enterocyte Effacement</i> )
<b>Orf</b>	Marco abierto de lectura (del inglés <i>Open Reading Frame</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PMSF</b>	Fenil metil sulfonil fluoruro
<b>PSI-BLAST</b>	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales iterativa de posición específica (del inglés <i>Position-Specific Iterated BLAST</i> )
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic Acid</i> )
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SD</b>	Medio sintético definido (del inglés <i>Synthetic Defined Media</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
<b>SST3</b>	Sistema de secreción tipo III
<b>St</b>	Estreptomina
<b>Tc</b>	Tetraciclina
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético

**WB**

Inmunodetección (del inglés *Western blot*)

**YPDA**

Medio de extracto de levadura, peptona, dextrosa y adenina



## RESUMEN

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es uno de los agentes etiológicos de diarrea infantil más comunes en países en vía de desarrollo. EPEC pertenece a la familia de los patógenos A/E los cuales se caracterizan por adherirse firmemente a los enterocitos del intestino del organismo infectado, ocasionando la desaparición de microvellosidades en las zonas aledañas al lugar de adherencia y la aparición de un pedestal rico en actina justo por debajo del sitio de unión de la bacteria. Uno de los determinantes génicos esenciales para la virulencia de los patógenos A/E es la isla de patogenicidad LEE (*Locus de esfacelamiento del enterocito*). Esta isla de patogenicidad codifica para un sistema de secreción tipo III (SST3) que es una máquina molecular a través de la cual el patógeno transloca proteínas efectoras de virulencia directamente a la célula infectada. Finalmente, la actividad de los efectores altera los procesos celulares del enterocito en beneficio de la bacteria.

Existen aún genes del LEE que codifican para proteínas de función desconocida. Uno de estos casos es el del marco de lectura abierto *orf4* codificado en el operón *LEE1* de la isla LEE. Para la proteína Orf4 es prácticamente nula la información con la que se cuenta en la literatura. En el presente trabajo se sientan las bases para entender el rol funcional de Orf4 en el SST3.

Mediante análisis bioinformático se encontraron nuevos homólogos de Orf4 en SST3 de otros organismos los cuales no habían sido reportados. Con estos homólogos se realizó un alineamiento múltiple encontrando una gran variedad de sitios conservados que pudieran ser importantes para la función de Orf4 y de sus homólogos.

Se caracterizó el fenotipo de una cepa mutante EPEC  $\Delta orf4$  y se determinó que la proteína Orf4 es esencial para la secreción de proteínas vía SST3. El fenotipo de no secreción aunado al hecho de que la producción de proteínas de la isla LEE no se ve afectada en la mutante  $\Delta orf4$  sugiere que Orf4 es un componente estructural del SST3 o que se encuentra involucrado en la biogénesis de este sistema de virulencia.

La secreción de proteínas se restauró cuando Orf4 se expresó *in trans* en la mutante  $\Delta orf4$

corroborando que la deficiencia en la secreción de la mutante se debe sólo a la falta de la proteína Orf4 y no a un efecto polar sobre el operón *LEE1* inherente a la mutante  $\Delta orf4$ . Se probó también la funcionalidad de la versión de Orf4 etiquetada con histidinas (His-Orf4) al complementar a una mutante  $\Delta orf4$ .

Al inducir en cepas de expresión la sobreproducción de Orf4, ésta resultó ser insoluble. En este trabajo se establecieron las condiciones para purificar a la proteína recombinante His-Orf4 por cromatografía de afinidad.

Se determinó también que la sobreexpresión de Orf4 en un fondo EPEC silvestre provoca lisis celular y tiene un efecto negativo sobre el nado de la bacteria.

# INTRODUCCIÓN

## ***Escherichia coli* como patógeno**

*E. coli* es una bacteria perteneciente a la clase de las Gammaproteobacterias que típicamente coloniza el tracto gastrointestinal de mamíferos pocas horas después del nacimiento y reside en este hábitat como comensal sin causar mayores daños al hospedero (Kaper, 2004). Se sugiere incluso que esta bacteria no es sólo un organismo comensal sino que tiene una relación de tipo mutualista con su hospedero al proporcionarle a éste beneficios tales como la producción de vitaminas -por ejemplo vitamina K<sub>2</sub> (menaquinona)- o como la protección contra el establecimiento de bacterias patógenas en el intestino al competir con patógenos por fuentes de carbohidratos similares (Kamada, 2012). Mientras, el hospedero le provee a la bacteria de un hábitat estable donde residir (Bentley, 1982).

Durante el transcurso de la evolución ciertas cepas\* de *E. coli* han adquirido atributos virulentos que les han permitido explotar nuevos nichos ecológicos dentro del organismo hospedero, produciendo un gran espectro de enfermedades a los organismos infectados. Las distintas cepas patógenas -conocidas como patotipos- de *E. coli* emplean una estrategia de infección de pasos múltiples que consiste en la colonización del sitio a infectar, evasión de las defensas del sistema inmune, multiplicación y daño al hospedero (Kaper, 2004). Hasta ahora se han descrito tres síndromes clínicos generales causados por infecciones de cepas patógenas de *E. coli*: *i*) enfermedades gastrointestinales, *ii*) enfermedades del tracto urinario y *iii*) sepsis/meningitis. Las cepas patógenas asociadas a estos síndromes clínicos así como algunas de sus características se resumen en la Tabla 1.

---

\* Una cepa es un subgrupo dentro de una especie bacteriana que tiene características únicas a nivel molecular que las distinguen de otros subgrupos de la misma especie.

**Tabla 1. Cepas patógenas de *E. coli* asociadas a enfermedades de humanos.**

<b>PATOTIPO</b>	<b>SÍNDROME ASOCIADO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>EPEC</b> <i>E. coli</i> enteropatógena	Diarrea acuosa y/o persistente.	Común en niños de países en vías de desarrollo. Coloniza preferentemente el intestino delgado.
<b>EHEC</b> <i>E. coli</i> enterohemorrágica	Diarrea con sangrado. Puede causar también el síndrome urémico hemolítico.	Responsable de epidemias de gastroenteritis en países desarrollados. Preferentemente coloniza el intestino grueso.
<b>ETEC</b> <i>E. coli</i> enterotoxigénica	Diarrea acuosa.	Causa importante de diarrea en niños menores de 5 años en países en vía de desarrollo. Responsable también de la llamada “diarrea del viajero”.
<b>EIEC</b> <i>E. coli</i> enteroinvasiva	Diarrea acuosa.	<i>E. coli</i> patógena intracelular. Estrechamente relacionada a <i>Shigella</i> spp.
<b>DAEC</b> <i>E. coli</i> de adherencia difusa	Diarrea acuosa.	Grupo heterogéneo definido por un patrón de adherencia difusa a células HeLa. Coloniza el intestino delgado. Se le ha implicado en diarrea en niños entre 18 meses y 5 años de edad.
<b>EAEC</b> <i>E. coli</i> enteroagregativa	Diarrea persistente, ocasionalmente acompañada de moco y sangrado.	EAEC puede colonizar tanto el intestino delgado como el grueso. Deriva su nombre del patrón de auto-agregación que asemeja una serie de “ladrillos apilados”.
<b>UPEC</b> <i>E. coli</i> uropatógena	Enfermedades del tracto urinario. Causa de pielonefritis y cistitis.	Agente causal del 75% de las infecciones de tracto urinario en humanos.
<b>NMEC</b> <i>E. coli</i> asociada a meningitis neonatal	Sepsis/meningitis.	Causa común de meningitis en recién nacidos. Tasas de fatalidad hasta del 40%.

## ***E. coli enteropatógena (EPEC)***

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diarrea es una de las principales causas de muerte en niños menores de 5 años en el mundo<sup>¶</sup> (Bryce, 2005). Entre los agentes etiológicos más comunes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo se encuentra la bacteria *E. coli* enteropatógena (EPEC) (Kaper, 1998). La prevalencia reportada de EPEC varía en relación a la población estudiada y a los métodos y criterios empleados para el diagnóstico. Estudios basados en métodos moleculares (identificación del gen de intimina *-eae-*) muestran que EPEC es responsable del 5 al 10 % de los episodios pediátricos de diarrea totales en países en vía de desarrollo (Ochoa, 2008).

Al igual que otras cepas de *E. coli*, el modo de transmisión principal de EPEC es vía fecal-oral mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados (Kaper, 1998). El periodo de incubación de la infección varía de entre 3 a 24 horas después de que el individuo ingiere un inóculo grande de bacterias ( $10^9$  a  $10^{10}$ ) en condiciones experimentales (Vidal, 2003).

El principal síntoma clínico de la infección por EPEC suele ser la diarrea acuosa -que puede ocurrir en distintos grados de severidad- y que puede resultar en la deshidratación del individuo infectado (Vidal, 2003). Adicionalmente puede presentarse vómito y fiebre, al igual que distensión abdominal e íleo paralítico.

## ***Lesión de adherencia y esfacelamiento A/E***

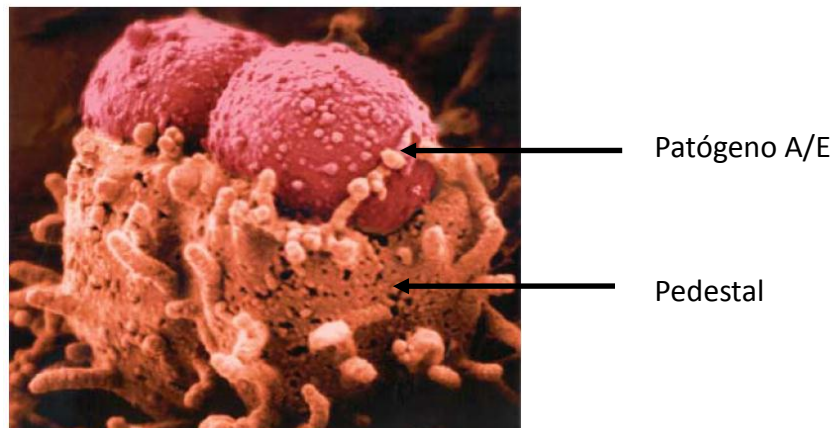
EPEC, al igual que EHEC, pertenece a una familia de patógenos gastrointestinales llamada A/E (del inglés *Attaching and Effacing*). Las bacterias patógenas A/E reciben este nombre porque tienen la

---

<sup>¶</sup> Es preciso resaltar que, del porcentaje total de las muertes que dicho estudio de la OMS atribuye a la diarrea (18% de las muertes mundiales de infantes menores de 5 años), se estima que la desnutrición es una causa subyacente importante de estas muertes en más de la mitad de los casos (61%).

capacidad de formar lesiones en los enterocitos<sup>x</sup> del epitelio intestinal del organismo infectado, denominadas lesiones de adherencia y esfacelamiento (*Attaching and Effacing lesions* en inglés), las cuales pueden ser observadas en biopsias intestinales de pacientes infectados y reproducidas *in vitro* en cultivos celulares (**Figura 1**). Esta lesión se caracteriza por la adherencia íntima de la bacteria al enterocito (*attachment*) y por la eliminación o esfacelamiento (*effacement*) de las microvellosidades en las zonas aledañas al sitio de unión.

El fenotipo causado por los patógenos A/E se acompaña por cambios pronunciados en el citoesqueleto del enterocito infectado, acumulándose actina polimerizada justo por debajo del sitio de unión de la bacteria formándose así una estructura denominada pedestal, la cual es una característica típica de los patógenos A/E. Estas estructuras tipo pedestal pueden extenderse hasta 10  $\mu\text{m}$  por fuera de las células epiteliales. Además de F-actina, el pedestal de la lesión A/E se forma de otros componentes como  $\alpha$ -actinina, talina, ezrina y miosina de cadena ligera (Kaper, 1998). La formación de esta lesión es resultado de la acción sinérgica de una serie de proteínas denominadas efectores, las cuales son inyectadas por la bacteria directamente al citoplasma de la célula epitelial infectada mediante una compleja maquinaria molecular llamada sistema de secreción tipo III (ver *Sistema de Secreción tipo III*).

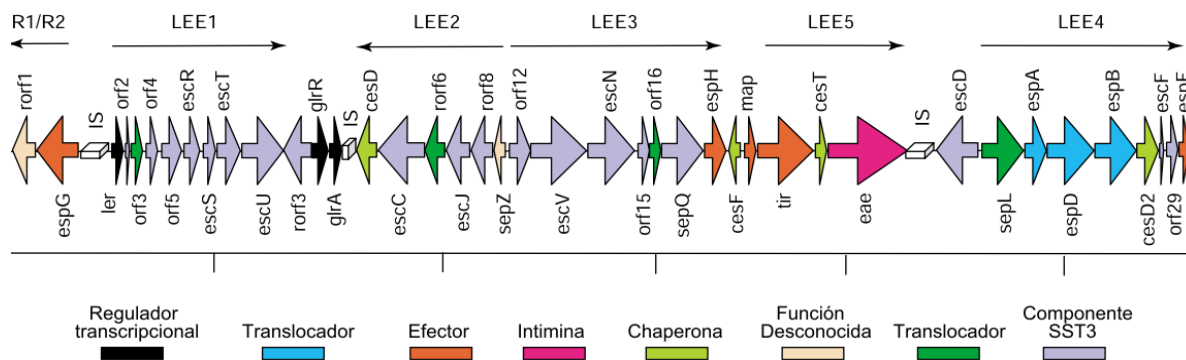


**Figura 1. Lesión histopatológica A/E causada por EPEC y EHEC.** Es característico de este tipo de lesiones la estructura tipo pedestal formada justo debajo del sitio de unión de la bacteria con el enterocito. Imagen tomada de Kaper *et al*, 2004.

<sup>x</sup> Los enterocitos son células epiteliales del intestino responsables de la digestión y absorción de agua y nutrientes. Poseen en su superficie apical microvellosidades que incrementan su área de contacto.

## Isla de patogenicidad LEE

La capacidad virulenta de EPEC para causar este tipo de lesiones es conferida a la bacteria por una isla de patogenicidad<sup>5</sup>, que poseen en común los patógenos A/E, llamada LEE (del inglés *Locus of Enterocyte Effacement*). El LEE se encuentra organizado de manera similar en los distintos patógenos A/E. Se compone básicamente de cinco operones policistrónicos (LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 y LEE5) además de dos operones bicistrónicos y tres unidades transcripcionales. En EPEC, el LEE comprende 35.6 kilobases y dentro de éste se encuentran 41 marcos de lectura abierta (Elliot, 1998). Entre los productos codificados por estos genes se encuentran los componentes necesarios para formar un sistema de secreción tipo III (SST3), proteínas translocadoras y proteínas efectoras, chaperonas, reguladores transcripcionales y varias proteínas de función aún desconocida (**Figura 2**).



**Figura 2. Representación esquemática de la isla de patogenicidad LEE en EPEC.** Los 41 genes que conforman al LEE se encuentran organizados en cinco operones principales (LEE1-LEE5) además de los operones bicistrónicos *grlRA* y *R1/R2* (*rorf1* y *espG*). Se ilustra la anotación funcional de cada uno de los genes del LEE. Modificado de Dean *et al*, 2005.

## Origen evolutivo del LEE

Existe evidencia importante de que la isla de patogenicidad LEE se adquirió por los patógenos A/E mediante transferencia horizontal. Dentro de las líneas de evidencia que apoyan esta hipótesis se encuentra el contenido atípico de GC de la isla LEE (~38 % G+C) con respecto al contenido promedio

<sup>5</sup> Una isla de patogenicidad (IP) es un arreglo de genes, ausente en bacterias no patógenas, que contribuye a la virulencia del organismo. Estas islas típicamente albergan genes que codifican para toxinas, adhesinas, invasinas, sistemas de captación de hierro, entre otros. Tienden a ser adquiridas por las bacterias mediante transferencia horizontal.

de GC del genoma completo de *E. coli* (~50 % G+C) lo cual es característico de las regiones recientemente adquiridas por las Enterobacterias mediante transferencia horizontal. Así mismo, el LEE se encuentra interrumpiendo un gen de tRNA no esencial (*selC* en el caso de EPEC O127:H6 y de EHEC O157:H7) o redundante (*pheU* en EPEC O111:H8/H-, *pheV* en STEC O103:H2) los cuales son sitios de integración característicos de los elementos genéticos móviles (Betts, 2004). Es importante notar que la evolución de los distintos patotipos no ocurre siempre de manera linaje-específica ya que, como en el caso del patotipo EHEC, se ha encontrado que los factores de virulencia han sido adquiridos múltiples veces por distintos linajes filogenéticos de *E. coli* (Ogura, 2009, Wieler, 1997).

### **Sistema de secreción tipo III (SST3)**

En el LEE de EPEC se encuentran codificados los elementos génicos necesarios<sup>±</sup> para la formación de la maquinaria con la que esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal del organismo hospedero. El elemento central de esta maquinaria es el sistema de secreción tipo III (SST3).

