



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Generación de herramientas moleculares para el estudio del
sistema de secreción tipo III de *Escherichia coli*
enteropatógena

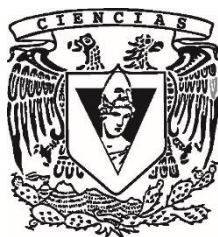
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

María Fernanda Rosales Larios



DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Bertha González Pedrajo

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2017



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 en el laboratorio 325 del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Bertha González Pedrajo. La investigación fue realizada con el apoyo de los donativos IN209617 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA, UNAM, y 180460 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

A mis papás

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a la Dra. Bertha González Pedrajo, por compartirme su pasión, enseñarme el micromundo desde cero, guiarme, permitirme aprender tanto en su laboratorio y por ser mucho más que una jefa de grupo. Por todo el apoyo académico y personal recibido en estos años.

A la Dra. Norma Espinosa Sánchez por su excelente apoyo técnico, asesoría y consejos tanto experimentales como personales. Por la paciencia y el tiempo invertido en explicarme y ayudarme con todo.

A los miembros del jurado: Dra. Laura Kawasaki Watanabe, Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho, Dr. Israel Castillo Juárez y Dr. Saúl Gómez Manzo por tomarse el tiempo de examinar este trabajo y por sus valiosas observaciones.

A la Dra. Laura Ongay y a todo el personal de la unidad de Biología Molecular por su apoyo técnico.

Al Ing. Juan Barbosa y a todos los miembros de la Unidad de Cómputo del IFC por su apoyo técnico.

A la M.V. Z Claudia Rivera Cerecedo y el M.V.Z. Héctor Malagón Rivero del Bioterio del IFC por su apoyo técnico.

A Adrián Alvarado cuyo trabajo ha sido de vital importancia durante mi estancia en el laboratorio.

A Gabriela Valdés Silva por el apoyo brindado.

Agradezco la beca de estudios de licenciatura otorgada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM, proyecto IN209514.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Trino y Pita, mis papás, por tanto amor, por el esfuerzo diario y conjunto, el incondicional apoyo y las constantes enseñanzas, por consentirme tanto. Trino, gracias por tu fuerza y por mostrarme una visión tan particular de la vida, por tu trabajo y por disipar mis miedos. Pita, gracias por ese incansable corazón, por cuidarme siempre, alimentarme delicioso, por las desmañadas para hacer el desayuno, por todo el trabajo que has hecho y por el gusto con el que me diste todo. Gracias a los dos por formar una gran familia.

Agradezco a mis hermanos, mis testigos de vida, cómplices y guías por todo el amor mutuo. Gracias Leticia por la sensatez y la cordura que me compartiste y por enseñarme que pese a todo uno siempre puede reír. Gracias, Gabriela por demostrarme que soy indestructible con base en el ejemplo propio, por alentarme siempre y creer en mí. Oscar, muchas gracias por compartir la tenacidad con la que vives, por ser mí cómplice y por la confianza depositada.

Agradezco a Eduardo por ayudarme a construir mis proyectos y construir conmigo otros tantos, por el amor y la paciencia depositados durante la realización de este trabajo, por impulsarme a buscar y cumplir mis sueños. Por todas las utopías.

Agradezco a las *Chinicuilas* adoradas Triana, Victoria, Sofía y Regina por todo lo que me han hecho crecer desde su llegada, por ser generadoras de alegrías constantes. A Santiago, por diseñar el esquema SST3, la verdad es por ser mi segundo hermano, por ser fiel a tu esencia. A Emilio, gracias por ser tan cariñoso como sólo tú sabes, por la fuerza que demuestras y la ternura que albergas. Agradezco también a mi cuñado favorito, Javier por los atinados consejos y a mi cuñis, Ana por los grandes momentos de diversión.

A los compañeros de este gran viaje, a La Trúfula Perdida por encontrarme, impulsarme y enseñarme tanto. A Esteban por la *muchosidad* por estar siempre y pese a todo, también a Nydia, Fabby y Leo por compartir sus conocimientos de las materias y sobretodo de la vida. A Paulina, Renata, a mi Lic. y a Micha porque fueron fundamentales en mi elección de carrera, y sobretodo porque me acompañaron a pesar de no estar tan cerca en todo momento. Y sobre la elección de carrera un agradecimiento especial a Lucero Gutiérrez por ser la conexión perfecta con la mejor jefa de grupo, sin ti nada de esto hubiera sucedido.

También agradezco a mis compañeros del 325 norte, por adoptarme, por enseñarme tanto, por la paciencia y la dedicación. Gracias Eli, Mariana, Mariana B., Julia, Mez, Vero, Miguel, Karen y Pilar por todos los grandes momentos compartidos, por compartirme sus técnicas, por todos los consejos y el apoyo brindado.

Y a todos los maestros que en el camino me contagiaron su gusto por la ciencia.

RESUMEN.....	7
1.- INTRODUCCIÓN.....	8
1.1.- <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).....	9
1.2.- Patogénesis	9
1.2.1.- Adherencia inicial.....	10
1.2.2.- Inyección de proteínas de virulencia	11
1.2.3.- Adherencia íntima	11
1.3.- Locus de esfacelamiento enterocítico.....	12
1.4.- Sistema de secreción tipo III.....	14
1.5.- Ensamblaje del SST3.....	15
1.5.1.- Interruptor molecular 1	20
1.5.2.- Interruptor molecular 2.....	20
2.- ANTECEDENTES.....	21
Proteínas analizadas en este estudio.....	21
2.1.- Map.....	21
2.2.- EscJ.....	23
2.3.- SepD.....	25
3.- HIPÓTESIS.....	27
4.- OBJETIVOS.....	27
4.1.- Objetivo general	27
4.2.- Objetivos particulares	27
5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1.- Crecimiento de cepas bacterianas.....	28
5.2.- Manipulación de DNA.....	30
5.3.- Diseño de oligonucleótidos.....	31
5.4.- Generación de la mutante nula <i>escJ</i>	32
5.5.- Producción de las proteínas recombinantes His-Map, His-SepL, SepD, SepD ₁₋₁₁₁ , SepD ₄₁₋₁₅₁ y SepD ₄₁₋₁₁₁	36
5.6.- Purificación de la proteína recombinante His-Map.....	36
5.7.- Diálisis de las muestras desnaturalizadas con urea	37
5.8.- Obtención de anticuerpos policlonales α -Map	38
5.9.- Ensayos de inmunodetección.....	39
5.10.- Precipitación de anticuerpos con sulfato de amonio	39
5.11.- Ensayo de secreción de proteínas a través del SST3.....	40
5.12.- Producción de proteínas recombinantes.....	41

5.13.- Purificación de la proteína recombinante His-SepL	41
5.14.- Ensayo de copurificación por cromatografía de afinidad.....	42
5.15.-Ensayo in vitro de interacción proteína-proteína por inmunoréplica de afinidad.....	43
6.-RESULTADOS	45
6.1.- CAPÍTULO 1. Generación de anticuerpos contra la proteína efectora Map	45
6.1.1.- Purificación de la proteína recombinante His-Map	47
6.1.2.- Renaturalización de la proteína recombinante His-Map	48
6.1.3.- Generación de anticuerpos policlonales.....	49
6.1.4.-Reconocimiento de la proteína efectora Map por los anticuerpos generados.....	50
6.2.- CAPÍTULO 2. Aislamiento de una mutante nula en el gen <i>escJ</i> y caracterización de su fenotipo.....	53
6.2.1.- Comprobación de la mutante del gen <i>escJ</i>	55
6.2.2.- Subclonación de <i>escJ</i> en el vector pTrc99AFF4	56
6.2.3.- Fenotipo y complementación de la mutante Δ <i>escJ</i>	57
6.3.1.- CAPÍTULO 3. Disección molecular de la proteína SepD	59
6.3.2.- Interacción entre las proteínas His-SepL-SepD.....	59
6.3.3.- Producción de las versiones trucas de SepD	60
6.3.4.- Complementación de Δ sepD con las versiones mutantes de SepD	62
6.3.5.- Ensayos de inmunoréplica de afinidad.....	63
7.-DISCUSIÓN.....	69
7.1.- Generación de anticuerpos anti-Map.....	70
7.2.- Generación de la mutante nula no polar <i>escJ</i>	72
7.3.- Disección molecular del regulador de la secreción SepD	74
8.- CONCLUSIONES	79
8.1.- Generación de anticuerpos anti-Map.....	79
8.2.- Generación de la mutante nula <i>escJ</i>	79
8.3.- Disección molecular de SepD.....	80
9.- PERSPECTIVAS	80
10.- REFERENCIAS	81

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un patógeno bacteriano asociado con diarrea infantil principalmente en países en vías de desarrollo. EPEC coloniza el epitelio intestinal promoviendo una lesión histopatológica característica denominada lesión de adherencia y esfacelamiento (lesión A/E). Esta lesión consiste en la adherencia íntima de la bacteria al enterocito, la eliminación de las microvellosidades aledañas al sitio de adherencia y la polimerización de actina que lleva a la formación de estructuras tipo pedestal debajo del sitio de adhesión de la bacteria.

La infección por EPEC está mediada por un sistema de secreción tipo III (SST3) también conocido como inyectisoma. Una vez que se establece el contacto con la célula del epitelio intestinal el inyectisoma transporta proteínas efectoras del citoplasma bacteriano al citoplasma de la célula eucarionte. El SST3 está formado por tres estructuras principales: 1) el aparato de exportación y componentes citoplásmicos; 2) el cuerpo basal, formado por una serie de proteínas que forman estructuras anulares en las membranas bacterianas y 3) una aguja extracelular conectada a un filamento que forman el canal central para el transporte de proteínas efectoras.

La generación de herramientas moleculares que permitan una mejor exploración de la función y estructura del SST3 es necesaria para la mejor comprensión de esta compleja maquinaria. En este trabajo se presenta el desarrollo de distintas herramientas moleculares como son los anticuerpos policlonales, las cepas mutantes y las construcciones plasmídicas. En específico, en este proyecto se sobrepresó y purificó la proteína Map, para la cual se generaron anticuerpos policlonales que permitieron su reconocimiento, tanto de la proteína recombinante, como de la secretada por EPEC. Por otro lado, se generó la mutante nula del gen *escJ* y se encontró que la proteína EscJ del SST3 es esencial para el funcionamiento de esta maquinaria. Se comprobó que la mutante era no polar al complementarla expresando al gen *escJ* *in trans*. Finalmente se llevó a cabo la disección molecular de la proteína del interruptor molecular 2, SepD, al generar versiones truncas de la proteína. Dichas versiones truncas se utilizaron en ensayos de interacción proteína-proteína. Los resultados preliminares sugieren que tanto los primeros como los últimos 40 aminoácidos son necesarios para la estabilidad y el funcionamiento de la proteína SepD.

1.- INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa de la familia *Enterobacteriaceae* de morfología bacilar y con un tamaño promedio de 0.5 μm de ancho por 3 μm de largo (Zaritsky and Woldringh 1978). *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal del humano desde las primeras horas posteriores al nacimiento con una o dos cepas que residirán de manera permanente en el intestino. Usualmente *E. coli* y su hospedero coexisten manteniendo una relación de beneficio mutuo, donde la bacteria obtiene de su hospedero suministro de nutrientes, un ambiente estable, protección contra agentes estresantes y un medio de transporte y diseminación. Por su parte *E. coli* brinda beneficios al huésped como la síntesis de vitaminas como son la K para la coagulación sanguínea y la B que favorece el metabolismo de proteínas. La capa mucosa del colon de mamíferos es el nicho ecológico de *E. coli* y ahí permanece sin causar daño. Sin embargo, existen varios patotipos de *E. coli* implicados en un amplio espectro de enfermedades agrupadas en tres síndromes clínicos principales: i) infecciones del tracto urinario, ii) sepsis/meningitis y iii) enfermedades entéricas/diarrea. Estas cepas patógenas pueden causar infección en el caso de individuos inmunodeprimidos o cuando las barreras epiteliales son quebrantadas (Kaper, Nataro et al. 2004).

Las infecciones son causadas por distintas cepas de *E. coli* que han adquirido diferentes factores de virulencia, con los cuales favorecen su adaptación a nuevos nichos ecológicos. Entre los patotipos intestinales se encuentran seis categorías bien descritas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Kaper, Nataro et al. 2004). La patogénesis de estos patotipos utiliza un esquema de varios

pasos, mismo que se conserva en otros enteropatógenos y consiste en la colonización de la mucosa, evasión de la defensa del hospedero, multiplicación y daño al mismo.

1.1.- *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC, por sus siglas en inglés es el agente etiológico más común de diarrea aguda en niños menores de 2 años, con brotes principalmente en países en vías de desarrollo (Levine and Edelman 1984). A mediados de la década de los cuarenta se identificaron en Inglaterra brotes de diarrea asociados a *E. coli* en niños de guarderías. Las cepas responsables fueron renombradas como *E. coli* enteropatógenas para poder ser diferenciadas de las bacterias de la microbiota (Levine, Bergquist et al. 1978). Las principales características clínicas de la infección son la diarrea de tipo acuoso, además de la posible manifestación de síntomas como vómito y fiebre.