El SST3 o inyectisoma es una compleja nanoestructura multiproteica la cual funciona como una jeringa molecular que permite translocar, sin intermediarios periplásmicos, proteínas del citoplasma bacteriano directamente a la célula eucariota hospedera. Las proteínas translocadas que, como ya se mencionó, se conocen como efectores, despliegan un amplio arsenal de actividades bioquímicas dentro del citosol de la célula hospedera con el objeto de modular funciones biológicas del hospedero en beneficio de la bacteria (Cornelis, 2006).

Los SST3 de virulencia y el sistema flagelar bacteriano comparten alrededor de 8 a 10 proteínas cuya secuencia y/o estructura se encuentran conservadas (Tabla 2, Nguyen, 2000). Estas proteínas conservadas están localizadas en la membrana interna bacteriana o asociadas a ésta y conforman el

---

<sup>±</sup> El LEE de EPEC es necesario y suficiente para inducir la lesión A/E. Se ha mostrado que el clonar el LEE de EPEC O127:H6 en una cepa de *E. coli* K-12 es suficiente para conferirle a esta cepa no patógena la capacidad de formar lesiones tipo A/E (McDaniel, 1997). De manera notable, si el LEE de EHEC O157:H7 -el cual posee los mismos genes en la misma orientación que el LEE de EPEC- se transfiere a la cepa K-12, éste no es suficiente para que *E. coli* K-12 induzca lesiones A/E (Elliott, 1999).



núcleo del aparato de exportación (véase más adelante). Por esta razón, así como por el diseño arquitectónico común entre los SST3 y el flagelo, se sugiere que ambos sistemas bacterianos se encuentran evolutivamente relacionados y que se originaron de un sistema bacteriano ancestral común (Gophna, 2003).

**Tabla 2. Porcentajes de identidad y similitud entre las proteínas del SST3 de virulencia y su contraparte funcional en el sistema flagelar de EPEC.** Los porcentajes de identidad y similitud fueron determinados usando el programa Stretcher (Myers, 1988) de EMBOSS ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_stretcher/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/)).

<b>Proteína de virulencia (EPEC)</b>	<b>Proteína flagelar (EPEC)</b>	<b>Identidad / similitud (%)</b>
EscL	FliH	11.0 / 35.6
EscR	FliP	34.3 / 53.8
EscS	FliQ	30.3 / 55.1
EscT	FliR	19.8 / 44.4
EscJ	FliF	11.4 / 19.2
EscV	FlhA	32.3 / 53.6
EscQ	FliN	10.8 / 21.0
EscN	FliI	39.4 / 58.3
EscU	FlhB	24.2 / 47.1

## **SST3 como tema común en la interacción de bacterias con hospederos eucariontes**

Conforme ha aumentado la cantidad de genomas bacterianos secuenciados también ha incrementado el número de SST3 identificados, develando así la amplia distribución filogenética de estas maquinarias moleculares.

Si bien el SST3 es un mecanismo común de muchas bacterias Gram-negativas patógenas de animales y plantas, las enfermedades ocasionadas por estos patógenos difieren considerablemente y van desde enfermedades como peste bubónica hasta plagas y marchitez en plantas (Tampakaki, 2004).

El SST3 se ha encontrado en patógenos de mamíferos tales como *Salmonella* spp., *Shigella* spp.,

*Pseudomonas* spp., *Bordetella* spp., *Chlamydia* spp.-, en patógenos de peces -*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia ruckeri*- y en patógenos de plantas -como *Xanthomonas* spp., *Erwinia* spp., y *Ralstonia solanacearum*-. Sin embargo, el hallazgo de la presencia de SST3 en genomas bacterianos no patógenos como algunos simbioses de plantas (*Rhizobium* spp.), endosimbiontes de insectos (*Sodalis glossinidius*, *Glossina* spp. y los endosimbiontes primarios del insecto *Sitophilus zeamais*) e incluso en bacterias de las cuales no se conoce que interaccionen con eucariontes -como la bacteria reductora de sulfato *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Heidelberg, 2004)-, abre nuevas posibilidades para explorar otras funciones ecológicas de los SST3 diferentes a la patogenicidad.

### **SST3 de *Escherichia coli* enteropatógena**

El sistema de secreción tipo III de EPEC es un complejo multiproteico formado por aproximadamente 20 proteínas codificadas en el LEE (**Figura 3**). Muchas de estas proteínas son componentes estructurales del inyectisoma y algunas otras son proteínas auxiliares que sólo participan durante el proceso de ensamblado del SST3 y siendo posteriormente descartadas.

Morfológicamente es posible diferenciar tres estructuras que componen al SST3 de virulencia de EPEC:

- I. **Aguja/filamento:** es un conducto extracelular elongado en cuyo interior se forma un canal hueco de aproximadamente 2.5 nm de diámetro (Daniell, 2001, Wilson, 2001). En EPEC, la aguja se construye por la polimerización helicoidal de subunidades de la proteína EscF. Una característica particular del inyectisoma de EPEC es la presencia de una estructura larga, flexible y que se extiende a partir de la aguja. Esta estructura se conoce como filamento y se forma por la polimerización de la proteína EspA. Se piensa que esta peculiaridad del inyectisoma de EPEC se debe a que en el intestino, EPEC se encuentra separada de su célula hospedera blanco -el enterocito- por una capa mucosa que recubre a estas células, por lo que la presencia del filamento de EspA facilitaría el acceso a la membrana del enterocito. En un inyectisoma activo en contacto con la célula hospedera, el extremo del filamento de EspA

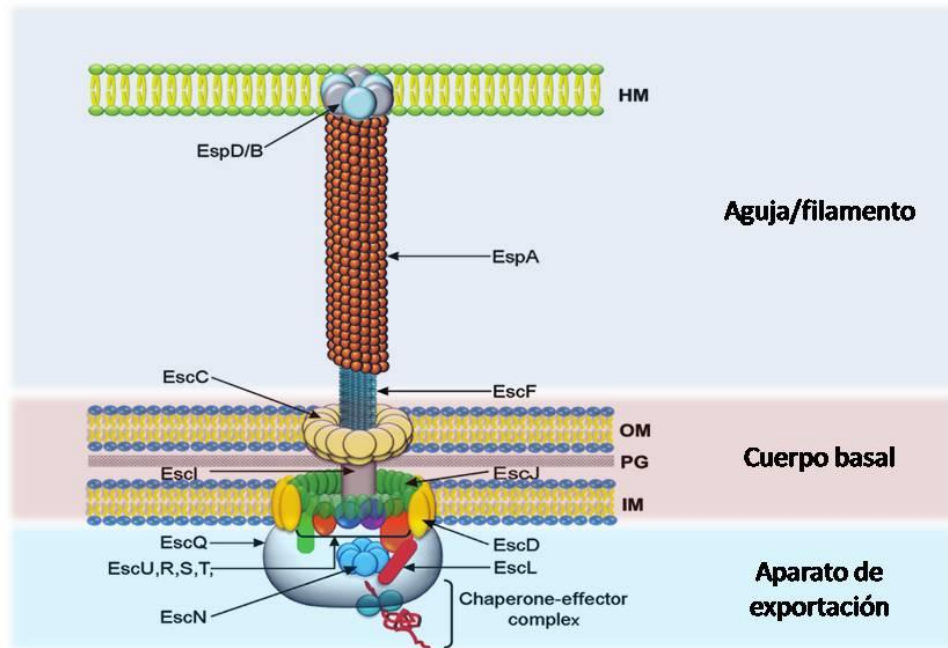
termina en un poro de translocación formado por las proteínas EspB y EspD conocidas como proteínas translocadoras (Knutton, 1998). Este poro de translocación se inserta en la membrana plasmática de la célula hospedera formando un agujero, por lo que el poro de translocación es la estructura del SST3 que hace contacto directo con la célula eucariota.

- II. **Cuerpo basal:** es una base cilíndrica, similar al cuerpo basal del flagelo, compuesto por tres anillos embebidos en las membranas interna y externa. El anillo embebido en la membrana externa se encuentra formado por 12 subunidades de la proteína EscC -la cual es un miembro de la familia de las secretinas\* - (Gauthier, 2003, Spreter, 2009). En la membrana interna se localizan dos anillos; uno formado por la lipoproteína periplásmica EscJ, la cual se piensa que se ancla a la región periplásmica de la membrana interna como un anillo de 24 subunidades (Yip, 2005). El otro anillo de membrana interna se encuentra formado por la proteína EscD. Existe un eje interno periplásmico, formado por la proteína EscI, que une a los anillos de ambas membranas (Sal-Man, 2011).
  
- III. **Aparato de exportación:** en la base del SST3 se encuentra un conjunto de proteínas citoplásmicas y de proteínas intermembranales asociadas a la membrana interna, altamente conservadas (ver sección *Sistema de secreción tipo III*) y conocidas en conjunto como el aparato de exportación. Se considera que el aparato de exportación es el encargado de reconocer los sustratos a secretarse (Diepold, 2011) así como de hacer al SST3 competente para la secreción (Wagner, 2010) debido a que este conjunto de proteínas incluye a EscN, la ATPasa<sup>‡</sup> del SST3 (Andrade, 2007), la cual es la encargada de producir energía para disociar los complejos chaperona-efector y desplegar los sustratos a exportar para permitir su paso a través de la aguja/filamento (Akeda, 2005).

---

\* Las secretinas son una familia de proteínas que forman poros en la membrana externa de las bacterias. Las secretinas no sólo forman parte del SST3, sino que participan también en los sistemas de secreción tipo dos (SST2), en el pili tipo IV, en los sistemas de captación de DNA foráneo, y en los sistemas de exportación y ensamblado de fagos filamentosos.

‡ Las ATPasas son una clase de enzimas que hidrolizan ATP en ADP liberando fosfato inorgánico. En la gran mayoría de los casos, la energía resultante de esta reacción exergónica es aprovechada acoplándola a otra reacción química en la célula que de otro modo no se efectuaría.



**Figura 3. Esquema del sistema de secreción tipo III de EPEC.** IM (membrana interna, del inglés *inner membrane*), PG (peptidoglicano), OM (membrana externa, del inglés *outer membrane*), HM (membrana del hospedador, del inglés *host membrane*). Imagen cortesía de Díaz, M. y García, E.

Desde que el término sistema de secreción tipo III se acuñó en 1993 (Salmond, 1993) se ha expandido nuestro conocimiento sobre su estructura, biogénesis y funcionamiento. No obstante, hasta la fecha, aún existen componentes moleculares cuyo papel en el sistema se desconoce. Uno de estos casos es el producto codificado por el marco de lectura abierto *orf4*, localizado en el operón *LEE1* de la isla LEE el cual, a pesar de ser esencial para el funcionamiento del SST3 de EPEC, no se encuentra caracterizado funcionalmente.

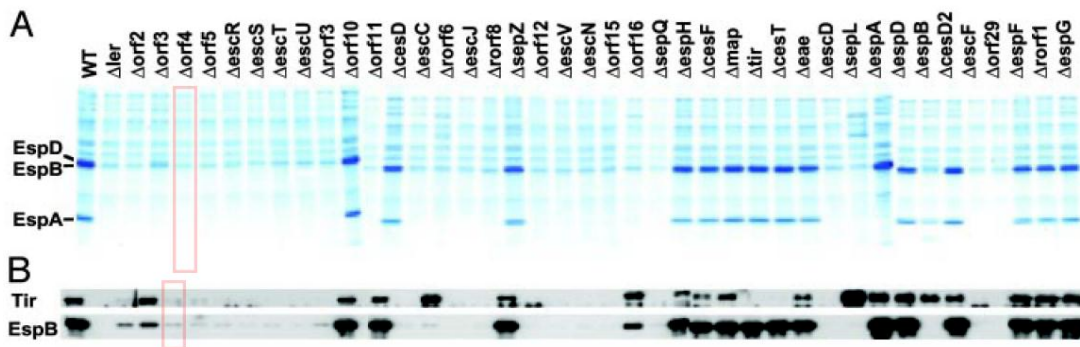
## ANTECEDENTES

### ***Orf4 es esencial para el funcionamiento del SST3***

En un estudio publicado en el 2004 por Mundy *et al.* en el cual, mediante mutagénesis de firmas etiquetadas (*signature-tagged mutagenesis* en inglés, el cual consiste en inactivar genes del

organismo a estudiar mediante la inserción al azar de un transposón), se buscaba identificar *in vivo* a los genes requeridos para la colonización del patógeno A/E de ratón *Citrobacter rodentium*, se reportó que una mutante con el gen *orf4* inactivo era incapaz de colonizar el tracto gastrointestinal de ratones (Mundy, 2004).

En un estudio posterior más detallado, se deletaron sistemáticamente los 41 genes del LEE de *C. rodentium* y se caracterizó la expresión de los genes del LEE, la capacidad para secretar proteínas vía SST3 y la habilidad *in vivo* de dichas mutantes para formar la lesión A/E e infectar ratones (Deng, 2004). Los resultados obtenidos en dicho trabajo reportan que *orf4* no se encuentra involucrado en la transcripción de los genes de LEE pues la producción celular de proteínas no parece verse afectada. Sin embargo, se encontró que Orf4 es indispensable para que el SST3 de *C. rodentium* secrete translocadores y efectores (Figura 4). También corroboraron que *orf4* es esencial para que este patógeno sea virulento en ratones.



**Figura 4. Perfil de secreción de las mutantes de los 41 genes del LEE en *C. rodentium* estudiadas en el trabajo de Deng *et al.*, analizadas mediante (A) SDS-PAGE y (B) Western blot usando anticuerpos contra el translocador EspB y el efector Tir. La delección del gen *orf4* abate la secreción de efectores y translocadores. Imagen modificada de Deng, *et al.* 2004.**

### ***Posibles equivalentes funcionales de Orf4 en otros SST3***

Debido a la escasa información acerca de la función que Orf4 pudiera estar desempeñando en el SST3 de virulencia, se buscaron estudios reportados acerca de posibles homólogos de Orf4 en SST3 de otras bacterias que pudieran dar indicios del papel de Orf4 en la secreción.

En un artículo de revisión publicado por Deane *et al.* se menciona que Orf4 pertenece a una familia de proteínas asociadas a la ATPasa (Deane, 2010), familia a la que también pertenecen MxiK (de *Shigella flexneri*), YscK (de *Yersinia sp.*) y OrgA (de *Salmonella sp.* SPI-1). En una revisión posterior se vuelve a hacer referencia a estas tres proteínas como proteínas homólogas a Orf4 (Kosarewicz, 2012).

**MxiK de *Shigella*.** Al igual que en el caso de Orf4, son pocos los reportes acerca de MxiK. Jouihri *et al.* hicieron un estudio funcional de la proteína MxiK (Jouihri, 2004) y encontraron que:

- i. Una mutante  $\Delta mxiK$  resulta incapaz de secretar translocadores (IpaB e IpaC los cuales son los translocadores en el SST3 de *Shigella*). Así mismo se observó por microscopía electrónica el SST3 en esta mutante y se vio que carecía de la aguja externa. A diferencia de la cepa silvestre, la mutante  $\Delta mxiK$  fue incapaz de invadir células HeLa.
- ii. La sobreproducción de MxiK (equivalente a EscI, el eje interno del SST3) en la mutante  $\Delta mxiK$  restaura el ensamblado de un SST3 funcional.
- iii. MxiK interacciona con Spa47 (ATPasa homóloga a EscN) y con Spa33 (anillo citoplásmico equivalente a EscQ en EPEC). Dicha interacción se encontró mediante el sistema de doble híbrido en levadura (Y2H, del inglés *yeast two-hybrid*).

**YscK de *Yersinia*.** En el SST3 de *Yersinia pestis* se ha mostrado, mediante el sistema de doble híbrido en levadura, que YscK interactúa con YscQ (anillo citoplásmico) y en menor medida con YscN (ATPasa) (Plano, 2000). En otro estudio, Diepold y Cornelis determinaron, mediante fusiones a proteínas fluorescentes, que YscK es necesario para la correcta localización y ensamblado de YscN y YscQ en la membrana citoplasmática (Diepold, 2010).

**OrgA de *Salmonella*.** Por su parte, para OrgA de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se propone que esta proteína forma un complejo multiproteico citoplásmico con OrgB (propuesta por Deane como posible homólogo a EscL de EPEC, un regulador funcional de la ATPasa) y SpaO (equivalente funcional de EscQ en EPEC). Este complejo fungiría como una plataforma de clasificación secuencial encargado de “formar” en el aparato de exportación a las proteínas del SST3 en el orden correcto para

ser secretadas (Lara-Tejero, 2011).

## HIPÓTESIS

Con base en similitudes de baja identidad con componentes del SST3 de otras enterobacterias y pensando en que la red de interacciones proteína-proteína del SST3 se encuentre conservada a través de los distintos linajes bacterianos, se plantea la siguiente hipótesis:

Orf4 es un componente citoplásmico del aparato de exportación del SST3 de EPEC que interactúa directamente con EscQ (anillo citosólico) y con EscN (ATPasa del SST3 de EPEC), permitiendo así la correcta localización de estas proteínas y/o actuando como un posible modulador de la actividad de la ATPasa.