1.2.- Patogénesis

Se ha visto que la dosis de infección de EPEC oscila entre 10^8 a 10^{10} unidades formadoras de colonia (UFC) (Donnenberg, Tacket et al. 1993, Bieber, Ramer et al. 1998). Una vez ingerida, EPEC coloniza las células de la mucosa del intestino delgado formando microcolonias por medio de una fimbria tipo IV denominada BFP (del inglés, *bundle forming pilus*) codificada en el plásmido de 95 kb denominado EAF o factor de adherencia de EPEC (del inglés, *EPEC adherence factor*). Posteriormente EPEC induce una lesión histopatológica característica denominada lesión de adherencia y esfacelamiento (lesión A/E), dada por la eliminación de microvellosidades del epitelio intestinal, la adherencia íntima de la bacteria al enterocito y la alteración de la morfología normal de la región apical del enterocito, lo que deriva en la generación de una estructura tipo pedestal formada por filamentos de actina justo por debajo

del sitio de adhesión de la bacteria (Goosney, Gruenheid et al. 2000, Clarke, Haigh et al. 2003) (Figura 1).

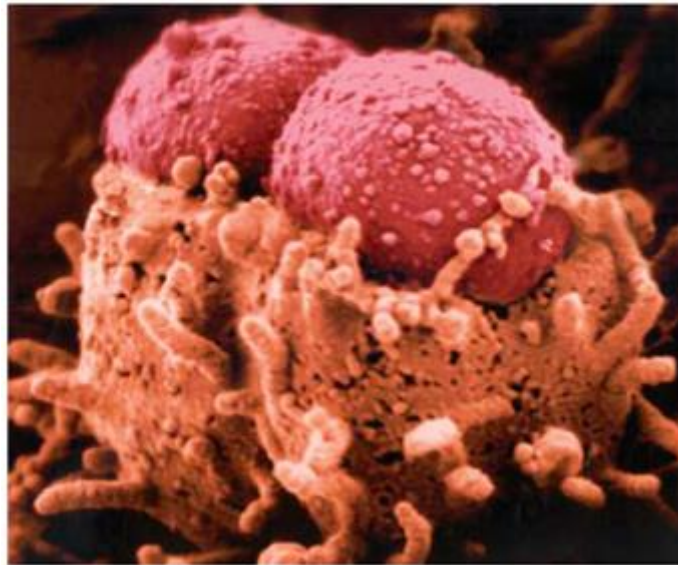


Figura 1. Fotografía de microscopía electrónica de EPEC. Se observa la bacteria sobre una estructura en forma de pedestal denominada pedestal formada por filamentos de actina y proteínas del enterocito que se reorganizan durante la infección. Tomada de (Kaper, Nataro et al. 2004).

Para entender mejor cómo EPEC establece una infección se ha propuesto un modelo de patogénesis dividido en tres fases: I) adherencia inicial, II) inyección de proteínas de virulencia y III) adherencia íntima (Figura 2).

1.2.1.- *Adherencia inicial*

En la adherencia inicial se pueden observar dos fases; la primera dada por la adherencia entre las propias bacterias formando microcolonias mostrando un fenotipo conocido como autoagregación (Kaper, Nataro et al. 2004) y la segunda conformada por la adherencia de estas microcolonias a la célula del epitelio intestinal (o adherencia localizada) (Figura 2, paso 1). Ambos fenotipos se relacionan con la expresión del plásmido EAF de EPEC, en el que también se encuentran codificados los genes del operón *per* (*plasmid encoded regulator*), que regulan la síntesis del pilus BFP, filamento que sobresale de la superficie de la bacteria y puede

llegar a medir varios micrómetros de longitud, importante para la adherencia inicial de la bacteria al epitelio intestinal y para facilitar la autoagregación (Anantha, Stone et al. 2000).

1.2.2.- *Inyección de proteínas de virulencia*

Una vez adherida, la bacteria inyecta a la célula hospedera una serie de proteínas denominadas efectores, esto mediante el sistema de secreción tipo III (SST3). Dichas proteínas promueven la eliminación de las microvellosidades del epitelio intestinal e interfieren con diversas rutas de señalización en los enterocitos. Esta situación provoca la reorganización del citoesqueleto, afecciones en las uniones estrechas, inhibición de las señales del sistema inmune, alteración del ciclo celular, entre otras modificaciones que en conjunto favorecen la producción de diarrea, evitan la fagocitosis y promueven la dispersión bacteriana (Ham, Sreelatha et al. 2011). Como ejemplo de estas proteínas inyectadas está el receptor translocado de intimina (Tir, por sus siglas en inglés, *Translocated intimin receptor*) cuya translocación es un paso crucial durante la formación de la lesión A/E (Vidal, Canizalez-Roman et al. 2007) (Figura 2, paso 2).

1.2.3.- *Adherencia íntima*

La última etapa de la infección por EPEC está caracterizada por la unión estrecha entre la bacteria y el enterocito, así como por la formación de estructuras tipo pedestal ricas en actina. Una vez translocado, el efector Tir se inserta en la membrana citoplásmica de la célula eucarionte, en donde forma una estructura tallo-asa y funciona como receptor de la intimina (proteína de membrana externa de la bacteria) (Frankel and Phillips 2008) (Figura 2, paso 3). Posteriormente Tir es fosforilado por cinasas del hospedero, señal que inicia el reclutamiento de proteínas que promueven la polimerización de actina, lo que a su vez induce la

reorganización del citoesqueleto y la formación de los pedestales que se localizan por debajo del sitio de adhesión de la bacteria. Estos pedestales están formados principalmente por actina polimerizada y otras proteínas relacionadas, como ezrina, fimbrina, miosina, entre otras. La morfología y fisiología de la región apical de los enterocitos se altera por las modificaciones del citoesqueleto induciendo la destrucción de microvellosidades intestinales aledañas y conlleva a la pérdida de la función de absorción del epitelio intestinal (Finlay, Rosenshine et al. 1992) (Figura 2, paso 4).

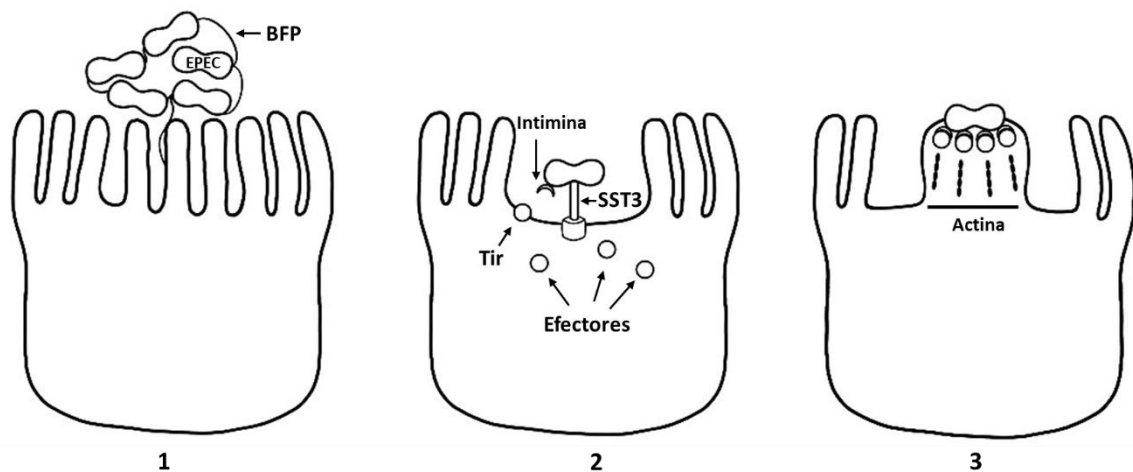


Figura 2. Pasos de la patogénesis de EPEC. 1) Adherencia inicial y formación de microcolonias mediante la fimbria BFP. 2) Inyección de proteínas de virulencia a través del SST3. 3) Adherencia íntima de EPEC, reorganización del citoesqueleto y formación de pedestal.

1.3.- Locus de esfacelamiento enterocítico

Una isla de patogenicidad es una región del DNA de entre 10 y 200 Kb presente en los genomas de bacterias patógenas (Schmidt and Hensel 2004). Estas islas se encuentran típicamente asociadas a genes que codifican para ARNs de transferencia. En el cromosoma de EPEC existe una isla de patogenicidad denominada LEE (*locus de esfacelamiento enterocítico*) la cual codifica para todos los componentes necesarios para el ensamblado y

funcionamiento del SST3 de EPEC (Jarvis, Giron et al. 1995). Esta isla de patogenicidad de 35.6 kb tiene un contenido mucho menor de G+C (38.3%) comparado con el promedio del DNA cromosomal (50.8%), lo que sugiere que fue adquirida mediante transferencia horizontal (Kaper, Nataro et al. 2004). La isla LEE está presente en otros patógenos causantes de lesiones tipo A/E como en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y en el patógeno de ratón *Citrobacter rodentium*. Esta isla contiene 41 marcos de lectura abiertos los cuales están organizados principalmente en siete operones (LEE₁-LEE₇) (Figura 3) (Yerushalmi, Litvak et al. 2014).

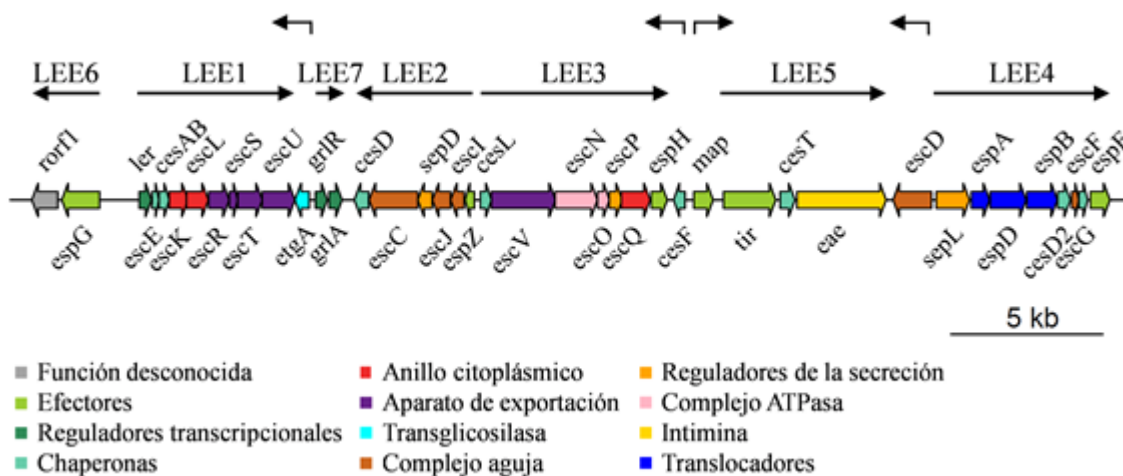


Figura 3. Locus de eliminación enterocítica. Diagrama esquemático de la isla de patogenicidad LEE de EPEC. Se muestran los 41 genes que se encuentran en esta isla y se colorean según la categoría funcional de cada una de las proteínas codificadas por éstos (Gaytán, Martínez-Santos et al., 2016).

El regulador transcripcional *ler* (*locus of enterocyte regulator*) (Elliott, Sperandio et al. 2000) regula positivamente la transcripción de los operones LEE₂ a LEE₇ (Yerushalmi, Litvak et al. 2014). Por otro lado, los reguladores GrlA y GrlR son esenciales para la expresión y regulación negativa de los genes de la isla (Jimenez, Cruz-Migoni et al. 2010). En la región LEE₅ están codificadas la adhesina bacteriana intimina, su receptor Tir, y la chaperona de Tir, CesT. Dentro de la isla se encuentran los genes que codifican para algunas de las proteínas efectoras

que se secretan a través del sistema de secreción tipo III (Tir, Map, EspB, EspF, EspH, EspG y EspZ) mismas que favorecerán la infección y la formación de la lesión A/E (Tabla 1) (Spears, Roe et al. 2006).

1.4.- Sistema de secreción tipo III

El sistema de secreción tipo III (SST3) (Figura 4), denominado también inyectisoma, es una nanomáquina molecular formada por aproximadamente 20 proteínas distintas (Buttner 2012). Este dispositivo bacteriano permite a la bacteria transportar proteínas efectoras a través de la membrana celular del hospedero. Los inyectisomas están presentes en más de 25 especies distintas de bacterias Gram-negativas y contribuyen en la generación de enfermedades en animales y plantas. Algunos ejemplos de géneros bacterianos que codifican en su genoma al menos un SST3 son: *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Xanthomonas* (Cornelis 2006).

Los SST3 de virulencia presentan proteínas homólogas a las encontradas en el sistema flagelar utilizado para la motilidad bacteriana. Se ha propuesto que los sistemas de virulencia evolucionaron a partir del sistema flagelar mediante un proceso de exaptación que consiste en la adaptación de componentes flagelares que cumplían una función determinada y fueron reclutados para llevar a cabo una función distinta como lo es la translocación de proteínas por el SST3 (Abby and Rocha 2012).

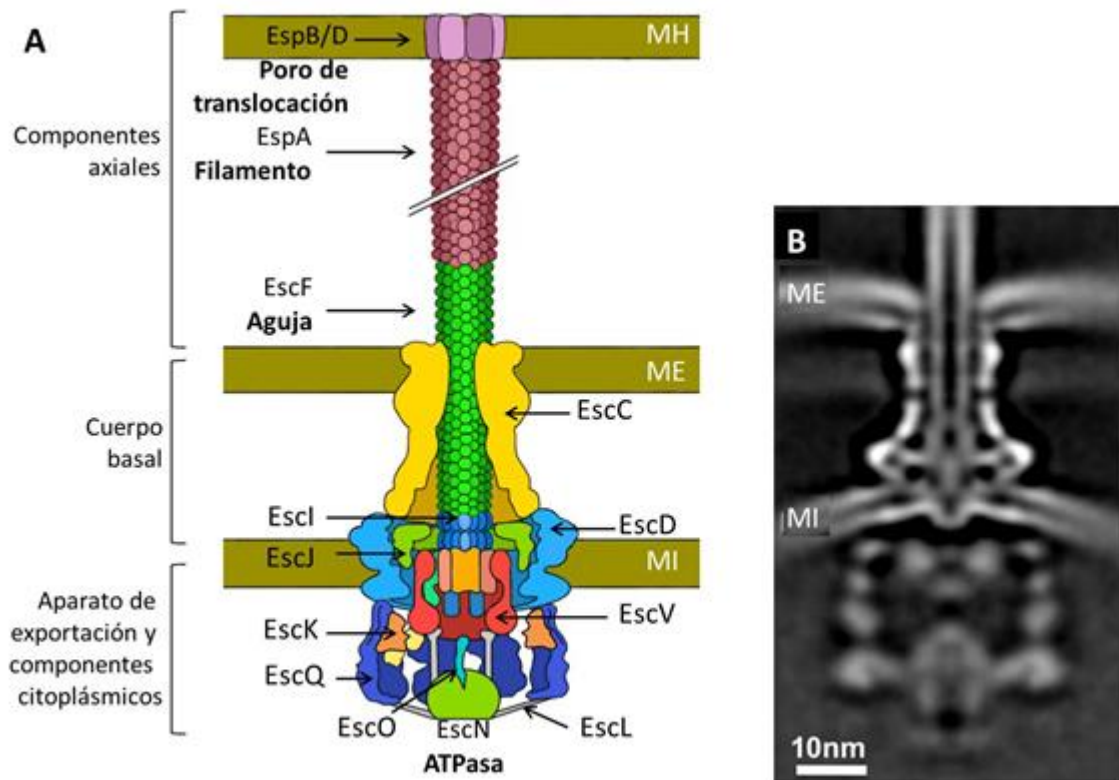


Figura 4. Esquema del SST3 de EPEC. (A) Se muestran etiquetados los principales componentes estructurales del inyectisoma. MI, ME y MH hacen referencia a membrana interna, membrana externa y membrana del hospedero, respectivamente. (B) Se muestra para comparación imagen de reconstrucción criotomográfica del inyectisoma de *S. enterica* (Hu, Lara-Tejero, et al. 2017)

1.5.- Ensamblaje del SST3

Una vez que la bacteria recibe las señales ambientales adecuadas comienza el proceso de ensamblaje de esta compleja maquinaria. Este proceso está coordinado tanto a nivel espacial como temporal, donde se distinguen 3 etapas: (i) formación del cuerpo basal y ensamblaje del aparato de exportación, (ii) incorporación de los componentes citoplásmicos y (iii) ensamblaje de los componentes axiales del inyectisoma (primero el eje y la aguja y después el translocón) (Diepold and Wagner 2014).

Los primeros componentes en ensamblarse son el cuerpo basal y el aparato de exportación (Diepold and Wagner 2014). El cuerpo basal consiste en una sucesión de anillos proteicos ubicados tanto en membrana interna (MI) como en membrana externa (ME). En la MI de EPEC existen dos anillos concéntricos, el interno formado por la proteína EscJ y el externo por la proteína EscD, las cuales oligomerizan formando dichas estructuras anulares. El anillo constituido por la proteína EscJ se encuentra en la parte periplásmica de la MI y está formado por 24 subunidades (Yip, Finlay et al. 2005). Por otra parte, la proteína EscD presenta un dominio citoplásmico y uno periplásmico, amino y carboxilo, respectivamente, y forma un anillo de entre 18 y 24 subunidades (Spreter, Yip et al. 2009). El anillo de ME está formado por subunidades de la proteína EscC, la cual pertenece a la familia de las secretinas, que está asociada al transporte de moléculas a través de la ME (Garmedia et al. 2005). Por otro lado, al igual que los componentes del cuerpo basal, las proteínas que forman el llamado aparato de exportación se ensamblan de una manera Sec dependiente. Las proteínas de MI EscR, EscS, EscT, EscU y EscV conforman el aparato de exportación y son esenciales para el funcionamiento del sistema. Estas proteínas varían en tamaño, presentan diferente número de hélices transmembranales y difieren en la presencia de dominios citoplasmáticos (Buttner 2012).

Una vez ensamblados el cuerpo basal y el aparato de exportación, los componentes citoplásmicos se asocian mediante interacciones proteína-proteína con el cuerpo basal. Estos componentes citoplásmicos incluyen una ATPasa la cual se encarga del reconocimiento de los complejos chaperona-efector, así como de su disociación y el desplegamiento de proteínas efectoras (Akedo and Galan 2005, Andrade, Pardo et al. 2007, Zarivach, Vuckovic et al. 2007). Las proteínas EscO y EscL forman un complejo con la ATPasa y activan o inhiben,

respectivamente, la actividad hidrolítica de esta enzima (Romo-Castillo, Andrade et al. 2014). Posteriormente, la proteína EscQ forma un anillo citoplásmico que se encarga de estabilizar al complejo ATPasa, y junto con EscK, funciona como una plataforma de reconocimiento de sustratos (Biemans-Oldehinkel, Sal-Man et al. 2011, Soto, Espinosa et al. 2017).

Por último, se ensamblan los componentes dependientes del SST3. La proteína EscI forma el llamado eje interno el cual es una estructura cilíndrica y hueca que se piensa funciona como conexión entre los anillos de membrana interna y externa que forman el cuerpo basal (Sal-Man, Deng et al. 2012). La aguja se ensambla en la parte extracelular y se compone por la proteína EscF, a través de esta estructura viajan las proteínas secretadas (Garmendia, Frankel et al. 2005). En EPEC esta aguja tiene una longitud aproximada de 23 nm (Monjarás Feria, Garcia-Gomez et al. 2012) y es una estructura hueca con un canal interno de entre 2 y 3 nm (Ogino, Ohno et al. 2006), mismo que no es lo suficientemente amplio para permitir el libre paso de las proteínas en su estructura nativa, por lo que se propone es necesario que éstas estén completa o parcialmente desplegadas, al momento de pasar a través del canal (Cornelis 2006). En el extremo distal de la aguja se forma un filamento compuesto por la proteína EspA, que funciona junto con la aguja como un conducto de secreción de sustratos. Se ha propuesto que la longitud del filamento es proporcional a la concentración intracelular de EspA, alcanzando en promedio una longitud de 90 nm (Sekiya, Ohishi et al. 2001). En el extremo distal del filamento se localizan dos proteínas que forman el poro de translocación el cual está encargado de mediar la translocación de proteínas efectoras del citoplasma bacteriano al del enterocito. El poro está formado por las proteínas EspB y EspD, ambas proteínas son hidrofóbicas y se insertan en la membrana de la célula hospedera (Ghosh 2004).

Las proteínas secretadas a través del SST3 pueden ser clasificadas en tres categorías de acuerdo al orden de secreción que presentan dentro del proceso de ensamblaje, mismo que es altamente regulado (Deane, Abrusci et al. 2010):

1. Sustratos tempranos: proteínas formadoras del eje y la aguja, EscI y EscF, respectivamente.
2. Sustratos intermedios: proteínas translocadoras que forman el filamento y poro de translocación, EspA, EspB y EspD.
3. Sustratos tardíos: proteínas efectoras, translocadas al citoplasma de la célula eucarionte.

Las proteínas efectoras son causantes de la sintomatología desencadenada por EPEC. De manera general estas proteínas promueven el esfacelamiento o pérdida de las microvellosidades, la inducción de pedestales ricos en actina, inhibición del transporte de nutrientes, disfunciones mitocondriales, causando una respuesta inflamatoria moderada y la ruptura de las uniones estrechas, lo que en conjunto da lugar a la diarrea acuosa (Dean and Kenny 2009) (Tabla 1)

Los efectores mejor descritos se encuentran codificados en la isla LEE (Tabla 1), sin embargo, también fuera de esta isla se codifican efectores, denominados Nle's (del inglés, *Non-LEE encoded effectors*) que se encuentran diseminados por el genoma de EPEC. Se ha estimado que el conjunto de efectores consiste en al menos 21 proteínas (Dean and Kenny 2009).

Tabla 1. Descripción general de los efectores codificados en la isla LEE

Efactor	Actividad en el hospedero	Referencia
Tir	Receptor translocado de la intimina que desencadena el rearreglo del citoesqueleto y la nucleación de actina.	(Kalman, Weiner et al. 1999, Kenny 1999)
Map	Variación del potencial de membrana mitocondrial, formación de filopodios, alteración de las uniones estrechas.	(Kenny and Jepson 2000, Jepson, Pellegrin et al. 2003)
EspG	Desorganiza los microtúbulos y altera las uniones estrechas.	(Elliott, Krejany et al. 2001, Tomson, Viswanathan et al. 2005)
EspZ	Antagonista de la muerte celular. Posee 2 cruces transmembranales e interacciona con proteínas mitocondriales.	(Shames, Deng et al. 2010, Shames, Croxen et al. 2011)
EspF	Altera la función mitocondrial, apoptosis, anti-fagocitosis. Causa deslocalización de las acuaporinas. Redistribuye las proteínas de las uniones estrechas.	(McNamara and Donnenberg 1998, McNamara, Koutsouris et al. 2001)
EspH	Modulación de filopodios y la formación del pedestal	(Tu, Nisan et al. 2003)
EspB	Altera el citoesqueleto de actina e inhibe la fagocitosis mediada por macrófagos.	(Iizumi, Sagara et al. 2007)

Existen también otras proteínas citoplasmáticas pequeñas denominadas chaperonas que se unen a uno o varios sustratos que se secretan a través del SST3, favoreciendo su estabilidad y/o secreción. Las chaperonas están clasificadas en tres clases de acuerdo a la especificidad que guardan respecto a sus sustratos: chaperonas clase I, de unión a efectores, clase II, con afinidad por proteínas translocadoras y clase III, que asisten a la proteína de la aguja (Cornelis 2006).

Los cambios de especificidad para la secreción de las diferentes clases de sustratos vía SST3 están controlados por complejos de proteínas que, se propone, funcionan como interruptores moleculares. Para EPEC se han descrito dos de estos interruptores (Deane, Abrusci et al. 2010):

1.5.1.- *Interruptor molecular 1*

Formado por las proteínas EscP y EscU, se encarga de regular la secreción de sustratos tempranos hasta que la aguja llegue a su longitud programada, es entonces cuando se da un cambio de especificidad y se detiene la secreción de sustratos tempranos, al mismo tiempo que se promueve la de sustratos intermedios y tardíos (Monjaras Feria, Garcia-Gomez et al. 2012).

1.5.2.- *Interruptor molecular 2*

Conformado por las proteínas SepD, SepL y CesL está encargado de promover la secreción de sustratos intermedios, así como de evitar la secreción de sustratos tardíos hasta que se lleva a cabo la formación del poro de translocación y el subsecuente contacto con la célula eucarionte, dado esto, se presenta otro cambio de especificidad que permite la secreción de sustratos tardíos (O'Connell, Creasey et al. 2004, Deng, Li et al. 2005).

2.- ANTECEDENTES

Proteínas analizadas en este estudio

A continuación, se describe la función de las proteínas para las que se generaron herramientas moleculares en el presente trabajo.

2.1.- Map

Los efectores son regularmente proteínas con propiedades sobrelapadas y que pueden cooperar entre ellas para generar respuestas específicas en la célula hospedera. Una vez translocados, alteran las funciones celulares básicas como son las vías de transducción de señales, la arquitectura del citoesqueleto, el tráfico vesicular hacia la membrana e incluso la muerte celular (Kenny et al. 2002).

La proteína Map (del inglés *mitochondrial-associated protein*) es un efector que se secreta a través del SST3 de EPEC y que se encuentra codificado en el LEE. Map consta de 203 aminoácidos y se ha descrito que contiene una secuencia MTS (del inglés *mitochondrial targeting sequence*) en el N-terminal que le permite importarse a la matriz mitocondrial. Se describió que los 41 residuos de la región N-terminal son suficientes para llevar a este efector a la mitocondria del hospedero. Además, se ha mostrado que la importación de Map a la mitocondria se lleva a cabo por la vía canónica de importación donde participan las translocasas Tom (Tom 22 y Tom 40) y la chaperona Hsp70. Una vez en la mitocondria, Map perturba el potencial de membrana provocando una fragmentación de la mitocondria (Papatheodorou et al. 2006).

Map cuenta con actividad enzimática de factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) y con un dominio PDZ los cuales le permiten, junto con los efectores EspH y Tir, organizar el ensamblaje de filopodios de actina. Adicionalmente, Map contribuye a la disrupción de la barrera epitelial y participa en la formación del pedestal. También, se ha demostrado que en conjunto con Tir y EspF es esencial para la eliminación de las microvellosidades (Torres 2010; Ma et al. 2006; Dean and Kenny 2009).