## OBJETIVOS

### ***Objetivo general***

Caracterizar funcionalmente a la proteína Orf4 codificada en la isla de patogenicidad LEE de *Escherichia coli* enteropatógena E2348/69 0127:H6 (EPEC).

### ***Objetivos específicos***

- Determinar la existencia de proteínas homólogas a Orf4 en otros SST3 para tratar de obtener información acerca de la posible función de Orf4 mediante un análisis comparativo.
- Analizar el fenotipo resultante de eliminar al gen *orf4* en EPEC.
  - Describir el perfil de secreción general de translocadores y efectores en la mutante  $\Delta orf4$ .
  - Determinar si la sobreproducción de Orf4 tiene algún efecto sobre la función normal del SST3 de virulencia o sobre el sistema flagelar de EPEC.
- Producir y purificar a la proteína Orf4 recombinante para la obtención de anticuerpos policlonales
- Determinar si Orf4 interacciona directamente con la ATPasa EscN del SST3.

## RESULTADOS

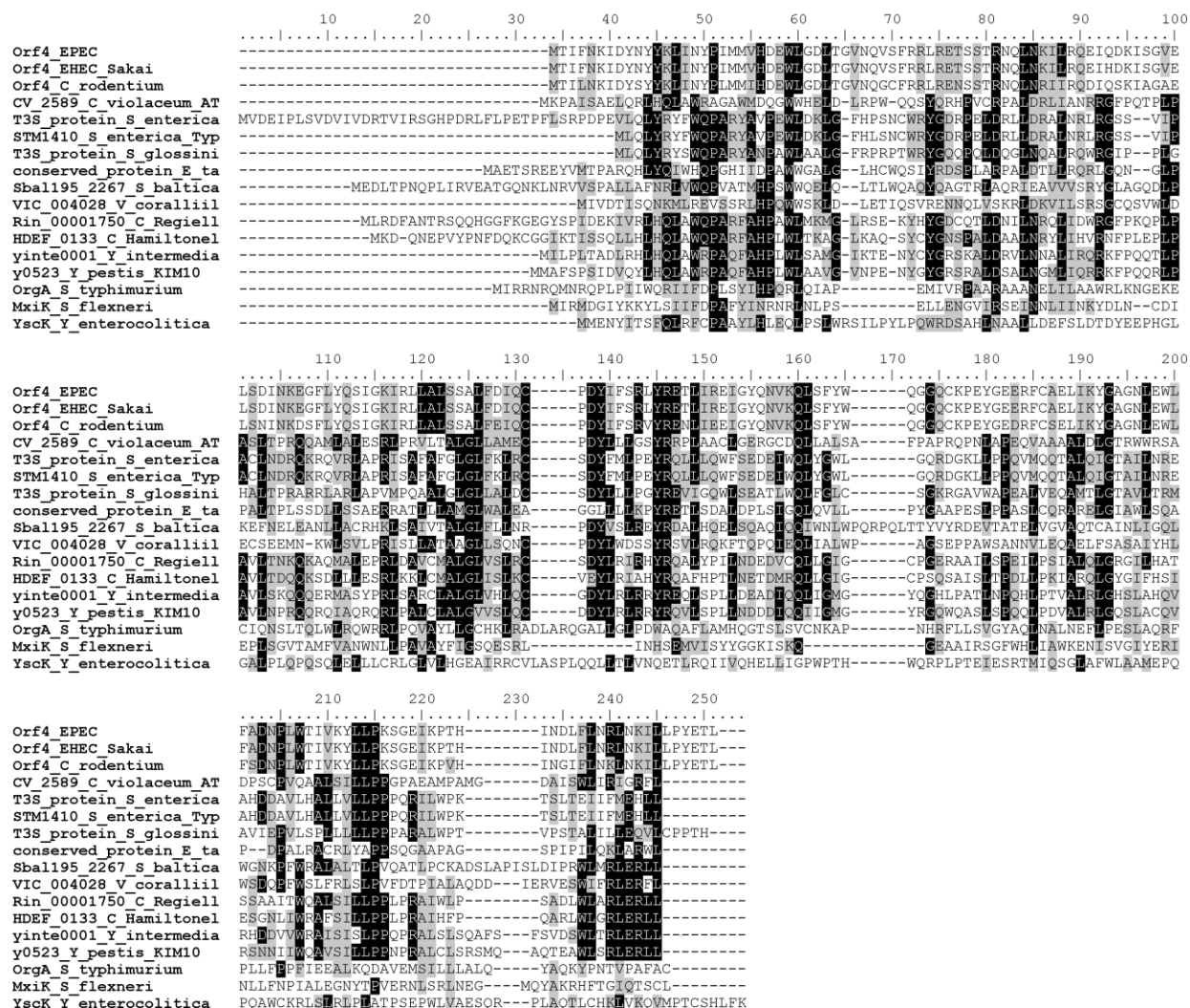
### ***Búsqueda de proteínas homólogas a Orf4***

Con el objetivo de asignarle una posible función a Orf4, se buscó si se podían encontrar proteínas anotadas en las bases de datos genómicas disponibles que fueran significativamente similares a Orf4. Para esto se realizó una búsqueda en la base de datos de NCBI con PSI-BLAST<sup>1</sup> usando a Orf4 como proteína *query*. Si bien es importante recalcar que aún después de que la búsqueda por parte del PSI-BLAST convergió al término de cinco iteraciones, ninguna de las tres proteínas propuestas como equivalentes por Deane *et al.* (MxiK, YscK, OrgA) se recuperó, sí se encontraron diversas proteínas con una identidad a Orf4 estadísticamente significativa (*e-value* < 0.001). Sin embargo, ninguno de estos posibles homólogos de Orf4 que se encontraron contaba con una anotación funcional (es decir, hasta el momento para todos se desconoce la función).

Se realizó un alineamiento múltiple tomando una muestra de once de las proteínas que resultaron con identidad significativa en el PSI-BLAST, más las tres proteínas propuestas por Deane *et al.*, junto con Orf4 de EPEC, EHEC O157:H7 EDL 933 y de *C. rodentium*. En la figura 5 se muestra el alineamiento múltiple generado en ClustalW2 (Larkin, 2007). Si bien, como se mencionó, ninguno de estos posibles homólogos se encuentra anotado funcionalmente, se detectaron varios sitios altamente conservados que podrían ser importantes para la función de Orf4. En futuros experimentos, estos sitios conservados podrían ser candidatos a mutaciones puntuales para probar si efectivamente son importantes para la función de Orf4 en el sistema de secreción tipo III de EPEC.

---

<sup>1</sup> PSI-BLAST es una variante de BLAST usada para encontrar proteínas homólogas evolutivamente lejanas que compartan baja similitud en la secuencia. Comienza realizando un BLASTp normal. Con las secuencias obtenidas se realiza un alineamiento múltiple para posteriormente, basándose en la frecuencia de los aminoácidos del alineamiento, generar una matriz de sustitución llamada PSSM (del inglés *position-specific scoring matrix*). PSI-BLAST usa la matriz PSSM en lugar de una secuencia individual para buscar en la base de datos proteínas similares. El proceso se repite varias veces hasta que el proceso ha convergido, es decir, hasta que ya no detecta nuevas secuencias con similitud significativa.



**Figura 5. Alineamiento múltiple de posibles homólogos de Orf4 de EPEC 2348/69.** Usando el programa CLUSTALW2 (Larkin, 2007) se alineó la secuencia de la proteína Orf4 de los patógenos A/E junto con once de las proteínas obtenidas en la búsqueda mediante PSI-BLAST. Se anexaron también los equivalentes funcionales propuestos por Deane (YscK, MxiK y OrgA correspondientes a las últimas 3 secuencias en el alineamiento). NP\_290285.1 [de *Escherichia coli* O157:H7 str. EDL933], YP\_002331427.1 [de *Escherichia coli* O127:H6 str. E2348/69], AAL06352.1 [de *Citrobacter rodentium*], EGY29852.1 [de *Candidatus* Regiella insecticola R5.15], ZP\_04636953.1 [de *Yersinia intermedia* ATCC 29909], YP\_002923054.1 [de *Candidatus* Hamiltonella defensa 5AT (*Acyrtosiphon pisum*)], NP\_667860.1 [de *Yersinia pestis* KIM10+], EHC38907.1 [de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Alachua str. R6-377], NP\_902259.1 [de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472], YP\_001554695.1 [de *Shewanella baltica* OS195], NP\_460375.1 [de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2], ZP\_05887516.1 [de *Vibrio coralliilyticus* ATCC BAA-450], AAX55259.1 [de *Edwardsiella tarda*], YP\_454976.1 [de *Sodalis glossinidius* str. 'morsitans'], NP\_085303 [de *Shigella flexneri* 5a str. M90T], NP\_783696 [de *Yersinia enterocolitica*], NP\_461791 [de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2]. Para que un residuo en el alineamiento tenga fondo negro o gris, al menos el 50% de los residuos que se alinearon en ese sitio deben de ser idénticos o similares respectivamente.

Mediante inferencia bayesiana (ver Materiales y métodos) se reconstruyó el árbol filogenético de dichas proteínas (**Figura 6**). El análisis filogenético confirma que Orf4 se encuentra evolutivamente más cercano a los homólogos encontrados en este trabajo que a Ysck, OrgA o a MxiK.

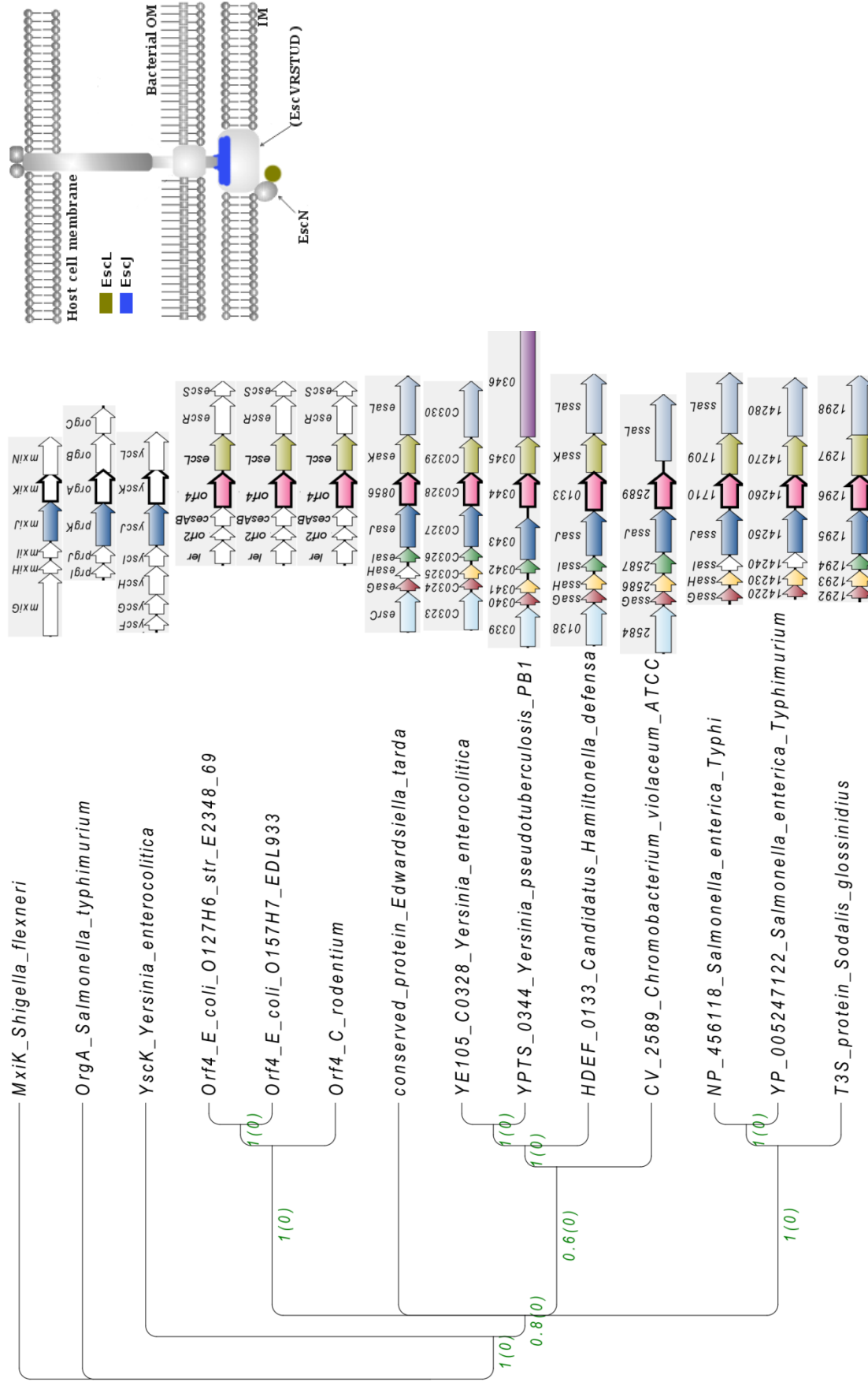
### **Contexto genómico de orf4**

El genoma es dinámico y por lo tanto tiende a sufrir múltiples rearrreglos durante su evolución, de manera que la conservación del orden local de los genes a través de distintos linajes bacterianos refleja restricciones funcionales de los mismos (Suyama, 2001). Examinar la conservación del orden de los genes puede proporcionar indicios acerca de la función de dichos genes. Por tal razón se exploró el contexto genómico de *orf4* y se comparó con el contexto genómico de los homólogos a Orf4 que se encontraron mediante PSI-BLAST (ver *Búsqueda de proteínas homólogas a Orf4*).

Corriente abajo de *orf4* se localiza el gen que codifica para la proteína EscL, un regulador funcional de la ATPasa y que pertenece a la familia YscL/FliH (Tabla 2, Pallen, 2005). Como se observa en la figura 6, a excepción de la proteína CV\_2589 de *C. violaceum*, todas las proteínas homólogas a Orf4 que se obtuvieron en la búsqueda por PSI-BLAST así como también las proteínas propuestas por Deane como homólogas a Orf4, tienen corriente abajo a un miembro de la familia YscL/FliH como vecino.

Por otro lado, el gen corriente arriba de todos los homólogos a Orf4 corresponde a un integrante de la superfamilia YscJ/FliF, lipoproteína con un dominio periplásmico que forma parte del anillo de membrana interna del cuerpo basal de los SST3 (ver *SST3 de Escherichia coli enteropatogena*). En la isla LEE la lipoproteína correspondiente, EscJ, se encuentra codificada en el operón *LEE2* (ver *Isla de patogenicidad LEE*). En cambio, el gen río arriba inmediato a *orf4* codifica para la proteína CesAB, la cual parece ser una chaperona única de los patógenos A/E puesto que no se han encontrado homólogos fuera de la isla LEE (Pallen, 2005).

Los resultados obtenidos del análisis de contexto genómico apoyan la propuesta de que Orf4 pertenece a la familia Ysck.



**Figura 6. Árbol filogenético y contexto genómico de Orf4 y sus homólogos en otros SST3.** Filogenia molecular de los homólogos de Orf4 inferido con MrBayes v3.2.0 (ver Materiales y métodos). Se muestra en verde junto a cada nodo la probabilidad  $\alpha$  posterior asignadas por MrBayes que soporta a cada clado. También para cada homólogo de Orf4 se muestra su contexto genómico: en rosa Orf4 y sus homólogos detectados por PSI-BLAST, en verde olivo las proteínas de la familia YscL/FliH, en azul las proteínas de la familia YscJ/FliF. En el recuadro de la esquina superior derecha se representa la localización de las proteínas EscL y EscJ en un esquema del SST3 de EPEC.

## **Fenotipo de EPEC $\Delta orf4$**

Con el objetivo de caracterizar a la mutante EPEC  $\Delta orf4$  que se construyó previamente en el laboratorio mediante el sistema de la recombinasa Red del fago  $\lambda$  (Datsenko, 2000), se analizó el perfil general de secreción de EPEC tanto en gel SDS-PAGE como por análisis por inmunodetección en condiciones *in vitro* adecuadas para que EPEC exprese el LEE y secrete proteínas de virulencia (ver *Materiales y métodos*). Como se observa en la figura 7, una mutante de EPEC que carece del gen *orf4* no secreta ni translocadores ni efectores al medio. Cuando la mutante  $\Delta orf4$  se complementa con *orf4* clonado en el vector pTrc sin y con etiqueta de histidinas (pMTo4 y pMTHo4 respectivamente), el fenotipo de secreción se restaura a niveles similares a la EPEC silvestre (**Figura 7A**). La secreción es restaurada también cuando Orf4 es expresada desde la construcción pAEo4 (pET19b + *orf4*) y desde la construcción pSAto4 (pACTrc + *orf4*).

En el panel B de la figura 7 se observa el mismo fenotipo -de no secreción en la mutante  $\Delta orf4$  y restauración de la misma al ser complementada con Orf4 expresada desde un plásmido- cuando el sobrenadante se analiza mediante WB usando anticuerpos contra efectores (Tir, EspF).

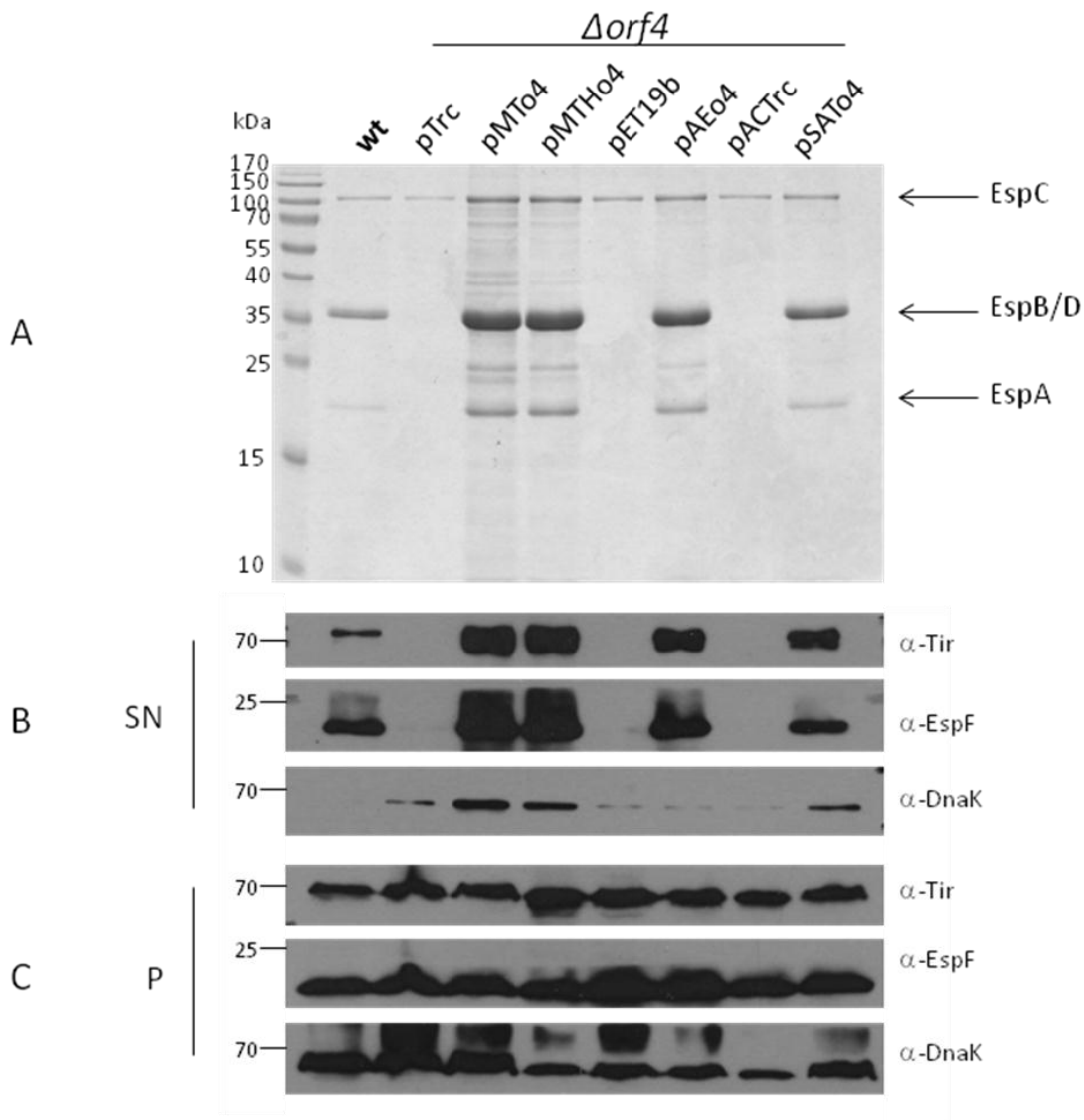
Del mismo modo se analizaron las pastillas celulares para verificar que el fenotipo observado no se debiera a un defecto en la síntesis de proteínas. Como se observa en el panel C de la figura 7, la cantidad de proteínas en la pastilla celular es similar en las cepas analizadas por lo que el fenotipo observado no se debe a un defecto en la producción de las proteínas del SST3.

De manera adicional, se hizo una inmunodetección contra DnaK -una chaperona celular que no se secreta al medio- para confirmar que las proteínas recuperadas del sobrenadante hubiesen sido secretadas por el SST3 y no se encontraran en el medio debido a una lisis celular. Como control de carga se realizó un WB contra DnaK en pastillas celulares (**Figura 7B**). En el sobrenadante de las cepas complementadas con las construcciones pMTo4 y pMTHo4 se detectó una cantidad significativa de DnaK lo que indica que ocurrió una lisis celular (**Figura 7B**). Si bien las cepas complementadas con Orf4 presentan estrés celular, a juzgar por la complementación observada en el Coomassie, sólo una fracción de la población presenta lisis celular.

Una mutante nula de *orf4* no es capaz de secretar ni efectores ni translocadores vía SST3. Esto concuerda con los resultados publicados previamente para *C. rodentium* por Deng (Deng, 2004).

El que la mutante  $\Delta orf4$  haya podido ser complementada nos indica que este fenotipo de no secreción se debe a la falta de la proteína Orf4 y no a un efecto polar sobre el operón LEE1 cuando se construyó la mutante.

Las versiones de Orf4 con la etiqueta de histidinas (pMTHo4 y pAEo4) complementan a una mutante  $\Delta orf4$  lo que nos indica que la proteína recombinante es funcional a niveles aparentemente iguales que la versión no etiquetada. Esto es importante para futuros experimentos en los que se requiera Orf4 purificada ya que se probó que la etiqueta de histidinas no altera su función.



**Figura 7. Caracterización del fenotipo de secreción de la mutante  $\Delta orf4$ .** Se muestra el perfil de secreción analizado en SDS-PAGE (A) de las cepas de EPEC silvestre (wt),  $\Delta orf4$  complementada con pTrc, con Orf4 en pTrc (pMTo4), con His-Orf4 en pTrc (pMTHo4), con el vector pET19b, con His-Orf4 en pET19b (pAEo4), con el vector pACTrc y con Orf4 en pACTrc (pSATO4). Inmunodetección de efectores (Tir y EspF) y de la chaperona celular DnaK en (B) sobrenadantes y (C) pastilla celular.



## ***Efecto multicopia de Orf4 en la secreción de EPEC***

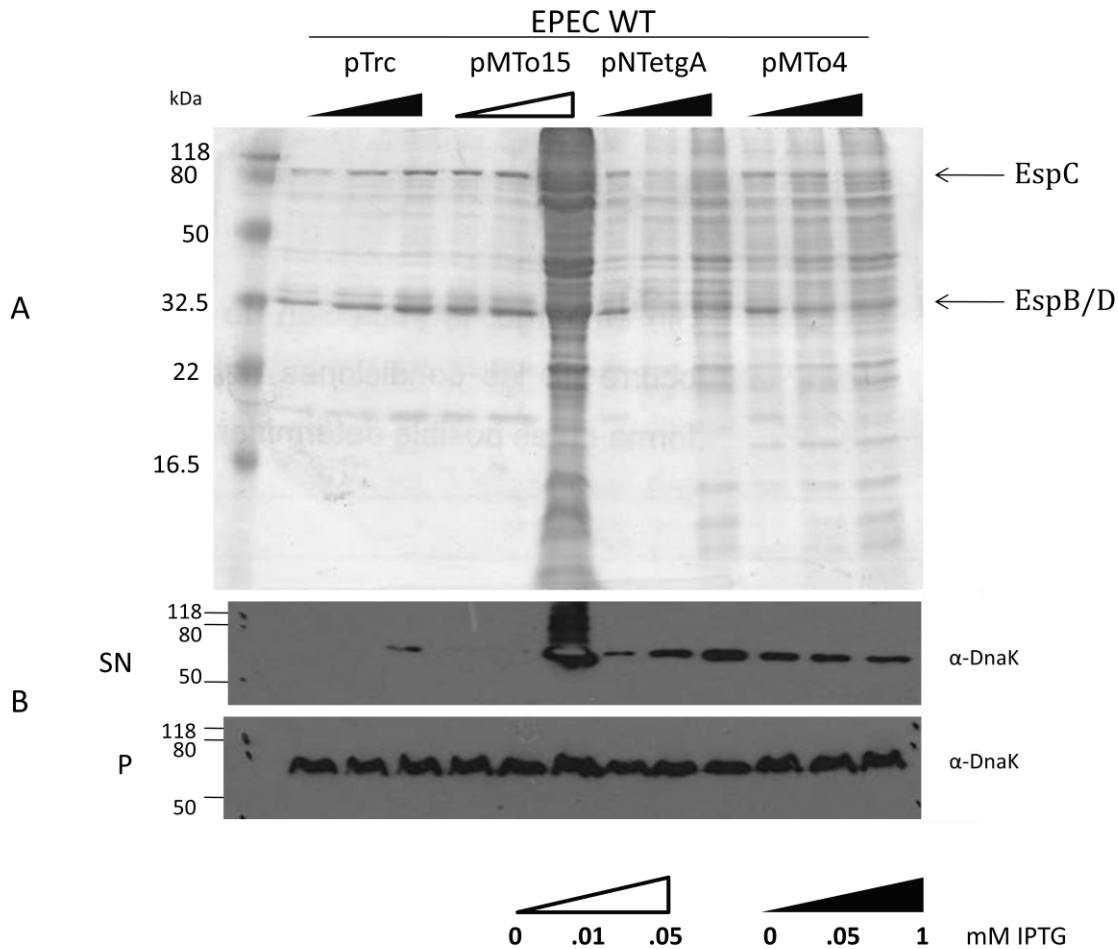
Se ha reportado que la sobreproducción de algunos componentes del SST3 interfiere con el correcto funcionamiento del sistema de secreción. Esto se ha visto en proteínas como la chaperona flagelar FliJ cuya sobreexpresión produce una disminución en el nado de *Salmonella* spp. (Minamino, 2000). En el sistema de virulencia de EPEC se ha visto que proteínas codificadas en la isla LEE como Orf15 producen una disminución importante de la secreción de proteínas vía SST3 cuando se encuentran en exceso (Romo y González-Pedrajo, datos sin publicar) lo que pudiera indicar una posible relación funcional de la proteína sobreproducida con componentes esenciales del aparato de exportación. Para estudiar si dicho efecto se presenta al sobreproducir a la proteína Orf4, se indujo la sobreexpresión de *orf4* en un fondo EPEC silvestre y se comparó con el efecto de la sobreproducción de la proteína Orf15.

En el experimento de complementación se observó que la expresión de Orf4 resulta en una moderada lisis celular. Para tener una medida relativa del grado de lisis celular ocasionada por la sobreproducción de Orf4, se comparó también el efecto de la sobreproducción de Orf4 contra el efecto de la sobreproducción de EtgA, la transglucosilasa lítica codificada en el LEE cuya producción en exceso ocasiona una clara lisis celular en EPEC (García-Gómez, 2011).

Para permitir la comparación directa entre las cepas en este experimento, todas las construcciones (pMTo15, pNTetgA y pMTo4) se expresaron a partir del vector pTrc99A el cual es inducible por IPTG. Se indujo la expresión de las construcciones en las cepas correspondientes tres horas después de haber iniciado el cultivo en DMEM con la concentración de IPTG indicada (ver Materiales y métodos).

Tanto la expresión de EtgA como la expresión de Orf4 producen una serie de bandas en el perfil de secreción analizado por SDS-PAGE (**Figura 8A**), incluso cuando no se induce su expresión con IPTG. En cambio la sobreexpresión de Orf15 tuvo un marcado efecto de lisis cuando la cepa se indujo con concentraciones por encima de 0.05 mM de IPTG.

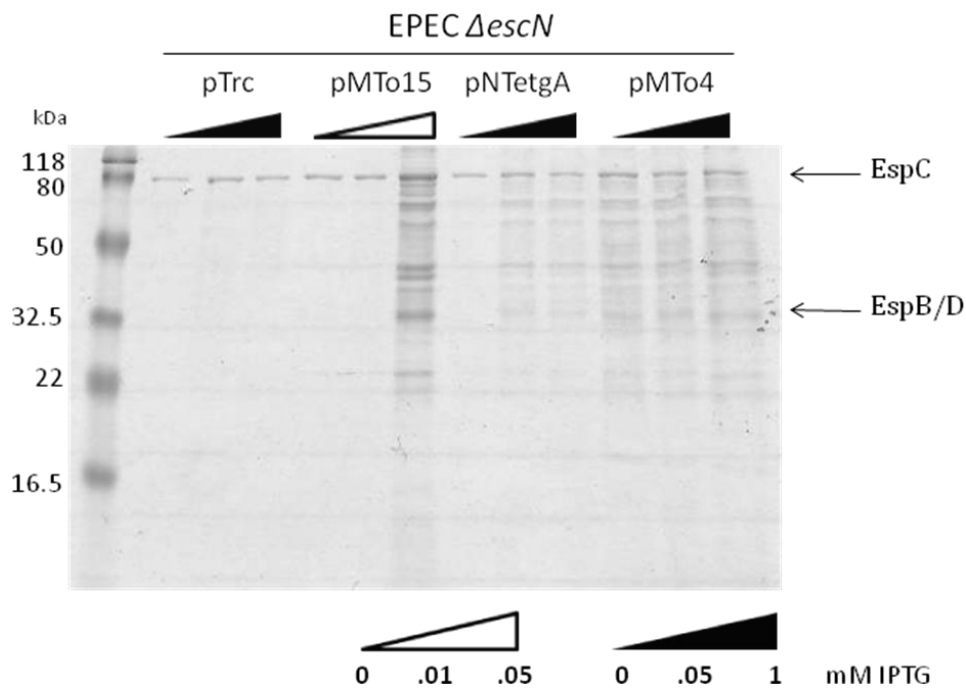
Los niveles de DnaK detectados en el medio de la cepa transformada con EtgA son apreciablemente mayores que los detectados en los sobrenadantes de las cepas transformadas con Orf4 cuando se induce la expresión de las proteínas con IPTG (**Figura 8B**).



**Figura 8. Efecto multicopia de Orf4 en EPEC silvestre.** Se muestra el perfil de secreción analizado en **(A)** SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie de las cepas de EPEC silvestre complementada con pTrc, Orf15 (pMTo15), EtgA (pNTetgA) y Orf4 (pMTo4). Como control, se analizó por **(B)** inmunodetección la presencia de DnaK en el sobrenadante (SN) y en la pastilla celular (P). Las cepas se indujeron con la concentración de IPTG indicada tres horas después de haber iniciado el cultivo en el medio DMEM.

Debido a que se piensa que Orf4 tiene una relación funcional con EscN, la ATPasa del SST3 de EPEC, se exploró la posibilidad de que el fenotipo observado de lisis fuera dependiente de EscN. Para descartar esta posibilidad se llevó a cabo el experimento de efecto multicopia en una mutante  $\Delta escN$ .

Cuando se analizó el sobrenadante de las distintas cepas por SDS-PAGE, se observó el mismo fenotipo de bandeo correspondiente a lisis celular (**Figura 9**). Por lo tanto se concluyó que la lisis ocasionada por la sobreproducción de EtgA, Orf15 y de Orf4 en los experimentos multicopia es independiente de la presencia de la ATPasa y por ende de un SST3 funcional.



**Figura 9. El efecto de lisis celular es independiente de un SST3 funcional.** Perfil de secreción analizado mediante SDS-PAGE de la cepa de EPEC  $\Delta escN$  complementada con pTrc, Orf15 (pMTo15), EtgA (pNTetgA) y Orf4 (pMTo4). Las cepas se indujeron con la concentración de IPTG indicada tres horas después de haber iniciado el cultivo en el medio DMEM.