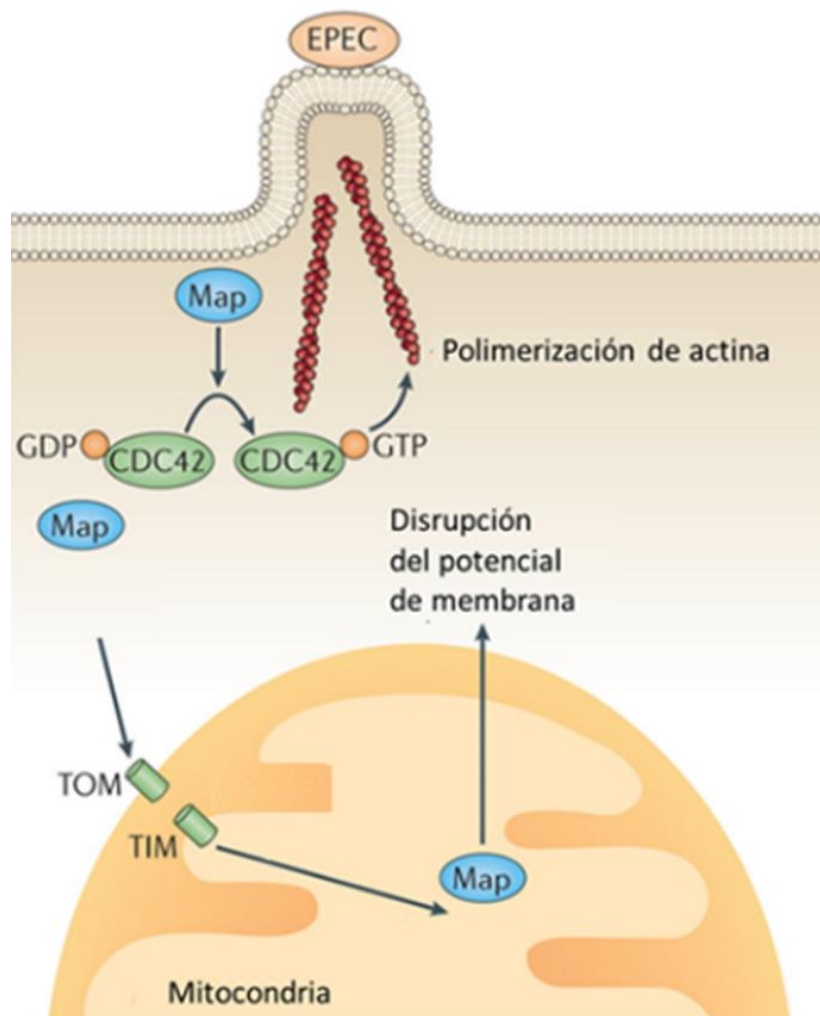


Figura 5. Esquema de los efectos de Map al interior de la célula hospedera. Dentro de los enterocitos Map induce la formación de filopodios de manera dependiente de la GTPasa CDC42. Una vez que es importada a la mitocondria vía TOM, Map rompe el potencial de membrana de la mitocondria. Modificado de (Hicks and Galán 2013).

2.2.- EscJ

EscJ es una proteína estructural del inyectisoma formada por 190 aminoácidos la cual forma el anillo interno del cuerpo basal que se localiza asociado a la membrana interna. Esta proteína se exporta a la membrana mediante la vía general de secreción Sec. EscJ a diferencia de sus homólogos no posee una hélice transmembranal en el dominio C-terminal para anclarse a la membrana interna, sino que posee un dominio de lipidación en el N-terminal para anclar a la proteína a la cara periplásmica de la membrana interna (Gaytán et al. 2016). Esto se ha demostrado mediante el uso de un gradiente de sacarosa (Yip et al. 2005).

La estructura terciaria de EscJ se resolvió por cristalografía y mostró que el monómero consiste en dos dominios con topologías similares (Yip et al. 2005). A su vez, por análisis de empaquetado del cristal se logró determinar que la estructura atómica de EscJ forma un anillo de 24 subunidades que sirve como plataforma de anclaje del resto del sistema (Bergeron 2016a; Yip et al. 2005) (Figura 6).

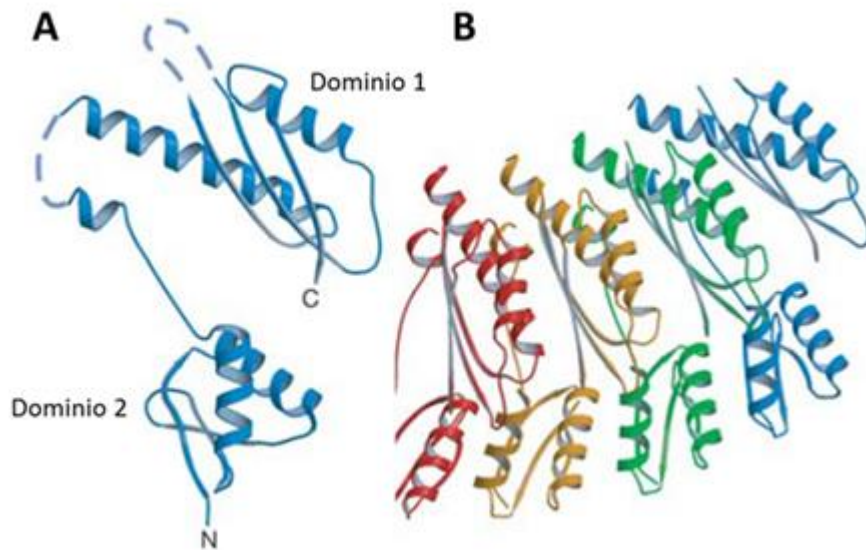


Figura 6. Estructura terciaria de la proteína EscJ. (A) Diagrama estructural de la estructura cristalográfica de la proteína EscJ. (B) Estructura tipo “arco” que forma la unidad asimétrica del cristal resuelto de EscJ. PDB: 1YJ7. Modificado de (Yip et al. 2005).

Se ha descrito que homólogos de EscJ tales como MxiJ de *Shigella flexneri* e YscJ de *Yersinia pestis* son esenciales para el proceso de secreción en sus respectivos SST3. Además, se ha descrito que estas proteínas interaccionan con MxiD e YscD los cuales son homólogos de EscD (Figura 4). Es importante mencionar también que EscJ es indispensable para el reclutamiento de los componentes del aparato de exportación (Yip et al. 2005), de ahí que sea un componente crítico para la función del inyectisoma en EPEC.

Además de esto, FliF -el homólogo de EscJ en el flagelo- es esencial para el ensamblado de la maquinaria flagelar e interacciona con componentes como FliG, proteína componente del rotor flagelar (Bergeron 2016).

2.3.- SepD

SepD de EPEC es una proteína de 151 aminoácidos codificada en el operón LEE2 de la isla de patogenicidad LEE de EPEC. SepD se ha localizado tanto en el citoplasma como asociada a la membrana interna de la bacteria (Deng et al. 2005a). De lo poco que se sabe de esta proteína es que forma parte del complejo conocido como segundo interruptor molecular de la jerarquía de secreción del SST3. Dicho complejo ternario se encuentra formado por las proteínas SepD/SepL/CesL (Younis et al. 2010). En la literatura está reportado que SepD interacciona de manera directa con SepL (Deng et al. 2005b).

La eliminación de cualquiera de los genes que codifican para las proteínas que conforman el complejo SepD/SepL resulta en la hipersecreción de efectores y suprime la secreción de translocadores (Deng et al. 2005a). Por esta razón se ha propuesto que este complejo se encarga de promover la salida de translocadores a través del SST3 y de retener la secreción prematura de efectores. Se piensa que durante la infección *in vivo*, los translocadores son secretados a través del SST3 para ensamblar el translocón y una vez que esta estructura extracelular establece contacto con la célula hospedera se permite la secreción de efectores. Es en este proceso de regulación en el que el complejo SepD/SepL está involucrado.

Se ha descrito que SepD posee homólogos en otros SST3 tales como YscB de *Yersinia*, PscB de *Pseudomonas* y SpiC de la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) de *Salmonella*. Todos estos homólogos se encuentran igualmente involucrados en la regulación de la jerarquía de sustratos en sus respectivos SST3 (Day and Plano 1998; Yang et al. 2007; Yu et al. 2010).

A pesar de conocerse la participación y la importancia de SepD en el segundo interruptor molecular, se desconoce aún la región importante para que se lleve a cabo la interacción de SepD con las otras proteínas del complejo.

3.- HIPÓTESIS

La generación de herramientas moleculares permitirá tener un mejor entendimiento del SST3 de EPEC

4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo general

Generar herramientas moleculares para el estudio del sistema de secreción tipo III de *Escherichia coli* enteropatógena.

4.2.- Objetivos particulares

- Generación de anticuerpos policlonales contra la proteína efectora Map.
- Generación de una mutante nula del gen que codifica para la proteína EscJ y caracterización de su fenotipo.
- Disección molecular de la proteína SepD, componente del interruptor molecular 2.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Crecimiento de cepas bacterianas

Todas las cepas de *E. coli* y *Salmonella* usadas en este trabajo se crecieron en medio LB (del inglés, lysogeny broth) a 37° C con agitación a 250 rpm. Para la determinación del crecimiento de los cultivos se midió la absorbancia a 600 nm mediante espectrofotometría. Cuando se requirió presión de selección, se añadió al cultivo bacteriano los antibióticos apropiados: ampicilina 100µg/mL (Amp), estreptomycin 25µg/mL (Sm), kanamicina 50µg/mL (Km) o tetraciclina 25µg/mL (Tc). Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Descripción	Fuente o referencia
<i>E. coli</i>		
E2348/69	EPEC cepa silvestre O127: H6, Sm ^R	(Levine, Bergquist et al. 1978)
$\Delta escN$	E2348 con eliminación del gen <i>escN</i> , Sm ^R	(Gauthier, Puente et al. 2003)
$\Delta sepL$	E2348 con eliminación del gen <i>sepL</i> , Sm ^R	(Deng, Li et al. 2005)
$\Delta sepD$	E2348 con eliminación del gen <i>sepD</i> , Sm ^R	(Deng, Li et al. 2005)
$\Delta escP$	E2348 con eliminación del gen <i>escP</i> , Km ^R , Sm ^R	(Monjaras Feria, Garcia-Gomez et al. 2012)
Δler	E2348 con eliminación del gen <i>ler</i> , Km ^R , Sm ^R	(Bustamante, Villalba et al. 2011)
$\Delta escJ$	E2348 con eliminación del gen <i>escJ</i> , Km ^R , Sm ^R	Este trabajo
Top10	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada para clonación, Sm ^R	Invitrogen

BL21 DE3 pLysS (BDP)	Cepa de expresión utilizada para inducir proteínas recombinantes cuya expresión se encuentre controlada por el promotor T7, Cm ^R	Novagen
XL1-Blue	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada para clonación, Tc ^R	Stratagene
Origami 2	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada para la inducción de proteínas. Favorece la formación de puentes disulfuro. Sm ^R Tc ^R	Novagen

Salmonella

SJW1368	Cepa mutante de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium en los genes flagelares <i>flhDC</i> y <i>cheW</i> . Usada para la sobreexpresión de proteínas recombinantes.	(Yamaguchi, Fujita et al. 1984)
JR501	Cepa para convertir plásmidos a la compatibilidad de <i>Salmonella</i> .	(Ryu and Hartin 1990)

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pTrc99A_FF4	Vector de expresión modificado de pTrc99A, Amp ^R	(Ohnishi, Fan et al. 1997)
pET19b	Vector de expresión regulado bajo el promotor T7 que expresa proteínas recombinantes fusionadas a una etiqueta de 10 His en la región amino terminal. Amp ^R	Novagen
pATpD	<i>sepD</i> clonado en pTrc99AFF4 en los sitios de restricción BamHI-NdeI	Castañeda-Arroyo A. no publicado
pEEescJ	<i>escJ</i> clonado en pET19b con los sitios de restricción NdeI-BamHI	Erika Delgado (No publicado)
pFTescJ	<i>escJ</i> clonado en pTrc99AFF4 en los sitios de restricción -NdeI-BamHI	Este trabajo

pFTmap	<i>map</i> clonado en pTrc99AFF4 en los sitios de restricción NdeI-HindIII. Amp ^R	Este trabajo
pFTpDΔ1-111	<i>sepD</i> sin los últimos 40 codones clonado en pTrc99AFF4	Este trabajo
pFTpDΔ41-151	<i>sepD</i> sin los primeros 40 codones clonado en pTrc99AFF4	Este trabajo
pFTpD41-111	<i>sepD</i> sin los primeros y últimos 40 codones, clonado en pTrc99AFF4	Este trabajo
pKD13	Plásmido molde utilizado en el sistema de la recombinasa Red para amplificar el casete de resistencia a kanamicina, Amp ^R y Km ^R	(Datsenko and Wanner 2000)
pKD46	Plásmido de expresión del sistema de recombinasa Red, Amp ^R Termosensible.	(Datsenko and Wanner 2000)
pMTHpL	<i>sepL</i> clonado en pTrc99AFF4, en los sitios de restricción NdeI-BamHI	Miguel Ángel Díaz (No publicado)
pNEmap	<i>map</i> clonado en pET19b, sitios de restricción NdeI-HindIII, Amp ^R	Este trabajo

5.2.- Manipulación de DNA

Las amplificaciones por PCR se realizaron a partir de DNA cromosomal purificado de la cepa deseada. Los productos obtenidos se purificaron por distintos paquetes comerciales (Qiagen, Invitrogen, etc.), se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes (New England Biolabs) y se clonaron en los vectores digeridos con las mismas enzimas. Las enzimas de restricción, ligación y DNA polimerasa se utilizaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Todas las construcciones obtenidas se analizaron en geles de agarosa 1% en amortiguador TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético glacial al 1.2%, EDTA 1 mM, pH8), se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron por exposición a luz ultra violeta. Además, se

verificaron por digestión enzimática y se secuenciaron en la unidad de biología molecular del Instituto de Fisiología Celular.