## ***Efecto de Orf4 en la motilidad bacteriana***

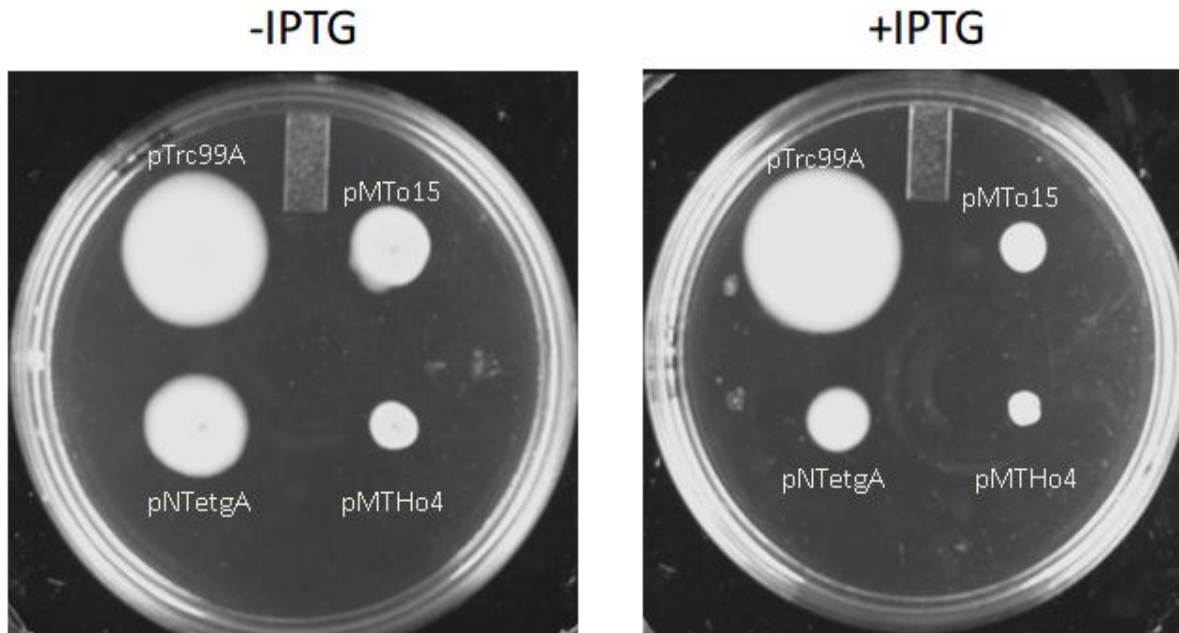
La sobreproducción de componentes del sistema flagelar (tal como FliJ, chaperona del aparato de exportación del flagelo) repercute negativamente en la capacidad de nado en la cepa silvestre de *Salmonella* (Minamino, 2000).

Del mismo modo, en EPEC, la sobreproducción de Orf15 resulta en la supresión de secreción de proteínas del SST3 (Romo y González-Pedrajo, datos sin publicar), lo que sugiere que Orf15 pudiera interactuar con otros componentes clave de este sistema (ver *Efecto multicopia de Orf4 en la secreción de EPEC*). También se ha visto que cuando Orf15 (homólogo de FliJ en el SST3 de virulencia) es sobreexpresado en una cepa de *Salmonella*, la capacidad de nado de la bacteria disminuye (Romo y González-Pedrajo, datos sin publicar).

Si la hipótesis propuesta en este trabajo acerca de que Orf4 interactúa con la ATPasa EscN y con EscQ fuera correcta, entonces cabría la posibilidad de que Orf4 tuviese la capacidad de interactuar con la contraparte correspondiente de estas dos proteínas en el sistema flagelar: con la ATPasa FliI y con FliN (equivalente flagelar a EscQ).

Como un primer acercamiento para probar esta conjetura, se realizó una prueba de motilidad bacteriana en agar suave (ver *Materiales y métodos*). Se analizó la capacidad de nado de una cepa de EPEC transformada con un vector vacío (pTrc99A\_FF4) contra una cepa transformada con una construcción que expresa a His-Orf4 (pMTHo4). Como controles se comparó también la motilidad de una cepa de EPEC que expresa a Orf15 (pMTo15), el cual previamente se ha visto que tiene efecto multicopia inhibiendo el nado y la de una cepa que expresa a la transglicosilasa EtgA (pNTetgA) ya que desencadena la lisis celular.

Como se observa en la figura 10, al igual que cuando se sobreexpresa en *Salmonella*, Orf15 afecta la motilidad bacteriana en EPEC. Se observa que EtgA tiene un efecto negativo sobre el nado en comparación a la cepa que tiene el vector vacío. Sin embargo el efecto más pronunciado de inhibición del nado es producido por Orf4.



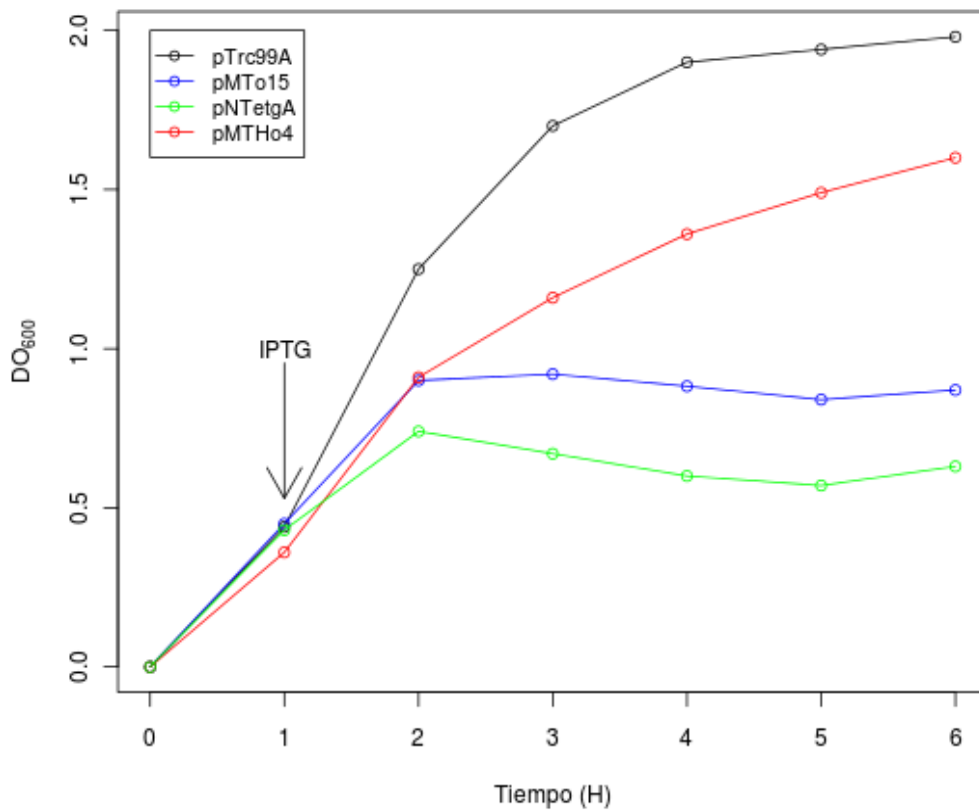
**Figura 10. Efecto de la sobreproducción de Orf4 en la motilidad de EPEC.** Se muestra la capacidad de nado de las cepas transformadas con pTrc, Orf15 (pMTo15), EtgA (pNTetgA) y His-Orf4 (pMTHo4). Las células se inocularon por punción en cajas de agar suave (A) sin IPTG o (B) con 1 mM de IPTG durante 24 h a 30 °C.

Las tres proteínas probadas en el ensayo de motilidad desencadenan lisis celular en la cepa donde son sobreexpresadas (sección *Efecto multicopia de Orf4 en la secreción de EPEC*). Para determinar si el fenotipo observado de nado reducido es causado por una disminución en el crecimiento debido a estrés celular, se evaluó el crecimiento bacteriano en cultivo líquido de las cepas usadas en el experimento de motilidad.

Se determinó la curva de crecimiento en LB para cada cepa induciendo con la misma concentración de IPTG (1 mM) que se usó en el experimento de motilidad (**Figura 11**). Las curvas de crecimiento muestran que Orf4 disminuye levemente la tasa de crecimiento de EPEC en comparación con la cepa

transformada con el vector vacío. Por su parte tanto Orf15 como EtgA inhiben en mayor medida el crecimiento bacteriano.

Conjuntando los resultados se muestra que una deficiencia en el crecimiento bacteriano no explica el fenotipo de motilidad observado para Orf4.



**Figura 11. Efecto de la sobreproducción de Orf4 en el crecimiento bacteriano.** Se sobreprodujo a las proteínas Orf15 (pMT015), EtgA (pNTetgA) y His-Orf4 (pMTH04) en cepas de EPEC silvestre. Como control se usó al vector vacío (pTrc99A). Se indica el tiempo al cual se indujeron los cultivos (1 h). La densidad óptica a 600 nm de los cultivos se determinó cada hora.

## ***La sobreproducción de EscI o de EscN en la mutante $\Delta orf4$ no restaura el fenotipo de secreción***

Como se citó en los antecedentes, en un estudio publicado acerca de la función de MxiK en el SST3 de *Shigella* spp., se encontró que la sobreproducción de MxiI (la proteína que forma al eje interno en *Shigella* spp.) podría restaurar la secreción de una mutante  $\Delta mxiK$  en el SST3 de *Shigella* (Jouihri, 2004).

Dado que MxiK es uno de los posibles equivalentes funcionales a Orf4 en el SST3 en *Shigella* spp. se probó si la sobreexpresión de EscI, proteína que forma el eje interno del SST3 de EPEC, podría restaurar la secreción de la mutante nula  $\Delta orf4$ .

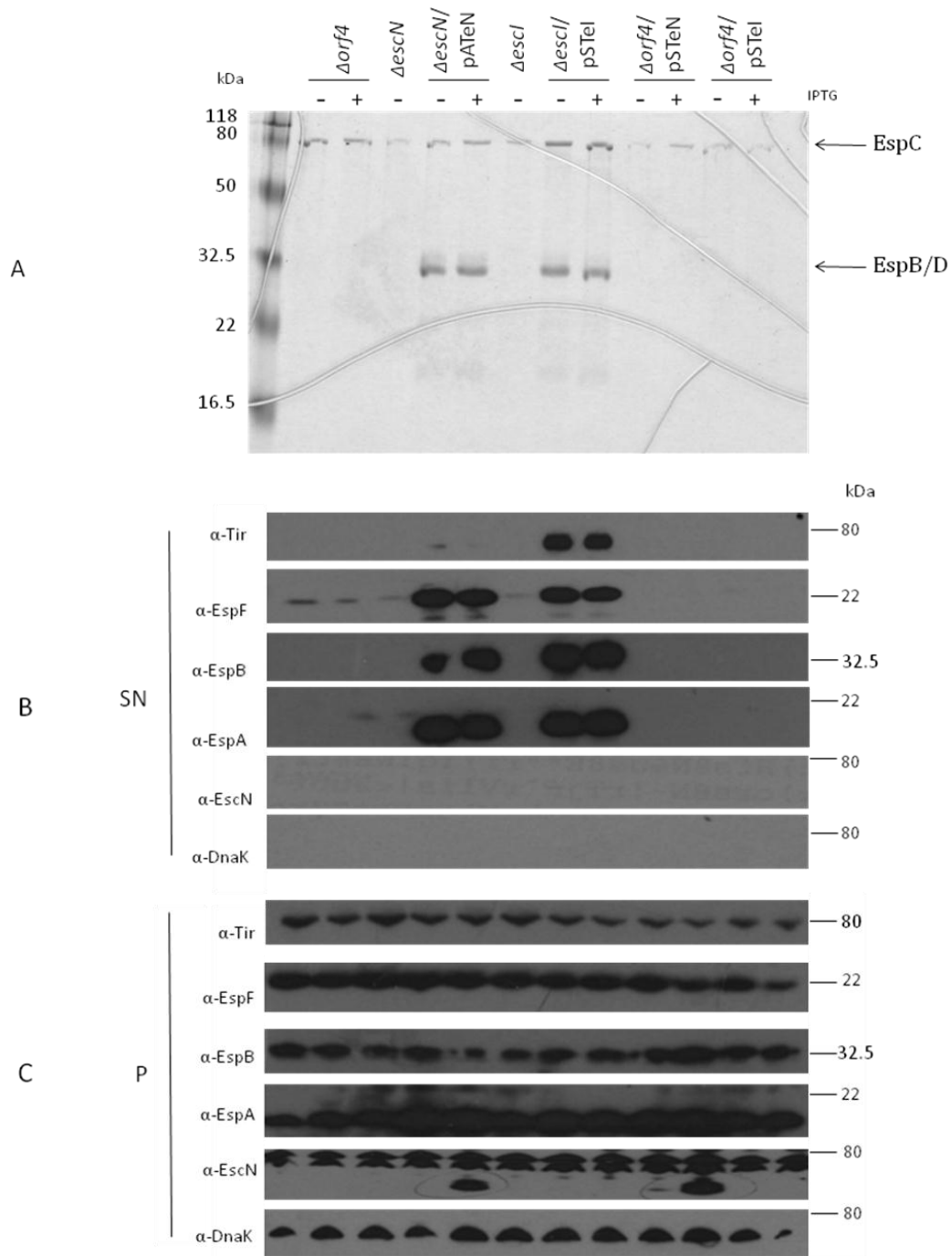
Además de esto, en nuestro grupo se había observado que al sobreproducir a la ATPasa EscN en una mutante nula del gen *orf15* (el cual es esencial para la secreción) se restauraba parcialmente el fenotipo de secreción (Romo y González-Pedrajo, datos sin publicar). A este efecto se le ha denominado efecto “bypass”. Pensando en que existiera una relación funcional entre la ATPasa y Orf4 tal que, un exceso de la primera hiciera prescindible la presencia de Orf4, se probó también si la sobreexpresión de EscN podría restaurar la secreción de la mutante  $\Delta orf4$ .

Se transformó a la mutante  $\Delta orf4$  con las construcciones en pTrc que expresan a EscN (pATeN) y a EscI (pSTel) y se analizó el perfil general de secreción mediante SDS/PAGE y WB. En búsqueda de un posible efecto más claro, se probó inducir la expresión de *escI* y *escN* en estas cepas con 0.01 mM de IPTG tres horas después de haber iniciado el cultivo en DMEM. Para corroborar que efectivamente tanto la ATPasa como el eje interno se estuvieran produciendo, se complementó a una EPEC  $\Delta escN$  con el plásmido que expresa a EscN y a una EPEC  $\Delta escI$  con el plásmido que expresa a EscI. Tanto pATeN como pSTel fueron capaces de restaurar la secreción de las mutantes  $\Delta escN$  y  $\Delta escI$  respectivamente (**Figura 12**).

Para verificar los niveles relativos de producción, se realizó un WB con anticuerpos  $\alpha$ -EscN y  $\alpha$ -EscI (**Figura 12**). La sobreproducción de EscN se detectó mediante inmunodetección (**Figura 12B**) en las cepas inducidas con IPTG. EscI no se logró detectar con la concentración de anticuerpos utilizada.

A diferencia de lo observado por Jouihri para MxiK en el SST3 de *Shigella*, el perfil de secreción y la inmunodetección realizados en este trabajo, muestran que ni la sobreproducción de la ATPasa EscN ni la sobreproducción del eje interno EscI restablece la secreción en un fondo mutante  $\Delta orf4$  en EPEC. Estos resultados sugieren que Orf4 y MxiK podrían estar involucradas en funciones moleculares distintas en sus respectivos SST3.



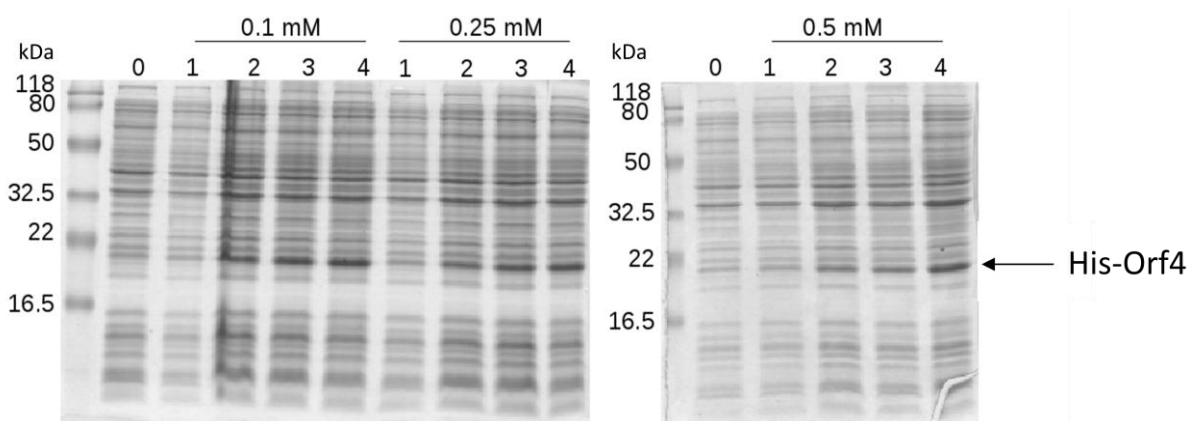


**Figura 12. Sobreproducción de EscN y EscI en la mutante de EPEC  $\Delta orf4$  no restaura el fenotipo de secreción.** Se muestra el perfil de secreción analizado en (A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las cepas de EPEC  $\Delta orf4$ ,  $\Delta escI$ ,  $\Delta escN$  complementado con EscN (pATeN),  $\Delta escI$ ,  $\Delta escI$  complementado con EscI (pSTel),  $\Delta orf4$  produciendo a EscN y  $\Delta orf4$  produciendo a EscI. Se realizó también la inmunodetección de efectores (Tir y EspF), translocadores (EspA y EspB), de la ATPasa EscN y de la chaperona celular DnaK en (B) sobrenadantes y (C) pastilla celular. Donde se indica (+) se indujo el cultivo de DMEM tres horas después de haberlo iniciado añadiendo 0.01 mM de IPTG y se tomó la muestra cuando las cepas alcanzaron una  $DO_{600} \sim 0.8$ .

## Purificación de la proteína recombinante His-Orf4

Con el fin de purificar a la proteína Orf4 se transformó en una cepa de expresión *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysS una construcción del plásmido pET19b que contenía a la versión de Orf4 etiquetada con histidinas (pAEo4).

Para encontrar las condiciones óptimas para la expresión de la proteína Orf4 se probaron tres concentraciones de IPTG para la inducción de la expresión de Orf4 (0.1 mM, 0.25 mM y 0.5 mM). Se monitoreó cada hora, después de inducir el cultivo, el perfil de expresión proteico de cada una de las tres condiciones probadas. Como se muestra en la figura 13, la producción de la proteína Orf4 se incrementa sustancialmente cuando el cultivo es inducido. Se consideró la concentración de 0.1 mM de IPTG y tres horas después de la inducción como condiciones de inducción óptimas para la proteína.

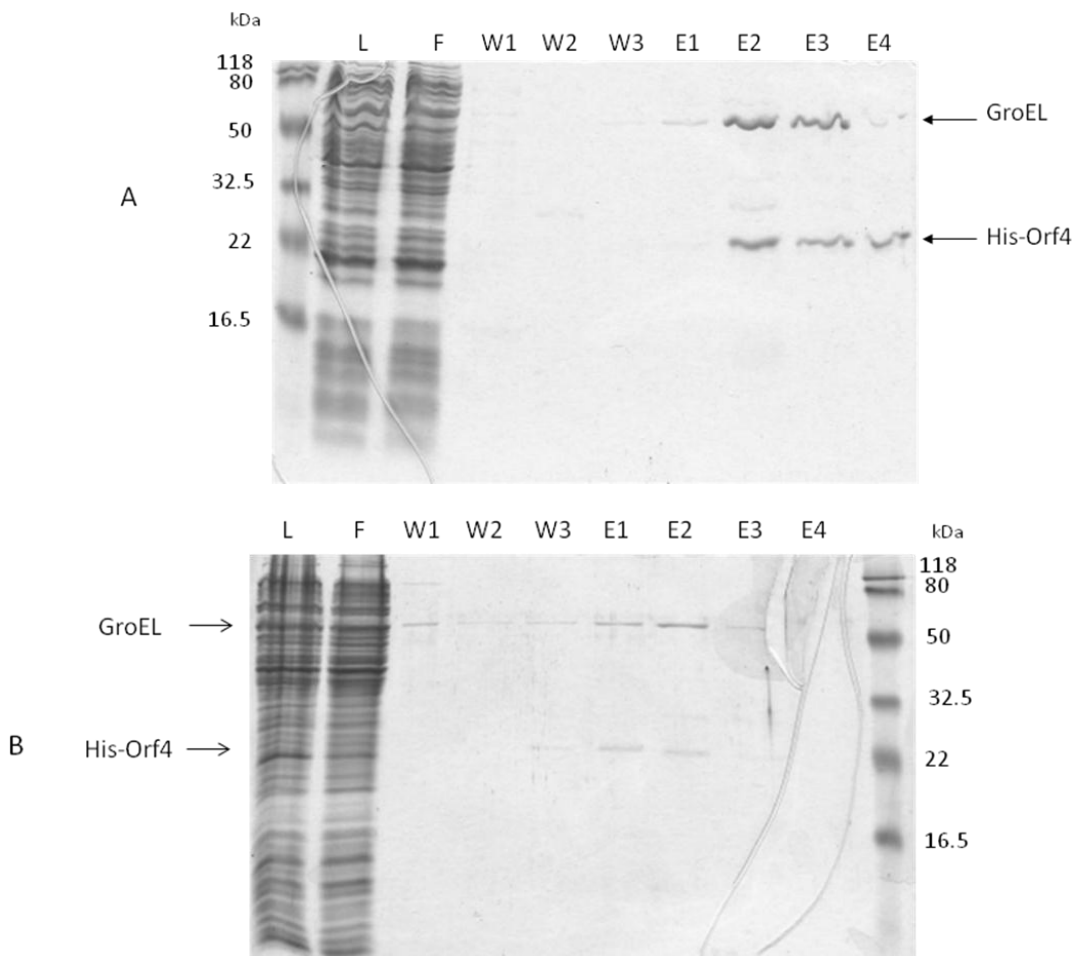


**Figura 13. Inducción de His-Orf4 en células BL21( $\lambda$ DE3)pLysS.** El plásmido pAEo4 se transformó en BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysS y se indujo la sobreexpresión de His-Orf4 a 30 °C. Se monitoreó el perfil de proteínas de la cepa cada hora durante 4 horas.

His-Orf4 se purificó mediante cromatografía de afinidad por níquel. La masa molecular deducida para Orf4 etiquetada con histidinas es de 24.84 kDa. Como se observa en la figura 14A, la banda correspondiente a Orf4 eluyó junto con otra banda cuyo peso molecular es aproximadamente 50 kDa. Previamente cuando en el grupo de trabajo se había intentado purificar a EscN por el mismo método, una banda con el mismo peso molecular al que aquí se observa eluyó junto con la ATPasa. Dicha

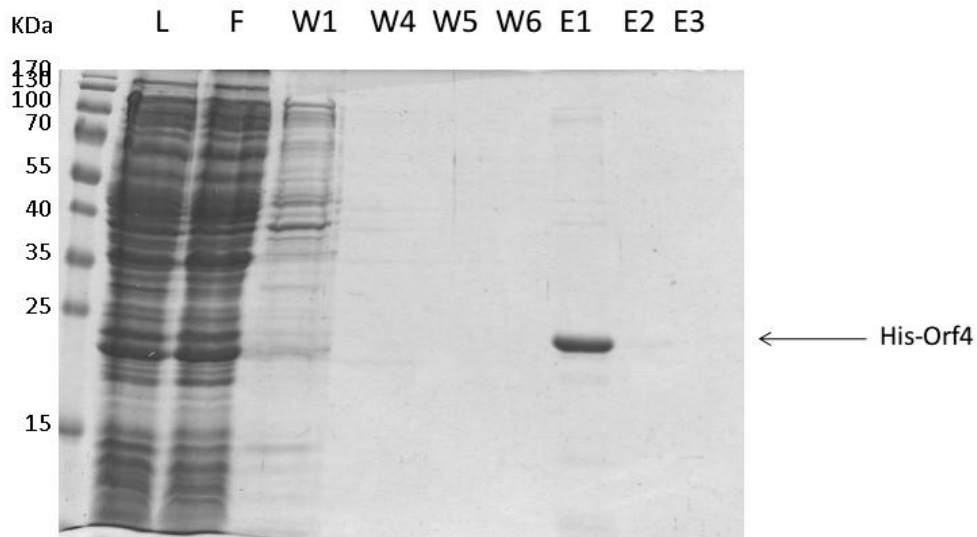
banda se mandó secuenciar resultando ser la chaperona GroEL. GroEL es una chaperona que se requiere para el plegamiento correcto de una gran variedad de proteínas tanto en bacterias como en organismos eucariontes (Hsp60 en eucariontes; Xu, 1998). Posiblemente Orf4 sobreproducida reclutó a la chaperona GroEL para su correcto plegamiento.

Para tratar de obtener a Orf4 sin el contaminante GroEL, se incrementó la concentración de NaCl para debilitar las interacciones iónicas que pudieran existir entre GroEL y Orf4. También se cambió de cepa de expresión realizando la inducción en *Salmonella Typhimurium* SJW1368 (**Figura 14B**). A pesar de los múltiples cambios en el protocolo de purificación, GroEL persistentemente eluyó con Orf4.



**Figura 14. Purificación de His-Orf4 en condiciones nativas.** Se purificó a la proteína recombinante His-Orf4 por cromatografía de afinidad induciendo al plásmido (A) pAEo4 en células BL21(DE3)pLysS o (B) pMTHo4 en células *Salmonella Typhimurium* SJW1368 con 0.1 mM de IPTG. Para los lavados se usaron 10 volúmenes de amortiguador de unión (A) TN1 (20 mM Tris-HCl pH 8 y 500 mM de NaCl) o (B) TN2 (20 mM Tris-HCl pH 8 y 1 M de NaCl). L (lisado celular), F (flujo del lisado), W (lavado), E (elución).

Para tratar de purificar a Orf4 sin GroEL como contaminante se intentó hacerlo en condiciones desnaturizantes. A grandes rasgos el procedimiento consiste en lisar la pastilla celular en un amortiguador con concentraciones altas de desnaturizante (6 M de urea) y una vez que se pasó el lisado celular por la columna de afinidad se lava con concentraciones decrecientes de desnaturizante para que la proteína unida se renaturalice (ver *Materiales y métodos*). Con este procedimiento se logró purificar a His-Orf4 sin el contaminante (**Figura 15**) y con un mayor rendimiento (700 µg de proteína pura por litro). Mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) se determinó que la concentración de proteína obtenida en la purificación mostrada en la figura 15 fue de 211 µg/ml. Esta proteína se está utilizando para generar anticuerpos policlonales contra Orf4 (ver *Materiales y métodos*).



**Figura 15. Purificación de His-Orf4 en condiciones desnaturizantes.** Se purificó a la proteína recombinante His-Orf4 por cromatografía de afinidad induciendo al plásmido pAEo4 en la cepa BL21(DE3)pLysS con 0.1 mM de IPTG. La pastilla celular se lisó con amortiguador desnaturizante, y los lavados se realizaron con concentraciones decrecientes de urea (ver *Materiales y métodos*). En el SDS-PAGE se muestra el lisado celular (L), el flujo del lisado (F), el primer lavado (W1) y los últimos tres lavados (W4-W6) y las eluciones con 500 mM de imidazol (E).

## ***Búsqueda de interacciones de Orf4 con otros componentes del SST3 de EPEC***

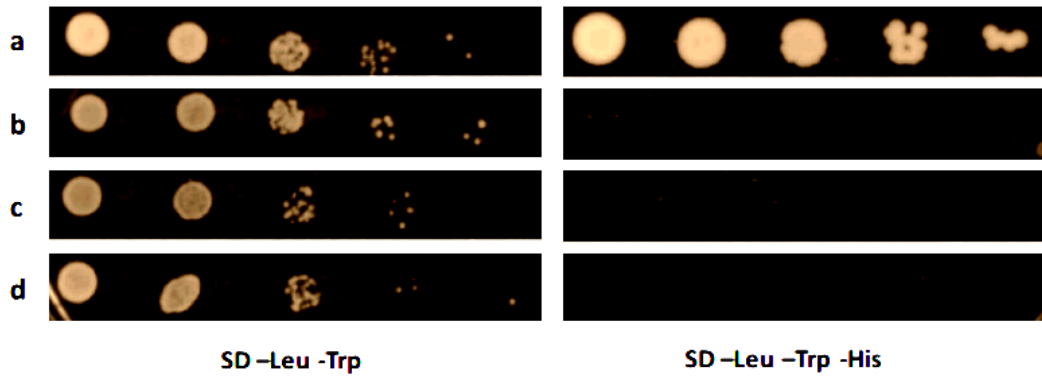
Para tratar de encontrar interacciones de la proteína Orf4 con otros elementos del aparato de secreción del SST3, se probó *in vivo* la interacción de Orf4 con EscN mediante el sistema de doble híbrido en levadura.

La cepa AH109 de *Saccharomyces cerevisiae* se cotransformó con las siguientes construcciones:

<b>a</b>	pGBKT7-53	pGADT7-T	Control positivo de interacción
<b>b</b>	pGBKT7-Lam	pGADT7-T	Control negativo de interacción
<b>c</b>	pSGBKo4	pGADT7	Control de autoactivación
<b>d</b>	pSGBKo4	pNGADeN	Prueba de interacción Orf4 con EscN

Se realizaron diluciones seriadas de las colonias cotransformadas (ver *Materiales y métodos*) y se gotearon 3  $\mu$ L sobre agar SD –Leu –Trp como control de crecimiento (**Figura 16**, panel izquierdo) y en agar SD –Leu –Trp –His para seleccionar las interacciones positivas (**Figura 16**, panel derecho).

Como se observa en la figura 16, mediante el sistema de doble híbrido en levadura, no se detectó una interacción directa entre la proteína Orf4 y EscN.



**Figura 16. Ensayo de doble híbrido en levadura Orf4-EscN.** Se muestran las diluciones seriadas de *S. cerevisiae* cepa AH109 en agar SD–Leu–Trp (panel izquierdo) y agar SD–Leu–Trp–His (panel derecho) cotransformada con (a) pGADT7-T y pGBKT7-53, (b) pGADT7-T y pGBKT7-lam, (c) pGADT7 y pSGBKo4 y (d) pNGADeN y pSGBKo4. Las diluciones se dejaron crecer a 30 °C durante tres días (panel izquierdo) o durante seis días (panel derecho) para tratar de detectar interacciones débiles entre la proteína carnada y la proteína presa.

## DISCUSIÓN

El SST3 es una nanomaquinaria molecular altamente sofisticada y compleja compuesta de múltiples proteínas. Estos sistemas de secreción son cruciales para la biología de muchas bacterias patógenas y simbioses incluida la bacteria patógena de humano *E. coli* enteropatógena (EPEC).

El SST3 de EPEC, debido en buena parte al interés médico, ha sido un modelo de interés importante para entender la biología de bacterias patógenas que usan este sistema de secreción. A pesar de esto, sólo recientemente se ha comenzado a dilucidar el rol biológico de los marcos de lectura abiertos con función desconocida de la isla LEE. Ejemplos de esto es la reciente caracterización molecular de rOrf8, el eje interno del SST3 de EPEC ahora nombrado como Escl (Sal-Man, 2012) y de la proteína estructural Orf15 del SST3 de EPEC (Sal-Man, 2012).

Además del fenotipo de no secreción en *C. rodentium* de la mutante  $\Delta orf4$  (Deng, 2004), la información de la que se dispone en la literatura acerca de esta proteína es prácticamente nula.

En este trabajo se determinó que Orf4 es una proteína esencial para la secreción de translocadores y efectores en EPEC vía SST3. El fenotipo de secreción en la mutante  $\Delta orf4$  se restauró cuando *orf4* se expresó *in trans*. El fenotipo de no secreción de la mutante  $\Delta orf4$  y el hecho de que el nivel de proteínas translocadoras y efectoras no se vean afectados en la mutante  $\Delta orf4$  sugiere que *i)* Orf4 es un componente estructural del SST3, o bien, *ii)* que Orf4 es necesario para el ensamblado correcto del SST3 de EPEC.

La sobreproducción de Orf4 deriva en una lisis de la bacteria posiblemente debido a un estrés celular (ver *Efecto multicopia de Orf4 en la secreción de EPEC*). También se observó que la producción *in trans* de Orf4 en un fondo silvestre repercute negativamente en el nado de EPEC (ver *Efecto de Orf4 en la motilidad bacteriana*). Datos obtenidos recientemente como parte de este trabajo muestran que los niveles de producción de flagelina (FliC), el componente mayoritario del filamento flagelar, se encuentran disminuidos en una cepa de EPEC que sobreexpresa a His-Orf4 (datos no mostrados).

Posiblemente, este efecto de Orf4 sobre componentes del SST3 flagelar (y por lo tanto del nado) se deba a una respuesta de EPEC ante el estrés ocasionado por la sobreproducción de Orf4 mediante sistemas de respuesta como la vía de señalización Cpx (MacRitchie, 2012). Se ha mostrado que esta vía es encargada de responder ante el estrés ocasionado por el mal plegamiento de proteínas en EPEC. Es posible que *in vivo* los niveles de la proteína Orf4 se encuentren finamente regulados incluso a niveles post-traduccionales.

GroEL asiste al plegado correcto de proteínas por lo que la contaminación con chaperonas moleculares es un problema común en los sistemas bacterianos de expresión de proteínas recombinantes (Rohman, 2000). GroEL co-eluyó junto con His-Orf4 cuando se purificó a la proteína recombinante en condiciones nativas (ver *Purificación de la proteína recombinante His-Orf4*). El método de purificación en condiciones desnaturizantes empleado en este trabajo mostró ser eficaz al conseguir purificar a His-Orf4 sin contaminantes mayores.

Previamente se observó en el laboratorio que al purificar en condiciones nativas a His-EscN usando el mismo método de purificación, GroEL co-eluye también con esta proteína recombinante (Romo y González-Pedrajo, datos sin publicar). Así mismo, se ha visto que otras proteínas involucradas en la secreción de proteínas vía SST3, al ser sobreproducidas en cepas de expresión, son co-purificadas junto con GroEL (Darwin, 2001). Resultaría interesante explorar si la co-purificación de GroEL con proteínas que participan en la secreción de proteínas vía SST3 es una consecuencia sólo de la sobreexpresión de proteínas insolubles en cepas de expresión o si en realidad GroEL tiene un papel activo en el funcionamiento de estas maquinarias celulares.