5.3.- Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos diseñados en este trabajo se muestran en la Tabla 4. Los oligonucleótidos utilizados para la delección de regiones del gen *sepD* se diseñaron agregando un sitio de restricción y un codón de inicio o un codón de paro según se requiriese (Tabla 4). El oligonucleótido sepDNt añadió un codón de inicio a través del sitio de restricción NdeI y se utilizó para eliminar los primeros 120 pares de bases del gen *sepD*; de igual forma se diseñó el oligonucleótido sepDCt con el que se generó una delección en el extremo contrario y se obtuvo una versión trunca del gen al insertar un codón de paro y el sitio BamHI.

```

atgacaataataatggcatagcaaagaatgattgtgactggcctaacggcccttgat
M N N N N G I A K N D C D W L T A L D F
                                accaaaaacatats
gtaaaggatgtcaacggttcaccaacgcatctcactttttatatctacaaaaaaatgct
V K D V N G S P T H L T F Y I Y Q K N A
ttcttgcac
ttcttgcacgattttggaaactactgggttctatatatcgagcttagtggtgatttcgt
F L H D F G N Y W V L Y I E L S G D F R
cagattccaacagatacatttatcagactctgcaatatcctggccgtagtaagaatat
Q I P T D T F I R L C N I L A V S K E Y
aaacaaatgggtatcttctgtctaataagaagtggatctttgccaaatcttccataaa
K Q M G I F L S N K K W Y L C Q I F H K
aaagcataaaggatccataactctc
gataataatcatcgcgcaaacatgtcaaaagcaataatgcaacataactctcgcctcgttg
D N N H R A N M S K A I M Q H T L A S L
ctcgacaagcaatttgataaactagagcaatcatcttcatcagatacaatgatgccgcca
L D K Q F D K L E Q S S S S D T M M P P
acacacttgtttctgatataggacgaattgtctaa
T H L F S D I G R I V

```

Figura 7. Secuencia completa del gen *sepD*. En minúsculas se muestran las bases codificantes y en mayúsculas los aminoácidos. Los oligonucleótidos usados se muestran resaltados en amarillo con el sitio de restricción NdeI y BamHI, respectivamente, señalados en verde. Se señala el codón de inicio y término de la región codificante de *sepD* encerrados en un cuadro azul y rojo, respectivamente.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia
<i>escJ</i>	
<i>pTrc promoter</i>	ACAATTAATCATCCGGCTCGTATA
<i>K2</i>	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
<i>KT</i>	CGGCCACAGTCGATGAATCC
<i>K1</i>	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
<i>escJF</i>	GATGCAATACATATGAAAAACAC
<i>escJR</i>	TATTGTTGGATCCATTACCCGTC
<i>deltaescJFw</i>	ACATATTACCCGTCCTGTCCTGAGGACTTGATAACAACACTAATATTGT GTAGGCTGGCTGGAGCTGCTTC
<i>deltaescJRv_</i>	AAATGAAAAACACATTAACAACTTTTTTTTATTGGCTGCTATTGTTT GATTCGGGGATCCGTCGACC
<i>sepD</i>	
<i>sepDNde</i>	TAATACATATGAACAATAATAATG
<i>sepDBam</i>	AAAAACTTATTGGATCCATTACAC
<i>sepDdeltaN40Fw</i>	TACCAAAAACATATGTTCTTGACAC
<i>sepDdeltaC40Rv</i>	GAGAGTATGGGATCCTTATGCTTT

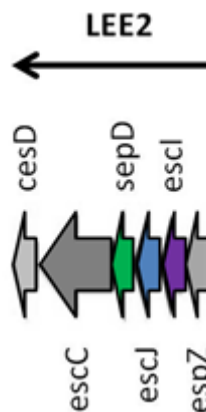
* En esta Tabla se muestran subrayados los sitios de restricción en los oligonucleótidos.

5.4.- Generación de la mutante nula *escJ*

Se eliminó el gen *escJ* de la cepa de EPEC mediante el sistema de la recombinasa Red del fago lambda (Datsenko and Wanner 2000). Esta técnica se basa, en reemplazar el gen de interés por un casete de resistencia a antibiótico mediante recombinación homóloga. Para amplificar el casete de resistencia a kanamicina se diseñaron dos oligonucleótidos, *escJF* y *escJR* con 50 bases homólogas a las regiones aledañas al gen *escJ* y 20 bases homólogas al plásmido pKD13 que se utilizó como templado para la amplificación del casete de resistencia de forma que éste se insertara en el sentido original del gen. El casete de resistencia se amplificó por PCR y usando el producto purificado de éste, se hizo una segunda amplificación. El producto de la reamplificación se purificó con el paquete comercial Gel Extraction de Qiagen. Paralelamente

se electroporó la cepa silvestre de EPEC con el plásmido pKD46 que expresa al sistema de la recombinasa. Una de las colonias resultantes se creció a 30 °C en un precultivo de 3 mL para al siguiente día crecer un cultivo de 30 mL, en el que se indujo la producción de la recombinasa agregando arabinosa (a una concentración final de 0.1 M). El cultivo se creció a 30 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.7 y se prepararon células electrocompetentes. Se electroporaron 4 µl del casete purificado, se dejaron recuperar las células toda la noche a 30 °C y al día siguiente se sembraron en cajas de LB con Sm+Km y se incubaron a 37 °C. Las colonias candidatas se seleccionaron por su resistencia a kanamicina y su sensibilidad a ampicilina (que indica la pérdida del plásmido termosensible pKD46). La inserción correcta del casete se verificó por PCR.

A.-



Contexto silvestre del gen *escJ*

B.-

```

1  aaaatagtg  tgtaaaaata  aaaaaactta  tttttttcat  taacacaattc  gtcctatatac
61  agaaaacaag  tgtgttggcg  gcatcattgt  atctgatgaa  gatgattgct  ctagtttatc
121 aaattgcttg  tcgagcaacg  aggcgagagt  atgttgcat  attgcttttg  acatgtttgc
181 gcgatgatta  ttatctttat  gaaaaatttg  gcaaagatac  cacttcttat  tagacaggaa
241 aataccatt  tgtttatatt  ctttactaac  gccaggata  ttgcagagtc  tgataaatgt
301 atctgttga  atctgacgaa  aatcaccact  aagctcgata  tatagaacct  agtagtttcc
361 aaaatcgtgc  aagaaagcat  ttttttggt  gatataaaaa  gtgagatgcg  ttggtgaacc
421 gttgacatcc  ttacaaaat  caagggccgt  tagccagtca  caatcattct  ttgctatgcc
481 attattattg  ttcatacata  ttaaccgtcc  tgtcctgagg  atgaacttgat  aacaacacta

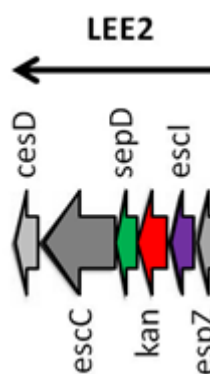
```

```

541 atatttttcta atttgagatc gtcgacacta ttcttaacca ggttttttat ctgaatgacc
601 gatggtgcta agttaaccto tggcgagctg atgactaaaa cggctgctga ggatggttga
661 ctttcgttat tgtaacatt taatgaaacg ctgcaatcga taacaccggg tattttactt
721 agcaaccttt cgatgtcttg ttctttgaga tagttgattt ttgcattttc ttgtgatggc
781 gatgccacta actggctggg tgggaaaata acctcgatat ctgcaaatth ctttttcggg
841 aagccgttat tatttaaaat cgttattgcy cgaacaaaat cctctttttc cacactgagt
901 gtcataatth cacttttgte catttctttg gaaacattga catcattgga tagcaacagt
961 gcttgcactc gattagcttc tttttctggt aatcctgtat acaattgctc tttacatgcc
1021 actgtcaaac aaatagcagc caataaaaaa aggttttttaa tgtgtttttt cacttttaatt
1081 gcatcgaaac taatthtga accgatgthg aaaggaggct tgctaactta gatacgacat
1141 caacattgac gthtgcgthg agcacattct tthgtaaagt gagtacactc tccggcgaga
1201 gccacctgc agatagtgca tcgaaactga gatcggthg cattgthgca agatgthgct
1261 tthtaatthc ctcaatcaac actgthtctg gggaagacac tccgcctgth ttagggagta
1321 attgatcaag aactgagcc gthccggctg cagaggggthg tgatgthaac gggatagthc
1381 catcaacgac atthgthtgg gatgctthtatt ttaactgaaat atthaatgtht tccgattgath
1441 taatattatt catatthtact gthtagctctc tthcatgaga gaggcaatag cataatgath
1501 cacttacctc tctatthttha tgcgathgca tgattagthca tathtcatcg cthaatccgc

```

Figura 8. Se muestra un esquema del contexto genómico silvestre y las secuencias de nucleótidos que codifican para *sepD*, *escJ* (azul) y *escI*. (A) Contexto genómico silvestre del gen *escI* (B) Resaltadas en amarillo se muestran las 50 bases de cromosoma seleccionadas para la generación de oligonucleótidos. Los codones de inicio de los tres genes resaltados en color verde y los de paro en rojo



Mutante teórica $\Delta escJ::kan$

```

1 aaaatagthc tghtaaaaata aaaaaactth tthttttcat tacacaatthc gthcctatath
61 agaaaaacaag tghtgthggcg gathcattgth atctgathgaa gathgattgct ctagthttath
121 aaattgctthg tgcagcaacg aggcgagagth atgthtgath attgctththg acathgththg
181 gcgathgatha ttatctthtath gaaaaatthg gcaaaagathc cactthctthtath tagacagghaa
241 aataaccath tghtthtath ctthtactaac ggccagghata tthgagagthc tgataaatgth
301 atctgthtggaa atctgathgaa aatcaccath aagctcgatha tatagaacc agthagthttcc
361 aaaatcgtgc aagaaagath tthttthggha gathataaaaa gthgagathgc tthgthgaacc
421 gthgathcctc tthacaaaat caagggcctg tagccagthca caathcattct tthgctathgc
481 attathattg tthcatacata tthaccgthcc tthtcctgaggh atgaththtath aacaacacth

```

```

541 atattGTGTA GGCTGGAGCT GCTTCGAAGT TCCTATACTT TCTAGAGAAT AGGAACTTCG
601 GAATAGGAAC TTCAAGATCC CCTTATTAGA AGAACTCGTC AAGAAGGCGA TAGAAGGCGA
661 TGCCTGCGA ATCGGGAGCG GCGATACCGT AAAGCACGAG GAAGCGGTCA GCCCATTCGC
721 CGCCAAGCTC TTCAGCAATA TCACGGGTAG CCAACGCTAT GTCCTGATAG CGGTCCGCCA
781 CACCCAGCCG GCCACAGTCG ATGAATCCAG AAAAGCGGCC ATTTTCCACC ATGATATTCG
841 GCAAGCAGGC ATCGCCATGG GTCACGACGA GATCCTCGCC GTCGGGCATG CGCGCCTTGA
901 GCCTGGCGAA CAGTTCGGCT GGCGGAGCC CCTGATGCTC TTCGTCCAGA TCATCCTGAT
961 CGACAAGACC GGCTTCCATC CGAGTACGTG CTCGCTCGAT GCGATGTTTC GCTTGGTGGT
1021 CGAATGGGCA GGTAGCCGGA TCAAGCGTAT GCAGCCGCCG CATTGCATCA GCCATGATGG
1081 ATACTTTCTC GGCAGGAGCA AGGTGAGATG ACAGGAGATC CTGCCCCGGC ACTTCGCCCA
1141 ATAGCAGCCA GTCCCTTCCC GCTTCAGTGA CAACGTCGAG CACAGCTGCG CAAGGAACGC
1201 CCGTCGTGGC CAGCCACGAT AGCCGCGCTG CCTCGTCTTG CAGTTCATTC AGGGCACCCG
1261 ACAGGTCGGT CTTGACAAAA AGAACCGGGC GCCCCTGCGC TGACAGCCGG AACACGGCGG
1321 CATCAGAGCA GCCGATTGTC TGTGTGCCC AGTCATAGCC GAATAGCCTC TCCACCCAAG
1381 CGGCCGGAGA ACCTGCGTGC AATCCATCTT GTTCAATCAT GCGAAACGAT CCTCATCCTG
1441 TCTCTTGATC AGATCTTGAT CCCCTGCGCC ATCAGATCCT TGGCGGCAAG AAAGCCATCC
1501 AGTTTACTTT GCAGGGCTTC CCAACCTTAC CAGAGGGCGC CCCAGCTGGC AATTCCGGTT
1561 CGCTTGCTGT CCATAAAACC GCCCAGTCTA GCTATCGCCA TGTAAGCCCA CTGCAAGCTA
1621 CCTGCTTTCT CTTTGCCTT GCGTTTTCCC TTGTCCAGAT AGCCCAGTAG CTGACATTCA
1681 TCCGGGGTCA GCACCGTTTC TGCGGACTGG CTTTCTACGT GTTCCGCTTC CTTTAGCAGC
1741 CCTTGCGCCC TGAGTGCTTG CGGCAGCGTG AGCTTCAAAA GCGCTCTGAA GTTCTTATAC
1801 TTTCTAGAGA ATAGGAACTT CGAACTGCAG GTCGACGGAT CCCC GGAATc aaacaaatag
1861 cagccaataa aaaaagggtt ttaatgtgtt tttt ttt taattgcatcg aaactaattt
1921 tgtaaccgat gttgaaagga ggcttgctaa cttagatacg acatcaacat tgacgtttgc
1981 gttgagcaca ttcttttgta aagtgagtac atcttcgggc gagagccac ctgcagatag
2041 tgcatcgaaa ctgagatcgg tgttcattgt tgcaagatgt cgctttttaa tttcctcaat
2101 caacacttgt tctggggaag aactcccgc cgttttaggg agtaattgat caagaaactg
2161 agccgctccg gctgcagagg gggttgatgc taacgggata tgctcatcaa cgacatttgt
2221 ttgggatgct ttatttaact gaatattaat gttttccgat tgattaatat tattcatatt
2281 tactgttagt ctcttttcat gagagaggca atagcataat gcatcatta cctctctatt
2341 tttatgcat gcatgatta ggcataattc atcgctaate cgcc

```

Figura 9. Se muestran las secuencias de nucleótidos codificantes para sepD, casete de resistencia kanamicina y escl. En verde y mayúsculas, la secuencia del casete de resistencia a kanamicina. Resaltadas en amarillo se muestran las 50 bases de cromosoma seleccionadas para la generación de oligonucleótidos y recombinación. Los codones de inicio de los genes, resaltados en verde y los codones de paro en rojo. Subrayados los oligonucleótidos internos al casete y de los genes aledaños utilizados para la comprobación por PCR de la mutante.