Hasta el momento no se ha reportado en la literatura interacción alguna entre Orf4 y otros componentes del SST3 de EPEC. Con base en las interacciones reportadas para las proteínas YscK/MxiK/OrgA, en este trabajo se exploró, haciendo uso del sistema de doble híbrido en levadura, la posible interacción entre la proteína Orf4 y la ATPasa EscN. Si bien, no fue posible detectar dicha interacción usando este sistema, no podemos descartar que Orf4 y EscN interaccionen *in vivo* en EPEC. A pesar de la gran utilidad y poder del sistema de doble híbrido en levadura, éste tiene también desventajas como el uso extensivo de etiquetas fusionadas a la proteína de interés lo que podría



alterar los sitios de unión de éstas o la necesidad de la correcta localización de las proteínas a probar en el núcleo de la levadura. Sería importante explorar, mediante el uso de técnicas *in vitro* tales como *pull-down* o *far-western*, la interacción de Orf4 con otros componentes del sistema de secreción de virulencia. Otra alternativa para encontrar *in vivo* interacciones proteína-proteína en las que Orf4 se encuentre involucrada sería el uso de un sistema de doble híbrido en bacteria basado en el sistema LexA (Daines, 2002).

Es interesante el hecho de que, a diferencia de otros componentes estructurales del SST3, Orf4 carece de un equivalente evidente en el sistema de secreción flagelar (ver *Sistema de secreción tipo III*). Sin embargo, el análisis bioinformático realizado permitió determinar también que, a diferencia de otros componentes del SST3 de EPEC -tales como EscP (Orf16), Orf15 y CesAB- que no presentan homólogos fuera de la familia de los patógenos A/E, Orf4 cuenta con homólogos en una gran cantidad de sistemas de secreción tipo III de otros organismos.

Si Orf4 es un homólogo o un análogo funcional a las proteínas YscK/MxiK/OrgA es aún una pregunta abierta. No obstante, con el análisis comparativo de sintenia de los genes que codifican para estas proteínas, se pudo encontrar que comparten un contexto genómico similar. Esto, aunado al fenotipo de no secreción en ausencia de las proteínas YscK/MxiK/OrgA en sus respectivos SST3 sitúa a Orf4 como candidato para pertenecer a esta familia de proteínas.

Vislumbrar la función de Orf4 supondría caracterizar a una de las piezas esenciales del SST3 de EPEC y nos acercaría más a entender la biología de esta compleja máquina molecular. Además, la caracterización de Orf4 permitirá extrapolar la anotación funcional de esta proteína a sus homólogos en otros SST3 de enteropatógenos cuya función también se desconoce.

## PERSPECTIVAS

Para dilucidar la función que desempeña el producto del gen *orf4* en el SST3 de EPEC consideramos fundamental:

1. Definir la localización celular de la proteína Orf4 en el SST3. Si bien, debido a las propiedades fisicoquímicas de la proteína, se especula que es un componente citoplásmico del aparato de exportación queda por comprobar experimentalmente esta hipótesis.
2. Determinar la localización celular de otros componentes del aparato de exportación (como EscN y EscQ) en ausencia de Orf4 (es decir, en un fondo EPEC  $\Delta orf4$ ).
3. Determinar las interacciones proteína-proteína de Orf4 con otros componentes del SST3.
4. Realizar una disección molecular de Orf4 para identificar aminoácidos biológicamente importantes para su función en el SST3 de EPEC. Para esto se propone emplear una estrategia de mutagénesis sitio dirigida en los aminoácidos que se encuentran conservados entre Orf4 y sus homólogos en otros SST3.
5. Determinar si el efecto observado de Orf4 sobre el flagelo es biológicamente relevante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas

#### *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Cepa	Características relevantes	Referencia
EPEC O127:H6 (E2348/69)	E2348/69 silvestre. St <sup>r</sup>	Levine, 1978
EPEC $\Delta orf4$	Mutante con deleción del gen <i>orf4</i>	Díaz, M.A. No publicado
EPEC $\Delta escN$	Mutante con deleción del gen <i>escN</i>	Gauthier, 2003
EPEC $\Delta escl$	Mutante con deleción del gen <i>escl</i>	Monjarás, J. No publicado

#### *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Cepa	Características relevantes	Referencia
JR501	Cepa deficiente en los sistemas de restricción y competente en los de modificación <i>galE</i> ( <i>hsd</i> <sup>-</sup> , <i>r-m</i> <sup>+</sup> ). Permite la conversión de plásmidos para comptabilidad con <i>Salmonella</i>	Ryu, 1990
SJW1103	Cepa silvestre	Yamaguchi, 1984
SJW1368	Cepa mutante de los genes <i>flhDC</i> y <i>cheW</i> incapaz de ensamblar flagelo. Usada como cepa de expresión de proteínas codificadas en el vector pTrc99A.	Ohnishi, 1994

### ***Escherichia coli***

<b>Cepa</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Referencia</b>
BL21 ( $\lambda$ DE3)pLysS	Cepa para expresión a partir del promotor T7. Posee el gen de la T7 RNA polimerasa y el plásmido pLysS que le confiere a la cepa resistencia a cloranfenicol y codifica para la lisozima T7 que reduce la expresión basal de genes bajo el control del promotor T7. Deficiente en las proteasas OmpT y Lon.	Novagen/(Studier, 1990)
Top-10	Cepa con alta eficiencia de transformación, permite la transformación de DNA metilado (preparaciones genómicas) y no metilado (amplificación por PCR). Resistente a estreptomycin.	Invitrogen
XL1-Blue	Células deficientes en la endonucleasa I (endA) y recombinasa A (recA), lo que mejora la estabilidad y calidad del DNA plasmídico exógeno. Resistente a tetraciclina.	Stratagene

### ***Saccharomyces cerevisiae***

<b>Cepa</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Referencia</b>
AH109	MATa, <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4<math>\Delta</math></i> , <i>gal80<math>\Delta</math></i> , <i>LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3</i> , <i>GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i>	Clontech

## Vectores

Vector	Características relevantes	Referencia
pTrc99A_FF4	Vector generado a partir de pTrc99A por la eliminación del único sitio NdeI y la sustitución del sitio NcoI de la región de multiclonación por el sitio NdeI. Confiere resistencia a ampicilina.	Ohnishi, 1997
pET19b	Vector que permite la expresión de genes bajo el control del promotor T7. Fusiona una etiqueta de 10 histidinas en el extremo 5´ del gen clonado. Confiere resistencia a ampicilina.	Novagen
pACTrc	Vector de expresión derivado de pACYC184 ( <i>New England Biolabs</i> ). Producido por la inserción de los fragmentos SphI-EcoRV y EcoRV-HindIII de pTrc99A_FF4 dentro de pACYC184 produciendo un plásmido de 5240 pb. Tiene un origen de replicación p15A. Confiere resistencia a cloranfenicol permitiendo la cotransformación con vectores basados en pET- y pTrc-.	
pGADT7	Vector de expresión de levadura diseñado para expresar una proteína de interés fusionada al dominio de activación GAL4. La fusión posee en el extremo N-terminal una señal de localización nuclear SV40 y un epítipo de hemaglutinina HA. Contiene al promotor T7. Se replica de manera autónoma en <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i> . Confiere resistencia a ampicilina a las bacterias. Cuenta con <i>LEU2</i> como marcador de selección por auxotrofia en levadura.	Clontech
pGBKT7	Vector de expresión de levadura diseñado para expresar una proteína de interés fusionada al dominio de unión a DNA de GAL4. Contiene al promotor T7. Posee un epítipo c-Myc. Se replica de manera autónoma en <i>E. coli</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Confiere resistencia a kanamicina. Cuenta con <i>TRP1</i> como marcador de selección por auxotrofia en levadura.	Clontech

## Construcciones

Construcción	Descripción	Referencia
pATeN	pTrc99A_FF4 + <i>escN</i>	Andrade, 2007
pMTo15	pTrc99A_FF4 + <i>orf15</i>	Romo y González-Pedrajo. No publicado
pMTo4	pTrc99A_FF4 + <i>orf4</i>	Díaz y González-Pedrajo. No publicado
pMTHo4	pTrc99A_FF4 + <i>his-orf4</i>	Díaz y González-Pedrajo. No publicado
pAEo4	pET19b + <i>orf4</i>	Andrade y González-Pedrajo. No publicado
pNGADeN	pGADT7 + <i>escN</i>	Espinosa y González-Pedrajo. No publicado
pNTetgA	pTrc99A_FF4 + <i>etgA</i>	García-Gómez, 2010
pSAtO4	pACTrc + <i>orf4</i>	Este trabajo
pSTel	pTrc99A_FF4 + <i>escl</i>	Este trabajo
pSTeQ	pTrc99A_FF4 + <i>escQ</i>	Este trabajo
pSGBKo4	pGBKT7 + <i>orf4</i>	Este trabajo

## Medios de cultivo

*E. coli* enteropatógena se creció en incubadora estática a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5% en DMEM. El resto de las cepas bacterianas, a menos que se indique lo contrario, se crecieron en LB en agitación a 37 °C.

Cuando se requirió se usaron los antibióticos: ampicilina (100 µg ml<sup>-1</sup>), tetraciclina (25 µg ml<sup>-1</sup>), estreptomina (50 µg ml<sup>-1</sup>), kanamicina (50 µg ml<sup>-1</sup>) o cloranfenicol (25 µg ml<sup>-1</sup>).

## Manipulación de DNA

**Subclonación de genes en los distintos vectores.** Tanto el inserto como el plásmido deseado se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes toda la noche. Una vez digeridos, se purificó el DNA con el estuche comercial *Gel extraction* de Qiagen. Posteriormente se procedió a ligar el plásmido con el inserto digerido, con la enzima T4 DNA ligasa (*New England Biolabs*) durante 16 horas a 16 °C. Las reacciones de ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* Top 10.

**Células competentes usando  $\text{CaCl}_2$  y transformación.** Se inocularon 2 mL de LB adicionado con el antibiótico correspondiente con la cepa deseada. Se creció el cultivo toda la noche (ON). Al día siguiente se inoculó un cultivo de 20 mL de LB -con el antibiótico correspondiente- con 200  $\mu\text{L}$  del cultivo ON. El cultivo se creció hasta llegar a una  $\text{DO}_{600}$  de entre 0.3 a 0.6. Las células se cosecharon por centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con cuidado en 20 mL de  $\text{CaCl}_2$  100 mM. Las células se incubaron 1 hora en hielo y se volvieron a centrifugar (6000 rpm durante 5 minutos). El sobrenadante se desechó y finalmente se resuspendieron las células en 2 mL de  $\text{CaCl}_2$  100 mM.

Para transformar a las células, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de las células competentes y se incubaron con el DNA plasmídico durante 1 hora. Después se les aplicó un choque térmico incubando las células 2 minutos a 42 °C. Posteriormente se dejaron reposar nuevamente en hielo durante 5 minutos para después recuperar a las células añadiendo 1 mL de LB y dejándolas crecer durante 1 hora a 37 °C en agitación. Al final del procedimiento las células se plaqueron en agar LB con el antibiótico correspondiente.

## **Purificación de Orf4**

**Producción de la proteína recombinante.** Los vectores con las construcciones se transformaron en la cepa de expresión correspondiente (pET- en BL21 ( $\lambda\text{DE3}$ ) pLysS y pTrc- en SJW1368). Se inoculó un precultivo de 3 mL de LB con la cepa correspondiente y se dejó crecer ON con los antibióticos correspondientes. Al día siguiente se inoculó un cultivo de 200 mL de LB -adicionado con el antibiótico correspondiente- con 2 mL del cultivo ON. El cultivo se llevó a una  $\text{DO}_{600}$  de  $\sim$  0.6 a 0.8 y en ese momento se indujo con la concentración deseada de IPTG y el cultivo se dejó crecer durante 4 horas más a 30 °C (se baja la temperatura de crecimiento para propiciar el plegamiento correcto de la proteína sobreproducida evitando que se formen agregados de las proteínas recombinantes). Para monitorear la producción de la proteína se tomó 1 mL del cultivo cada hora. Después, las células se cosecharon por centrifugación.

**Purificación de la proteína recombinante en condiciones nativas.** La pastilla celular se resuspendió en 1/10 parte del cultivo inicial -en este caso con 20 ml- con amortiguador TN1 (20 mM Tris-HCl pH 8 y 500 mM de NaCl) o amortiguador TN2 (20 mM Tris-HCl pH 8 y 1 M de NaCl) según sea el caso y se añadió 1 mM de PMSF -un inhibidor de proteasas de serina- a las células resuspendidas. Las células se

lisaron en frío con el sonicador Branson Sonifier 450 (Duty cycle a 50%, Output control a 5) con dos pulsos de 45 segundos cada uno, dejando reposar en hielo por 2 minutos entre cada pulso. El lisado se centrifugó por 30 minutos a 27 000 x g. El sobrenadante corresponde a la fracción soluble y la pastilla a la fracción insoluble.

La purificación de Orf4 se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a níquel. Se empacaron 1 o 2 mL (según se indique) de resina acoplada a níquel (Ni-NTA de Qiagen) en una columna. La fracción soluble del lisado celular se pasó por la columna de níquel previamente equilibrada con 10 volúmenes de amortiguador de unión. Para eliminar interacciones no específicas de proteínas a la resina, se hicieron tres lavados sucesivos con amortiguador TN adicionado con concentraciones crecientes de imidazol (L1: 10 mM, L2: 30 mM, L3: 60 mM). La proteína recombinante se eluyó con amortiguador TN adicionado con concentraciones de imidazol crecientes (E1: 100 mM, E2: 200 mM, E3: 300 mM, E4: 600 mM).

**Purificación de la proteína recombinante en condiciones desnaturalizantes.** La pastilla celular se resuspendió en 1/10 parte del cultivo inicial -en este caso con 20 ml- con amortiguador BB6U (20 mM Tris-HCl pH 8 y 500 mM de NaCl, 6 M de urea). Las células se lisaron en frío con el sonicador Branson Sonifier 450 (Duty cycle a 50%, Output control a 5) con tres pulsos de 45 segundos cada uno, dejando reposar en hielo por 2 minutos entre cada pulso. El lisado se centrifugó por 30 minutos a 27 000 x g. La fracción soluble del lisado celular se pasó por la columna de níquel previamente equilibrada con 10 volúmenes TN1. Se procedió a lavar la columna con concentraciones decrecientes urea. Las eluciones se realizaron con 500 mM de imidazol.



<b>1er lavado</b>	WB30	20 vol	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl, 6 M urea, 30 mM imidazol
<b>2do lavado</b>	BB4U	10 vol	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl, 4 M urea
<b>3er lavado</b>	BB2U	10 vol	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl, 2 M urea
<b>4to lavado</b>	BB1U	10 vol	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl, 1 M urea
<b>5to lavado</b>	BB1/2 U	5 vol	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl, 0.5 M urea
<b>6to lavado</b>	RN	5 vol	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl
<b>1er elución</b>	EB500	2 vol	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl, 500 mM imidazol
<b>2da elución</b>	EB500	2 vol	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl, 500 mM imidazol
<b>3ra elución</b>	EB500	2 vol	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl, 500 mM imidazol

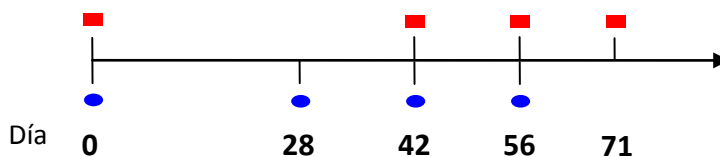
## Cuantificación de la proteína

La concentración de proteína se cuantificó usando el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) el cual determina la concentración de proteína soluble por medio de la interacción de proteína-colorante. Se empleó albúmina de suero bovino (BSA) para calibrar una curva patrón con la cual comparar la muestra deseada.

## Generación de anticuerpos policlonales

Para la obtención de anticuerpos  $\alpha$ -Orf4 se inmunizó en 4 ocasiones a una coneja hembra de la raza Nueva Zelanda con  $\sim 250 \mu\text{g}$  de la proteína recombinante His-Orf4. La primera inmunización se usó como vehículo adyuvante completo de Freund. Las inmunizaciones subsecuentes se aplicaron con el

adyuvante incompleto de Freund como vehículo.



**Esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos  $\alpha$ -Orf4.** Los óvalos en azul denotan las fechas en las que se inmunizó a la coneja con la proteína His-Orf4. Los rectángulos en rojo indican los días en los que se obtuvo sangre de la coneja.