5.5.- Producción de las proteínas recombinantes His-Map, His-SepL, SepD, SepD₁₋₁₁₁, SepD₄₁₋₁₅₁ y SepD₄₁₋₁₁₁.

Para la sobreproducción de proteínas recombinantes, las construcciones pMTHpL, pATpD, pFTpD₁₋₁₁₁, pFTpD₄₁₋₁₅₁, pFTpD₄₁₋₁₁₁ y pNEmap se transformaron en las cepas de expresión indicadas en la Tabla. 4. Todos los cultivos se indujeron con IPTG, metabolito que induce el inicio de la transcripción del gen de interés. Las células se colectaron por centrifugación y se analizaron por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se tiñeron con azul de Coomassie.

Tabla 5. Condiciones de inducción.

	Cepa de expresión	Volumen de cultivo (mL)	Temperatura (°C)	[IPTG] (mM)
His-Map	BDP	200	37	0.5
His-SepL	SJW1368	100	30	0.1
SepD	BDP	200	37	0.1
SepD ₁₋₁₁₁	BDP	200	37	0.5
SepD ₄₁₋₁₅₁	BDP	200	37	0.5
SepD ₄₁₋₁₁₁	BDP	200	37	0.5

5.6.-Purificación de la proteína recombinante His-Map

Para sobreproducir al efector recombinante His-Map se transformó la construcción pNEmap en la cepa BL21 (DE3) pLysS (BDP) (Tabla 2) y se indujo la expresión como se mencionó en la Tabla 5. Posteriormente las células se cosecharon, resuspendieron en 20mL de amortiguador de unión (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF, inhibidor de proteasas de serina)) y se rompieron con el sonicador Bradson Sonifier 450, con 4 pulsos

de 45 segundos cada uno con un descanso de un minuto entre cada pulso. El lisado celular se centrifugó a 12, 000 rpm a 4 °C, por 30 minutos, ambas fracciones, soluble e insoluble se colectaron. se colectó tanto la fracción insoluble, como el sobrenadante (fracción soluble). Ambas muestras se analizaron mediante SDS-PAGE 15% y su posterior tinción con azul de Coomassie.

Debido a que la mayor proporción de la proteína recombinante His-Map resultó ser insoluble, se decidió purificar a esta proteína en condiciones desnaturizantes añadiendo 6 M de urea (incrementa de manera importante la solubilidad de las proteínas) al amortiguador de unión. Posteriormente, se recuperó la fracción soluble desnaturizada y se cargó en una columna con resina Ni-NTA (Qiagen) previamente empacada y lavada con amortiguador de unión. La columna con His-Map unida se lavó con amortiguador de unión con 20 mM de imidazol y se eluyó en 3 ocasiones con 200, 300 y 400 mM de imidazol. El perfil de purificación se analizó mediante un gel desnaturizante SDS-PAGE al 15% y se tiñó con azul de Coomassie.

5.7 Diálisis de las muestras desnaturizadas con urea

Para renaturalizar la proteína recombinante His-Map se removió el agente desnaturizante mediante un proceso de diálisis. Se utilizaron membranas de celulosa (Spectra/Pore) con poros de 3,500 Daltones (Da) que permiten la salida de moléculas menores al tamaño del poro sin que salga la proteína (His-Map ~24 kDa). El proceso de diálisis se realizó en amortiguador con 4, 2, 1 y 0.5 mM de urea (al menos 2 horas en cada concentración) y tras esto se dejó toda la noche en amortiguador de diálisis sin urea. La concentración de proteína se cuantificó por el método Bradford (Bradford 1976) utilizando el sistema "Bio-Rad Protein

Assay” y siguiendo el protocolo estándar. Como patrón para la curva de calibración se utilizó albúmina de suero bovino (BSA).

5.8.- Obtención de anticuerpos policlonales α -Map

Para la obtención de anticuerpos α -Map se utilizó un conejo hembra variedad Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*). El conejo se inmunizó con 200 μ g de la proteína siguiendo el protocolo de inmunización y obtención de suero detallado en la Tabla 6. Las primeras 3 inmunizaciones se realizaron vía subcutánea utilizando adyuvante de Freund (la primera inmunización con adyuvante completo y los dos restantes con adyuvante incompleto) que potencia la respuesta inmune. La cuarta inyección fue vía intravenosa para mejorar la antigenicidad.

Para la obtención del suero, se extrajo sangre a través de una incisión en la vena marginal de la oreja hasta obtener el volumen deseado (50mL). La sangre se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, hasta obtener un coágulo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se alicuotó el suero y se guardó congelado a -70 °C hasta su análisis.

Tabla 6. Calendario de inmunización.

<u>Inmunización</u>	<u>Sangrado</u>
Semana 1. Primera inmunización, volúmenes iguales de adyuvante y proteína His-Map (200 μ g). Inyección subcutánea con adyuvante de Freund completo.	Preimmune 50 mL.
Semana 3. Segunda inmunización, inyección subcutánea. 200 μ g de proteína His-Map con adyuvante de Freund incompleto.	

Semana 5.	Sangrado de 50 mL.
Semana 7. Tercera inmunización, inyección subcutánea de 200 µg de proteína His-Map con adyuvante de Freund incompleto.	
Semana 9.	Segundo sangrado de 50 mL.
Semana 11. Cuarta inmunización con 200 µg de proteína His-Map, inyección intravenosa en oreja. Sin adyuvante.	
Semana 13.	Tercer sangrado 50 mL.

5.9.-Ensayos de inmunodetección

Las proteínas contenidas en las distintas muestras se separaron de acuerdo a su masa molecular mediante electroforesis en gel y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con solución de bloqueo (TBS-T 0.1% (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM y Tween 0.1%) adicionado con leche descremada al 5%) en frío durante una hora. La membrana se lavó con TBS-T y se probó contra el anticuerpo de interés. Cuando se requirió, se usó el anticuerpo secundario GAR-HRP o GAM-HRP, que reconoce IgG de conejo o de ratón, respectivamente y que está acoplado a la peroxidasa del rábano. Finalmente se realizó la detección por quimioluminiscencia con el paquete comercial ECL *Western blotting* de Amersham.

5.10.- Precipitación de anticuerpos con sulfato de amonio

Los anticuerpos policlonales obtenidos se sometieron a purificación por precipitación de anticuerpos con sulfato de amonio, para esto se tomaron 10 mL de suero y se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, el sobrenadante de esta centrifugación se conservó y

transfirió a un vaso de precipitados en un baño de hielo al que gota a gota se le agregaron 10 mL de sulfato de amonio $[(\text{NH}_4) \text{SO}_4]$ pH 7.0, se dejó incubando toda la noche. Al día siguiente la mezcla se centrifugó a 3000 rpm 30 min a 4 °C y se conservó la pastilla, esta se resuspendió en un tercio del volumen inicial de PBS. La muestra resuspendida se dializó a 4 °C contra 100 mL de PBS, se cambió el amortiguador 3 veces y la tercera se dejó toda la noche en agitación. Los anticuerpos concentrados se llevaron hasta el volumen original de suero con PBS y se centrifugaron a 7500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un vaso de precipitados limpio y se agitó a 4 °C durante 15 minutos. Se centrifugó nuevamente a 3000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con un tercio del volumen y se dializó como se describió anteriormente. Por último, la muestra dializada se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min a 4 °C, se conservó el sobrenadante y se alicuotó para ser almacenado a -70 °C.

5.11.- Ensayo de secreción de proteínas a través del SST3

Las bacterias se crecieron en 2 mL de medio LB con el antibiótico necesario durante la noche a 37° C en agitación. Con este precultivo se inocularon con una relación 1:100, 6 mL de medio Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) preequilibrado a 37° C y se crecieron en estático y a una atmósfera de 5% de CO₂ hasta alcanzar una DO₆₀₀ de entre 0.7 y 0.8. Para el análisis de la producción de las proteínas en las distintas cepas, se tomó una muestra de 2 mL y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos para separar el sobrenadante de la pastilla celular, esta última se resuspendió en 200µl de amortiguador de carga 1X (Tris-HCl pH 6.8 50mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%) ajustando la relación de volumen con la densidad óptica. Por otro lado, las proteínas presentes en el sobrenadante se precipitaron con 10% de ácido tricloroacético (TCA) durante toda la noche a 4 °C. Las proteínas precipitadas se

centrifugaron a 14000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, el sobrenadante se eliminó por succión y las proteínas de la pastilla se resuspendieron en 40 µl de amortiguador de carga 1X (ajustando la relación de volumen con la densidad óptica), adicionado con Tris saturado con el objetivo de neutralizar los residuos de TCA. Todas las muestras recolectadas se analizaron por electroforesis en geles SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie.

5.12.- Producción de proteínas recombinantes

Las construcciones utilizadas durante este trabajo se transformaron en células quimiocompetentes BL21 (DE3) pLysS (BDP), la expresión de proteínas se indujo al agregar IPTG al medio al llegar este a una DO_{600nm} entre 0.6 y 0.8. Se determinaron las condiciones ideales de expresión de nuestras proteínas de interés y se tomó una muestra cada hora para monitorear el comportamiento de la producción a lo largo del tiempo.

5.13.- Purificación de la proteína recombinante His-SepL

Para purificar a la proteína SepL con una etiqueta de 10 histidinas se transformó la construcción pMTHL en células BDP. Se utilizaron cultivos de 100 mL crecidos a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica DO_{600nm} entre 0.6 y 0.8 momento en el que se indujo el cultivo con 0.5 mM de IPTG y se dejó crecer durante 4 horas. Las células se colectaron por centrifugación a 8000 rpm, 10 minutos. Se conservó la pastilla celular y se congeló hasta su uso.

La pastilla celular se resuspendió en un décimo del volumen original de amortiguador de unión (BB; 500 mM NaCl y 20 mM Tris-HCl pH 7.5), se agregó 1 mM de PMSF y las células se lisaron en frío con el sonicador Bradson Sonifier con 4 pulsos de 45 segundos cada uno con

un descanso de un minuto entre cada pulso. El lisado celular se centrifugó a 14,000 durante 30 minutos. El sobrenadante corresponde a la fracción soluble y la pastilla celular a la fracción insoluble del lisado.

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad a níquel. Se empacaron 200 μ l de resina acoplada a níquel (Ni-NTa, QIAGEN) en una columna. La fracción soluble del lisado celular se pasó por la columna de níquel y se lavó con concentraciones crecientes de imidazol, posteriormente se eluyó tres veces con una concentración mayor de imidazol.

5.14.- Ensayo de copurificación por cromatografía de afinidad

El ensayo de copurificación se fundamenta en la sobreexpresión de dos proteínas, una de las cuales presenta una etiqueta con afinidad a una resina (de níquel para este caso) y la otra no. La fracción soluble del cultivo que sobreexpresa a la proteína etiquetada se carga en una columna con resina de afinidad. Posteriormente se lava la columna y se pasa la fracción soluble del cultivo que sobreexpresa la proteína que no tiene etiqueta. Después de este paso se sigue el protocolo de purificación de proteínas recombinantes, mencionado anteriormente. De interaccionar las proteínas, la proteína con etiqueta retendrá a la otra y las dos copurificarán. Se determina la presencia de ambas proteínas mediante tinción de Coomassie e inmunodetección.

Las proteínas His-SepL, SepD, SepD₁₋₁₁₁, SepD₄₁₋₁₅₁, SepD₄₁₋₁₁₁, se indujeron como se especifica en la Tabla 4. Los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y las pastillas se congelaron a -20 °C hasta su uso. A las pastillas se les agregaron 15mL de amortiguador de unión y 1mM de PMSF. Las células se sonicaron en

pulsos de 45 segundos por un minuto de descanso entre cada pulso. Los lisados se centrifugaron a 15000 rpm durante 30 minutos a 4 °C en el rotor JA 25.50 y se conservó la fracción soluble. Posteriormente, 200 µl de resina Ni-NTA se empacaron en la columna, la resina se lavó con 10 mL de amortiguador de unión y se pasó la fracción soluble del lisado de la proteína His-SepL, se tomaron 30 µl de muestra de la fracción no unida (FNU), posteriormente se hizo un lavado con 40 mL de amortiguador de unión con 60 mM de imidazol y se pasó el lisado de la proteína SepD, e hicieron lavados subsecuentes con concentraciones crecientes de imidazol y se eluyó con 2 mL de amortiguador con 200, 300 y 600 mM de imidazol. Se tomaron 100 µl de todas las fracciones y a todas estas muestras se les agregó amortiguador de carga 4 X (Tris-HCl 200 mM, SDS 8%, azul de bromofenol 0.4% y glicerol 40%) y se analizaron en un gel de acrilamida al 17% teñido con azul de Coomassie.

5.15.-Ensayo *in vitro* de interacción proteína-proteína por inmunoréplica de afinidad.

Se cargaron y corrieron geles SDS-PAGE al 16% con las muestras de SepD completo y sus respectivas versiones truncas. Se transfirieron durante toda la noche a 20 V a membranas de nitrocelulosa, dichas membranas se bloquearon como se indicó anteriormente y se realizaron 3 lavados con TBS-T de 10 minutos cada uno. Posteriormente e incubó durante 1 hora a 4 °C con la proteína prueba purificada (6 µg/mL de TBS-T) o en el caso de SepL-FLAG con 5 mL la fracción soluble de la misma.

Se retiró el exceso de proteína soluble flotante mediante lavados con el mismo amortiguador, después se incubó por 1 hora a 4 °C con el anticuerpo policlonal anti-SepL en una dilución 1:

15,000. Finalmente se incubó durante 1 hora a 4 °C con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa (GAR), en dilución 1: 10,000, se realizaron los lavados correspondientes y se reveló mediante una reacción quimioluminiscente. Los anticuerpos anti-FLAG se incubaron por 1 hora a 4 °C en una dilución 1:10,000, como estos ya tienen acoplada la peroxidasa de rábano, se prosiguió a lavar como anteriormente se describe y se reveló la membrana mediante una reacción quimioluminiscente.

6.-RESULTADOS

6.1.- CAPÍTULO 1. Generación de anticuerpos contra la proteína efectora Map

Con el objetivo de generar anticuerpos policlonales contra la proteína efectora Map y así poder reconocer su secreción en ensayos de secreción tipo III en la cepa silvestre y diferentes fondos mutantes de EPEC, fue necesario sobreproducir y purificar a la proteína Map. Para inducir la producción del efector Map, se transformó la construcción pNEmap en células competentes *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (BDP), que se indujeron con diferentes concentraciones de IPTG y a distintas temperaturas. Se encontró que las condiciones óptimas para la expresión de la proteína recombinante His-Map fueron: 0.1 mM IPTG y 30 °C, en agitación a 250 rpm. Se tomaron muestras previas a la inducción con IPTG (T_0) y durante cada hora después de la inducción hasta tener 4 tiempos (T_{1-4}). Las muestras se analizaron por electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 15% (Figura 10). Se puede observar un claro incremento en la producción de la proteína His-Map, cuya masa molecular predicha es de 22.52 kDa, a partir del segundo tiempo después de la inducción (Figura 10).

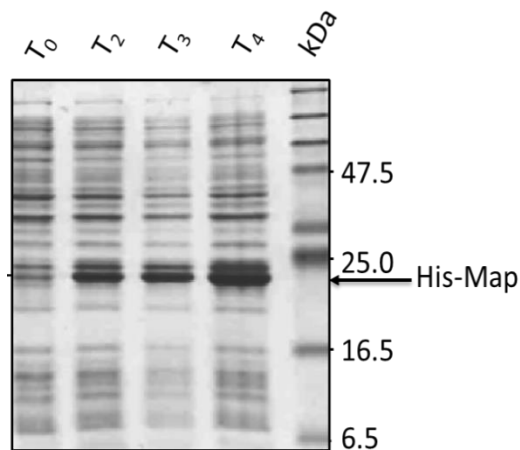


Figura 10. Curva de expresión de la proteína His-Map. SDS-PAGE 15% que muestra la inducción de la proteína His-Map. T₀. Cultivo sin inducir. T₂₋₄ muestras tomadas durante cada hora a partir de la segunda hora de la inducción. Se muestran los valores del marcador de masa molecular en kilodaltones (kDa) y las muestras obtenidas del cultivo a través del tiempo.

Para comprobar si la proteína observada se trataba en efecto de His-Map se hizo un ensayo de inmunodetección tipo Western-blot con anticuerpos monoclonales anti-histidinas, que reconocen una banda en el carril correspondiente a la muestra del tiempo 4 de la inducción en la masa molecular esperada para His-Map por lo que se comprueba que la producción es de la proteína recombinante His-Map (Figura 11).

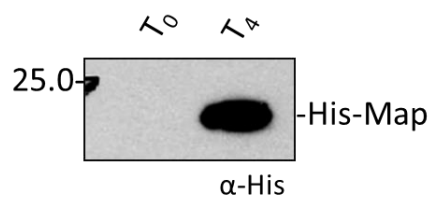


Figura 11. Inmunodetección de His-Map por anticuerpos anti-histidinas. Se muestra el indicador de masa molecular de 25 kDa (25.0), una muestra previa a la inducción con IPTG (T₀) y una muestra tras cuatro horas de inducción (T₄). Se observó el reconocimiento de los anticuerpos anti-histidinas de la proteína His-Map.

Las mismas condiciones de inducción se utilizaron para determinar la ubicación de la proteína producida, si se encontraba en la fracción soluble o insoluble; este proceso se realizó por

fraccionamiento mediante sonicación, seguido de centrifugación para separar a la fracción soluble de la insoluble, las que se analizaron en geles de acrilamida SDS-PAGE 15%.

Se observó que la proteína sobreproducida se encontraba en la fracción insoluble (Figura 12 A) y se confirmó la identidad de His-Map mediante inmunodetección (Figura 12 B).

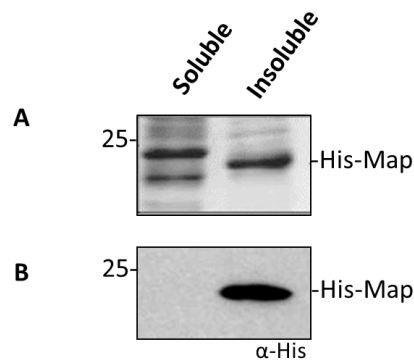


Figura 12. Determinación de solubilidad de His-Map. (A) Fracciones soluble e insoluble de un cultivo inducido con IPTG durante 4 h. SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie, indicador de masa molecular 25kDa **(B)** Inmunodetección por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-histidinas.

Es posible observar que toda la proteína se queda en la fracción insoluble, posiblemente formando cuerpos de inclusión (Figura 12).

6.1.1.- Purificación de la proteína recombinante His-Map

Dado que la proteína recombinante His-Map resultó ser sumamente insoluble, se optó por seguir un protocolo de purificación en condiciones desnaturizantes mediante cromatografía de afinidad por níquel a partir de la fracción insoluble. Se indujo la producción de la proteína His-Map como se describió previamente, posteriormente la pastilla celular se resuspendió en amortiguador con 6 M de urea para continuar con el protocolo de fraccionamiento por sonicación y purificación por cromatografía de afinidad (ver Materiales y métodos). Se

tomaron muestras de las diferentes fracciones obtenidas de la purificación y se analizaron por SDS-PAGE al 15% (Figura 13).

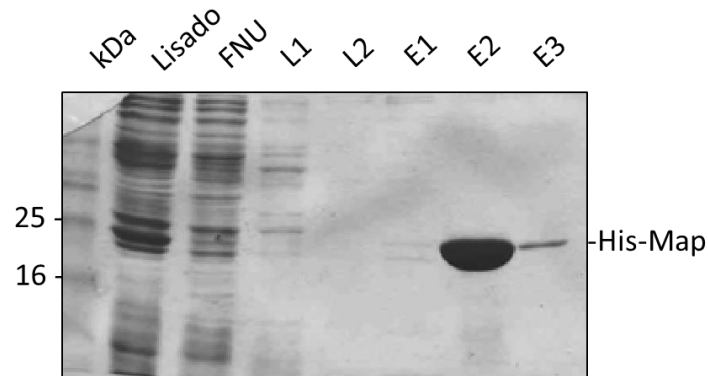


Figura 13. Purificación de His-Map a partir de la fracción insoluble por desnaturalización de la proteína con urea. Carriles: kDa: Marcador de masa molecular, Lisado: Lisado celular tras 4 horas de inducción, FNU: Fracción no unida a la columna, L1 y L2: Lavados con 10 y 20 mM de imidazol, respectivamente. E1, E2 y E3: Eluciones con 200, 300, y 500 mM de imidazol, respectivamente.

En la figura 13 se observa que la proteína eluye prácticamente sin contaminantes, obteniéndose la mayor cantidad de proteína en la elución con 300 mM de imidazol.

6.1.2.- Renaturalización de la proteína recombinante His-Map

Debido al tratamiento con urea, un agente caotrópico, la proteína se encontraba en estado desnaturalizado. La proteína purificada se renaturalizó mediante un proceso de diálisis eliminando al agente caotrópico (ver Materiales y métodos) (figura 14) y posteriormente se cuantificó por el método de Bradford (BioRad) obteniendo un rendimiento total de 249.8 μg a partir de un cultivo de 100 mL, de los cuales se utilizaron 200 μg para la primera inmunización del conejo, para las siguientes inmunizaciones se volvió a purificar y se inmunizó con la misma cantidad de proteína total.

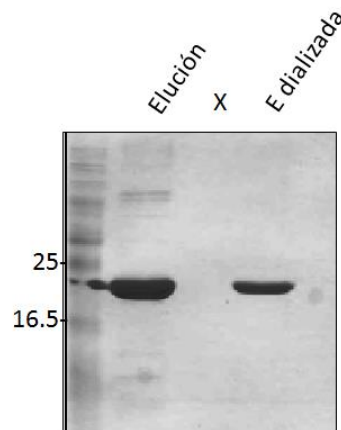


Figura 14. Proteína His-Map renaturalizada por diálisis. Elución: Proteína His-Map purificada por método desnaturalizante. Elución dializada: His-Map renaturalizada.

6.1.3.- Generación de anticuerpos policlonales

Para la obtención de anticuerpos se inmunizó un conejo siguiendo los esquemas especificados en materiales y métodos. Una vez obtenidos se probó su especificidad mediante un ensayo de inmunodetección utilizando el suero recuperado de la última inmunización. El suero preinmune se utilizó para ensayos que sirvieron como control al experimento.

Después de varias pruebas se encontró que la dilución óptima para la inmunodetección con los anticuerpos generados es de 1:5,000 para los sobrenadantes de un ensayo de secreción típico de EPEC. Se observó que los anticuerpos tienen un buen reconocimiento en el sobrenadante de la cepa silvestre de EPEC (Figura 15, panel superior), sin embargo, no fueron específicos en el lisado celular, dado que reconocen otras proteínas. Para obtener un reconocimiento más específico se purificaron las inmunoglobulinas a partir del suero del tercer sangrado por precipitación con sulfato de amonio saturado (ver materiales y métodos). La purificación no mostró diferencias significativas respecto a la especificidad de los anticuerpos del suero completo, ambos se probaron en un ensayo de secreción de las cepas:

silvestre (WT), cepa carente del regulador transcripcional Ler y cepa sin la ATPasa EscN, estos últimos dos son controles negativos de secreción (Figura 15).

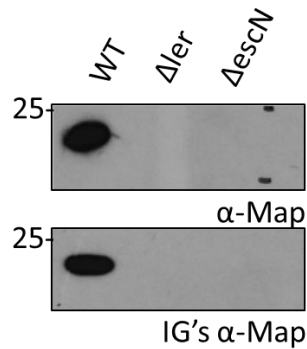


Figura 15. Comparación de la inmunodetección de las inmunoglobulinas anti-Map de suero y purificadas. Se muestra la comparación del reconocimiento del efector Map en los sobrenadantes de un ensayo de secreción en las cepas EPEC silvestre (WT), Δler y $\Delta escN$, por los anticuerpos del suero completo (panel superior) y las inmunoglobulinas purificadas (panel inferior).

6.1.4.-Reconocimiento de la proteína efectora Map por los anticuerpos generados

Una vez que se obtuvieron los anticuerpos anti-Map se procedió a verificar si éstos eran capaces de reconocer a la proteína Map con y sin la etiqueta de histidinas, cuando la proteína es sobre-expresada en una cepa de expresión. Como no se contaba con la construcción para sobre-expresar a la proteína Map sin la etiqueta, se subclonó una versión no etiquetada de Map (proveniente del vector pET19b) en el vector de alto número de copias pTrc99AFF4. Para realizar esto, el fragmento correspondiente a *map* se digirió a partir de la construcción pNEmap (pET19b+*map*) con las enzimas NdeI/HindIII. Una vez obtenido el fragmento digerido, se purificó de gel (mediante el kit de purificación Gel Extraction QIAGEN) junto con el vector pTrc99AFF4 digerido con el mismo par de enzimas. Ambos fragmentos de DNA purificados se sometieron a una reacción de ligación que se transformó en células de *E. coli* XL1-Blue, las que se sembraron en medio LB sólido con ampicilina. Se extrajo DNA plasmídico

de las colonias candidatas obtenidas y este se sometió a una reacción de restricción enzimática con el par de enzimas NdeI/HindIII para corroborar la presencia del inserto *map* (Figura 16). La construcción resultante se nombró pFTmap.

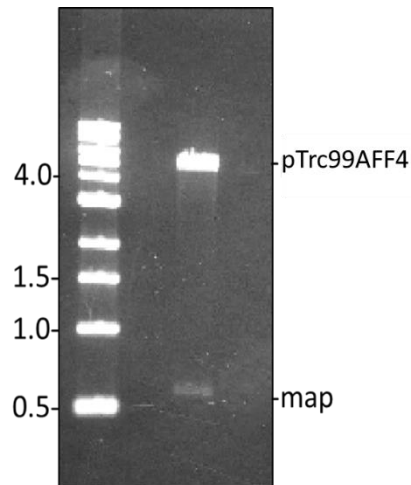


Figura 16. Ensayo de restricción sobre la construcción pTrc99AFF4/map. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Ensayo con enzimas de restricción NdeI/HindIII, se observa el fragmento correspondiente a *map* con un tamaño molecular aproximado de 612 pares de bases y el vector pTrc99AFF4 de 4,176 pares de bases.