## Inmunodetección

Para realizar las inmunodetecciones las proteínas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 15 % bajo condiciones desnaturizantes y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Al término de la transferencia la membrana se bloqueó con TBS-T adicionada con leche desnatada al 5 % (esto para evitar sitios de unión inespecíficos en la membrana) durante toda la noche. La membrana se lavó tres veces con 15 mL durante 15 minutos de TBS-T. Se incubó en frío durante una hora con el anticuerpo primario dirigido contra la proteína de interés. Posterior a esto, se lavó nuevamente la membrana en tres ocasiones con 15 ml de TBS-T durante 15 minutos cada lavado y la membrana se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario. Por último se realizó un nuevo ciclo de lavado de la membrana (15 ml de TBS-T por 15 minutos por lavado). La inmunodetección se realizó con el estuche comercial ECL *Western blotting* de Amersham.

## Ensayo de secreción

Se inoculó un precultivo de 2 mL de LB -adicionado con antibiótico, con la cepa correspondiente que se dejó crecer toda la noche en agitación a 37 °C. Al día siguiente se inocularon 6 mL de DMEM (el DMEM fue previamente equilibrado en la incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C) y se dejó crecer el cultivo hasta una DO<sub>600</sub> próxima a 0.8. Se centrifugaron 4 ml del cultivo por 5 min a 14 000 rpm. Se recuperó el sobrenadante (que es donde se encuentran las proteínas secretadas) mismo que se precipitó con 10% de TCA toda la noche. La pastilla celular se guarda en el congelador. El sobrenadante una vez precipitado se centrifuga 30 min a 14 000 rpm y se desecha el sobrenadante. La pastilla celular se resuspende en 200  $\mu$ L de amortiguador de carga (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 0.1 % de azul de

bromofenol y 10 % de glicerol) adicionado con 1  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol. La pastilla proteica (las proteínas secretadas) se resuspenden en 20  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga normalizando por la DO del cultivo correspondiente y se le adiciona 3  $\mu\text{L}$  de Tris saturado para neutralizar al TCA. Los perfiles de las proteínas producidas (pastilla celular) y de las proteínas secretadas se analizan en geles desnaturalizantes SDS-PAGE al 15 %.

## **Pruebas de motilidad**

La motilidad de las bacterias se observó en cajas de agar suave al 0.30%. Cuando se requirió se añadió IPTG al agar antes de que éste solidificara. Las colonias se crecieron a 30° C durante 6 horas. Cada prueba de motilidad se repitió al menos por triplicado.

## **Ensayo de doble híbrido en levadura**

El sistema de doble híbrido en levadura permite la identificación de interacciones proteína-proteína *in vivo*. Este sistema se basa en la modularidad del factor transcripcional Gal4 de levadura, el cual se compone de dos dominios funcionalmente independientes: el dominio de unión a DNA (del inglés *DNA-binding domain*) y el dominio de activación. Este sistema se basa en la fusión de una proteína carnada al dominio de unión a DNA (DNA-BD) mientras que la proteína presa se fusiona al dominio de activación (AD). Si la proteína cebo y la proteína presa interactúan se restablece la actividad del factor de transcripción Gal4 reconstituyéndose la expresión de los genes reporteros.

Para seleccionar las interacciones positivas se usa un sistema de selección nutricional mediante medios mínimos. En la cepa de *S. cerevisiae* AH109 contiene distintos genes reporteros (*ADE2*, *HIS3*, *lacZ* y *MEL1*) que sólo se expresan cuando se reconstituye la funcionalidad del factor GAL4. Adicionalmente esta cepa cuenta con marcadores auxotróficos (Leu, Trp) para seleccionar a las transformantes.

**Preparación de células competentes de levadura y transformación.** Inocular una colonia de *S. cerevisiae* AH109 en 3 mL de medio YPDA y dejarlo crecer durante la noche en agitación. Con este precultivo se inoculó un cultivo con 30 mL de YPDA y se dejó crecer en agitación hasta que el cultivo alcanzó una  $\text{DO}_{600}$  cercana a 1. Por cada reacción de transformación se tomó 1.5 mL del cultivo de

levadura y se centrifugó 2 min a 10 000 rpm La pastilla celular se lava con 1.5 mL de H<sub>2</sub>O estéril. La pastilla celular resultante se resuspendió en 1 mL de acetato de litio 0.1 M. Se dejó incubando por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 2 min a 10 krpm y se desechó el sobrenadante. Se agregaron a la pastilla celular los siguientes componentes:

- 240 µL PEG4000 (polietilén glicol) 50% w/v
- 36 µL de acetato de litio
- 5 µL de esperma de salmón previamente hervido a 100 °C durante 10 min
- 1 µL del vector o construcción pGADT7
- 1 µL del vector o construcción pGBKT7
- 80 µL de H<sub>2</sub>O estéril

Se incubó el tubo con la reacción en un baño a 42 °C durante 45 min. Se centrifugó la mezcla 2 min a 10 000 rpm y se desecha el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 500 µL de H<sub>2</sub>O estéril. Se tomaron 150 µL de la mezcla para plaquear en agar SD –Leu –Trp para seleccionar a las cotransformantes. Una vez que se obtuvieron colonias, se picaron alrededor de 30 colonias para volver a parchar en cajas SD –Leu –Trp.

**Ensayo de interacción.** Se picó un parche para crecer un cultivo en medio líquido SD –Leu -Trp durante toda la noche a 30 °C. Al día siguiente se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó. Se resuspendió en 1 mL de H<sub>2</sub>O estéril multiplicando, para normalizar, por la DO<sub>600</sub> la del cultivo. Se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000) y se gotearon 3 µL de estas diluciones en cajas SD –Leu-Trp (como control de crecimiento) y SD –Leu –Trp –His (para seleccionar las interacciones positivas).

Como control positivo del sistema se cotransformó a la levadura con los plásmidos pGBKT7-53, que codifica una fusión de la proteína p53 al dominio de unión a DNA, y con pGADT7-T, que codifica una fusión del T-antígeno SV40 grande al dominio de activación. Ya ha sido reportado que la proteína p53 y el antígeno SV40 interactúan en el sistema de doble híbrido de levadura. Como control negativo se cotransformó a pGADT7-T con pGBK7-Lam, que codifica una fusión entre la proteína lamina C y el dominio de unión a DNA. Para descartar falsos positivos debido a la autoactivación de la proteína cebo fusionada al dominio de unión a DNA, se cotransformó la construcción cebo en pGBKT7 junto con el

plásmido vacío pGADT7.

## **Análisis bioinformático**

Las secuencias de aminoácidos se alinearon usando el programa ClustalW2 (Larkin, 2007). El alineamiento resultante se utilizó para construir un árbol filogenético mediante inferencia bayesiana usando MrBayes v3.2.0 (ngen=1 000 000, burninfrac=0.25) (Ronquist, 2012). El contexto genómico de los genes se obtuvo con el servidor Absynte (Despalins, 2011).

## REFERENCIAS

1. Akeda, Y., & Galán, J. E. (2005). **Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion.** *Nature*, 437(7060), 911-5.
2. Andrade, A., Pardo, J. P., Espinosa, N., Pérez-Hernández, G., & González-Pedrajo, B. (2007). **Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 468(1), 121-127.
3. Bentley, R., & Meganathan, R. (1982). **Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria.** *Microbiological reviews*, 46(3), 241-80.
4. Betts, H. J., Chaudhuri, R. R., & Pallen, M. J. (2004). **An analysis of type-III secretion gene clusters in *Chromobacterium violaceum*.** *Trends in Microbiology*, 12(11), 476-82.
5. Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., & Black, R. E. (2005). **WHO estimates of the causes of death in children.** *Lancet*, 365(9465), 1147-52. Elsevier.
6. Cornelis, G. R. (2006). **The type III secretion injectisome.** *Nature Reviews Microbiology*, 4(11), 811-825.
7. Daines, D. A., Granger-Schnarr, M., Dimitrova, M., & Silver, R. P. (2002). **Use of LexA-based system to identify protein-protein interactions *in vivo*.** *Methods in Enzymology*, 358(1998), 153-161.
8. Daniell, S. J., Takahashi, N., Wilson, R., Friedberg, D., Rosenshine, I., Booy, F. P., Shaw, R. K., et al. (2001). **The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Cellular Microbiology*, 3(12), 865-871
9. Darwin, K. H., & Miller, V. L. (2001). **Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*.** *The European Molecular Biology Organization Journal*, 20(8), 1850-1862.
10. Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). **One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640-6645.
11. Dean, P., Maresca, M., & Kenny, B. (2005). **EPEC's weapons of mass subversion.** *Current Opinion in Microbiology*, 8(1), 28-34.
12. Deane, J. E., Abrusci, P., Johnson, S., & Lea, S. M. (2010). **Timing is everything: the regulation of type III secretion.** *Cellular and molecular life science: CMLS*, 67(7), 1065-75.
13. Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B. a, Vázquez, A., Barba, J., et al. (2004). **Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3597-602.
14. Despalins, A., Marsit, S., & Oberto, J. (2011). **Absynte: a web tool to analyze the evolution of**

orthologous archaeal and bacterial gene clusters. *Bioinformatics*, 27(20), 2905-2906

15. Diepold A, Wiesand U, Cornelis GR. (2011) **The assembly of the export apparatus (YscR,S,T,U,V) of the *Yersinia* type III secretion apparatus occurs independently of other structural components and involves the formation of an YscV oligomer.** *Mol Microbiol.* 2011 Sep 16;82(2):502-14.
16. Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U., & Cornelis, G. R. (2010). **Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome.** *The European Molecular Biology Organization Journal*, 29(11), 1928-1940.
17. Elliott, S. J., Wainwright, L. A., McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Deng, Y. K., Lai, L. C., McNamara, B. P., et al. (1998). **The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69.** *Molecular Microbiology*, 28(1), 1-4
18. Elliott, S. J., Yu, J., & Kaper, J. B. (1999). **The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12.** (P. E. Orndorff, Ed.) *Infection and Immunity*, 67(8), 4260-4263.
19. García-Gómez, E., Espinosa, N., De La Mora, J., Dreyfus, G., & González-Pedrajo, B. (2011). **The muramidase EtgA from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion.** *Microbiology*, 157(Pt 4), 1145-1160.
20. Gauthier, A., Puente, J. L., & Finlay, B. B. (2003). **Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization.** *Infection and Immunity*, 71(6), 3310-3319.
21. Gophna, U., Ron, E. Z., & Graur, D. (2003). **Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events.** *Gene*, 312, 151-163
22. Heidelberg, J. F., Seshadri, R., Haveman, S. A., Hemme, C. L., Paulsen, I. T., Kolonay, J. F., Eisen, J. A., et al. (2004). **The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough.** *Nature Biotechnology*, 22(5), 554-559.
23. Jackson, M. W., & Plano, G. V. (2000). **Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system.** *FEMS Microbiology Letters*, 186(1), 85-90.
24. Jouihri N., Sory, M.-P., Page, A.-L., Gounon, P., Parsot, C., & Allaoui, A. (2004). **MxiK and MxiN interact with the Spa47 ATPase and are required for transit of the needle components MxiH and MxiI, but not of Ipa proteins, through the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*.** *Molecular Microbiology*, 49(3), 755-767.
25. Kamada, N., Kim, Y. G., Sham, H. P., Vallance, B. A., Puente, J. L., Martens, E. C., & Nunez, G. (2012). **Regulated Virulence Controls the Ability of a Pathogen to Compete with the Gut Microbiota.** *Science*, (May), 1-5.
26. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). **Pathogenic *Escherichia coli*.** *Nature Reviews*

*Microbiology*, 2 (February), 123-140.

27. Kosarewicz, A., Königsmaier, L., Marlovits, TC. (2012). **The blueprint of the type-3 injectisome.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367(1592):1140-54
28. Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M. J., Nisan, I., Neves, B. C., Bain, C., Wolff, C., et al. (1998). **A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells.** *The European Molecular Biology Organization Journal*, 17(8), 2166-2176.
29. Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X., & Galán, J. E. (2011). **A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems.** *Science*, 331(6021), 1188-1191.
30. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., et al. (2007). **Clustal W and Clustal X version 2.0.** *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
31. Levine, M. M., E. S. Caplan, D. Waterman, R. A. Cash, R. B. Hornick & M. J. Snyder, (1977) **Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin.** *Infect Immun* 17: 78-82.
32. MacRitchie, D., Acosta, N., & Raivio, T. (2012) **DegP Is Involved in Cpx-Mediated Posttranscriptional Regulation of the Type III Secretion Apparatus in Enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Infect. Immun.* May 2012 vol. 80 no. 5 1766-1772
33. McDaniel, T. K., & Kaper, J. B. (1997). **A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12.** *Molecular Microbiology*, 23(2), 399-407.
34. Minamino, T., R. Chu, S. Yamaguchi & R. M. Macnab, (2000) **Role of FliJ in flagellar protein export in *Salmonella*.** *J Bacteriol* 182: 4207-4215.
35. Mundy, R., Pickard, D., Wilson, R. K., Simmons, C. P., & Dougan, G. (2003). **Identification of a novel type IV pilus gene cluster required for gastrointestinal colonization of *Citrobacter rodentium*.** *Molecular Microbiology*, 48, 795-80
36. Myers, E. W., & Miller, W. (1988). **Optimal alignments in linear space.** *Computer applications in the biosciences CABIOS*, 4(1), 11-17.
37. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 142-201.
38. Nguyen, L., Paulsen, I. T., Tchieu, J., Hueck, C. J., & Saier, M. H. (2000). **Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems.** *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(2), 125-144.
39. Ochoa, T. J., Barletta, F., Contreras, C., & Mercado, E. (2008). **New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection.** *Transactions of the Royal Society of*



*Tropical Medicine and Hygiene*, 102(9), 852-856.

40. Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., et al. (2009). **Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42), 17939-44. doi:10.1073
41. Ohnishi, K., F. Fan, et al. (1997). **The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly.** *J Bacteriol* 179(19): 6092-6099.
42. Ohnishi, K., Y. Ohto, et al. (1994). **FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hookassembly in *Salmonella typhimurium*.** *J Bacteriol* 176(8): 2272-2281.
43. Rohman, M., & Harrison-Lavoie, K. J. (2000). **Separation of copurifying GroEL from glutathione-S-transferase fusion proteins.** *Protein Expression and Purification*, 20(1), 45-47.
44. Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P. van der, Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., et al. (2012). **MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space.** *Systematic biology*, 1-14.
45. Ryu, J. and R. J. Hartin (1990). **Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2.** *Biotechniques* 8(1): 43-45.
46. Sal-Man, N., Biemans-Oldehinkel, E., Sharon, D., Croxen, M. A., Scholz, R., Foster, L. J., & Finlay, B. B. (2012). **EscA is a crucial component of the type III secretion system of enteropathogenic *E. coli*.** *Journal of Bacteriology*, 194(11), 2819-2828.
47. Sal-Man N., Deng W., Finlay B. B. (2012). **EscI – a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Biochem J* 442, 119–125.
48. Salmond, G. P., & Reeves, P. J. (1993). **Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria.** *Trends in Biochemical Sciences* , 18(1), 7-12.
49. Spreter, T., Yip, C. K., Sanowar, S., Andre, I., Kimbrough, T. G., Vuckovic, M., Pfuetzner, R. A., Deng, W., Yu, A. C. and Finlay, B. B. (2009) **A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 468-476
50. Studier, F. W., A. H. Rosenberg, et al. (1990). **Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes.** *Methods Enzymol* 185: 60-89.
51. Suyama, M., & Bork, P. (2001). **Evolution of prokaryotic gene order: genome rearrangements in closely related species.** *Trends in Genetics*, 17(1), 10-13.
52. Tampakaki, A. P., Fadouloglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J., & Kokkinidis, M. (2004). **Conserved features of type III secretion.** *Cellular Microbiology*, 6(9), 805-816.
53. Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). **Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena.** *Salud Pública de México*,

49(5), 376-86.

54. Wagner, S., Königsmaier, L., Lara-Tejero, M., Lefebvre, M., Marlovits, T. C., & Galán, J. E. (2010). **Organization and coordinated assembly of the type III secretion export apparatus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(41), 17745-17750.
55. Wieler, L. J., McDaniel, T. K., Whittam, T. S., & Kaper, J. B. (1997). Insertion site of the locus of **enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains.** *FEMS Microbiology Letters*, 156, 49-53
56. Wilson, R. K., Shaw, R. K., Daniell, S., Knutton, S., & Frankel, G. (2001). **Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Cellular Microbiology*, 3(11), 753-762.
57. Xu, Z., & Sigler, P. B. (1998). **GroEL/GroES: structure and function of a two-stroke folding machine.** *Journal of Structural Biology*, 124(2-3), 129-141.
58. Yamaguchi S, Fujita H, Sugata K, Taira T, Iino T (1984) **Genetic analysis of H2, the structural gene for phase-2 flagellin in *Salmonella*.** *J Gen Microbiol* 130: 255-265.
59. Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., et al. (2005). **Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly.** *Nature*, 435(7042), 702-707.