Las construcciones pNEmap (pET19b/*map*) y pFTmap (pTrc99AFF4/*map*) se transformaron en cepas de expresión para su sobreproducción. Estas cepas transformadas se usaron para hacer ensayos de inducción. Como se observa en la Figura 17, hay un incremento en la producción de la proteína Map tanto en la versión etiquetada con histidinas como en la versión sin etiqueta a partir del segundo tiempo una vez iniciada la inducción con IPTG. Para corroborar la identidad de estas proteínas se hicieron ensayos de inmunodetección con anticuerpos anti-Map, los anticuerpos reconocen la sobreproducción gradual de manera específica, como se muestra en la Figura 17.

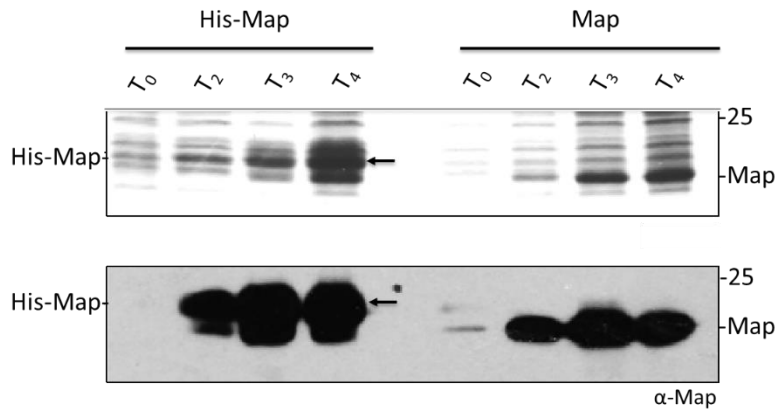


Figura 17. Perfil de producción y reconocimiento por inmunodetección tipo Western blot de las proteínas His-Map y Map. SDS-PAGE 15% que muestra la inducción de las proteínas His-Map y Map. T₀ cultivo sin inducir. T₂₋₄ muestras tomadas durante cada hora a partir de la segunda hora de la inducción. En el panel inferior, se muestra el reconocimiento en estas muestras por el anticuerpo anti-Map.

Este resultado demuestra que los anticuerpos generados no reconocen a la etiqueta de histidinas ya que son capaces de reconocer a la proteína Map sin etiqueta cuando es sobreproducida.

Para probar la utilidad de los anticuerpos anti-Map generados se realizó un ensayo de secreción con las cepas de EPEC silvestre (wild-type, WT), la cepa $\Delta escN$ (control negativo de secreción) y la cepa $\Delta sepL$ la cual hipersecreta efectores debido a una desregulación del segundo interruptor molecular. Como se observa en la Figura 18, al usar los anticuerpos policlonales generados, el efector Map es claramente detectado en el sobrenadante de la cepa de EPEC silvestre pero no en el de la cepa mutante $\Delta escN$. Del mismo modo, se detectó la hipersecreción de Map en el fondo $\Delta sepL$. Sin embargo, la producción de la proteína Map en los lisados celulares no pudo ser eficientemente detectada en las diversas condiciones en las que se realizó este experimento, muy probablemente debido a que los niveles de producción no son suficientes para detectarlos (Figura 18, panel inferior).

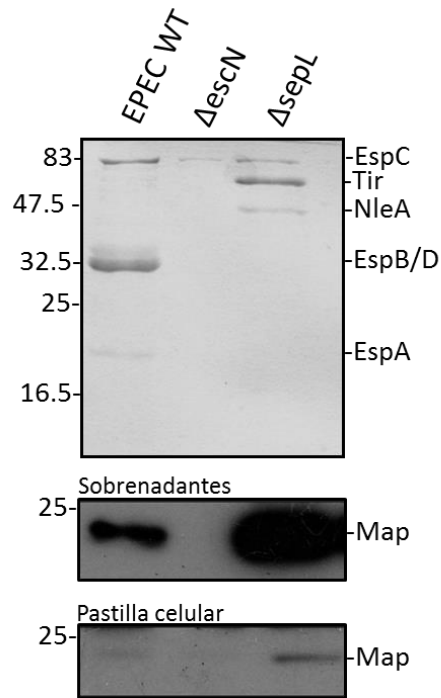


Figura 18. Ensayo de inmunodetección de la proteína Map secretada y producida en diferentes fondos genéticos. Se muestra el reconocimiento de los anticuerpos anti-Map obtenidos a partir de la inmunización de conejo. Carriles: 1: Fondo EPEC silvestre, 2 y 3 Fondos mutantes de las proteínas EscN y SepL.

6.2.- CAPÍTULO 2. Aislamiento de una mutante nula en el gen *escJ* y caracterización de su fenotipo

Para la generación de la mutante nula del gen *escJ* se realizó la amplificación por PCR y posterior purificación de un casete de kanamicina a partir del plásmido pKD13 con oligonucleótidos que contienen 20 bases homólogas al casete (P1 y P2) y 50 bases homólogas a los genes aledaños (H1 y H2) (Figura 19 y Figura 20).

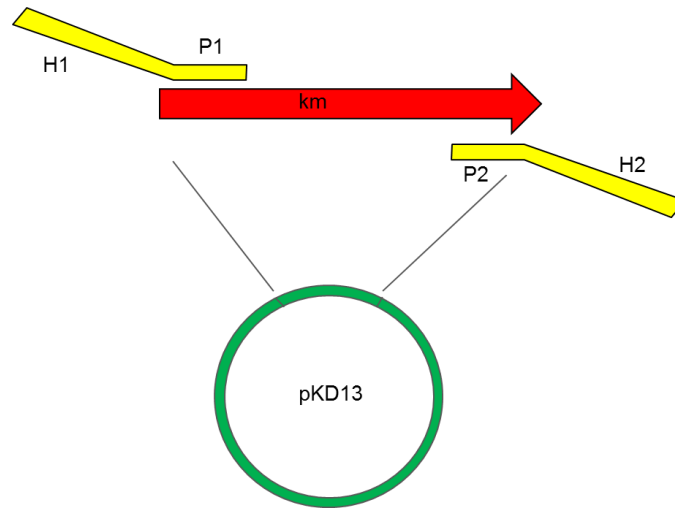


Figura 19. Esquema de la amplificación del casete de resistencia a kanamicina a partir del vector pKD13 con oligonucleótidos diseñados con 20 bases homólogas al casete de kanamicina (P1 y P2) y 50 bases homólogas a las regiones aledañas del gen a eliminar, *escJ* (H1 y H2).

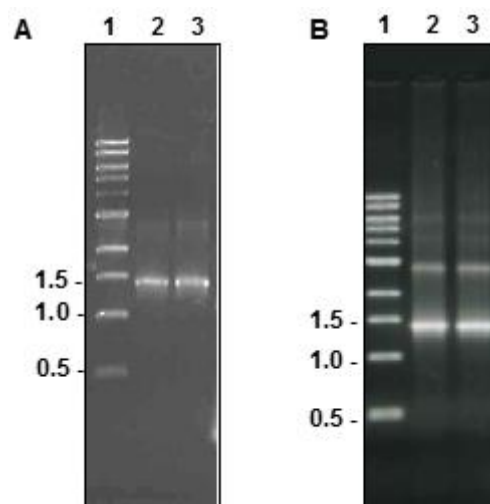


Figura 20. Amplificación y purificación del casete de resistencia a kanamicina. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Se observa: (A) La amplificación del casete de kanamicina a partir del plásmido pKD13. Carriles: 1: Marcador molecular en kb. 2 y 3: Amplificación del casete de kanamicina por duplicado (el tamaño esperado es de 1.4 kb) (B) Purificación de los productos de PCR por "Gel Extraction". Carriles: 1: Marcador molecular en kb. 2 y 3: Resultado de la purificación de los productos de PCR por duplicado.

Además, se purificó el plásmido pKD46 que expresa la recombinasa Red del fago lambda que se encuentra bajo el control del promotor pBAD (Figura 21), y se electroporó en una cepa de EPEC silvestre. A partir de las células transformadas con pKD46 se hicieron nuevas células electrocompetentes, el cultivo de las células se indujo con arabinosa, en estas células se

electroporó el casete de kanamicina y se sembraron en cajas de LB con estreptomicina 50 µg/mL y kanamicina 100 µg/mL y se crecieron a 37 °C para favorecer la pérdida del vector pKD46 que es termosensible. Las mutantes generadas mediante recombinación homóloga se seleccionaron por su resistencia a kanamicina y por su sensibilidad a ampicilina, además de verificarse la correcta inserción del casete por PCR.

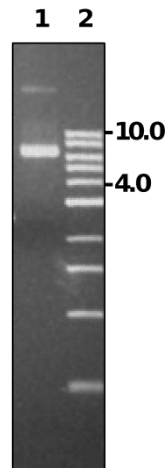


Figura 21. Purificación del plásmido pKD46 (6.3 kb) a partir de la cepa XL1-blue analizada por electroforesis en gel de agarosa 1%.

6.2.1.- Comprobación de la mutante del gen *escJ*

Para corroborar la inserción del casete de kanamicina en el gen *escJ* se llevó a cabo una amplificación por PCR con oligonucleótidos internos del casete, así como con un oligonucleótido interno del casete y uno del gen aledaño a *escJ* tanto río arriba como río abajo (*escJ* y *sepD*, respectivamente) (Figura 22 y Figura 23)

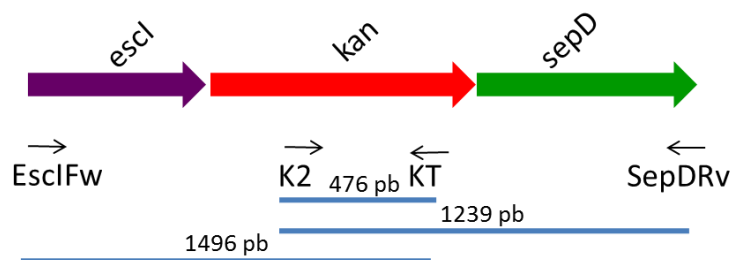


Figura 22. Esquema de las amplificaciones con tamaños estimados para corroborar la correcta inserción del casete de resistencia a kanamicina.

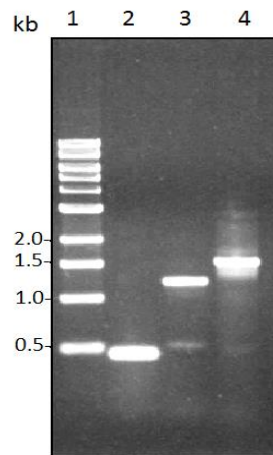


Figura 23. Comprobación por amplificación a través de oligonucleótidos internos y de genes aledaños a *escJ*. Carriles: 1: Marcador (NEB) en kb. 2: Amplificación de fracción del casete de kanamicina (472 pb). 3: Amplificación del fragmento del casete de kanamicina y el gen *sepD* (1239 pb). 4: Amplificación del fragmento del casete de kanamicina y el gen *escI* (1496 pb).

6.2.2.- Subclonación de *escJ* en el vector *pTrc99AFF4*

Para poder complementar el fenotipo de la mutante en *escJ* se subclonó el gen en el vector de alto número de copias *pTrc99AFF4* a partir de la construcción *pEEescJ* misma que se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* (Figura 24). El producto de la digestión y el vector se ligaron, la reacción de ligación se transformó en células *E. coli* Top10, se obtuvieron clones positivas y a la construcción resultante se le denominó *pFTescJ*.

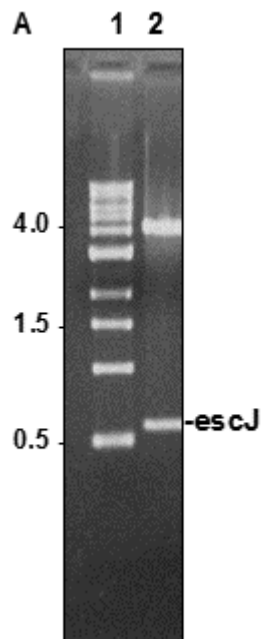


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa 1% Ensayo de doble restricción enzimática NdeI y BamHI de las clonas resultantes de la ligación de *escJ* en el vector pTrc99AFF4. Carriles: 1: Marcador de tamaño molecular. 2: Producto de doble digestión, se observa el fragmento correspondiente a *escJ* (573pb) y el vector pTrc99AFF4 (4,176pb).

6.2.3.- Fenotipo y complementación de la mutante $\Delta escJ$

Se realizaron ensayos de secreción para observar el fenotipo de la mutante generada. La Figura 25 muestra el fenotipo de la mutante de delección del gen *escJ* y se observa que se abate la secreción de efectores y de translocadores. Adicionalmente, se complementó la mutante nula $\Delta escJ$ con construcciones que permiten producir a la proteína EscJ sin etiquetas (pTrc99AFF4/*escJ* o pFTescJ) y en su versión recombinante con una etiqueta de diez histidinas en el extremo N-terminal (pET19b/*escJ* o pEEescJ). En un gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie se observa que las construcciones que codifican para EscJ y His-EscJ restablecen de forma parcial el fenotipo de la cepa mutante. Sin embargo, es posible notar un cambio en la complementación al utilizar la construcción pFTescJ (pTrc99AFF4), ya que se presenta cierto grado de lisis. Con estos ensayos se pudo observar el restablecimiento de la secreción de efectores y translocadores. Esto indica que la inserción del casete en la mutante generada no tiene un efecto polar hacia los genes río abajo del operón.

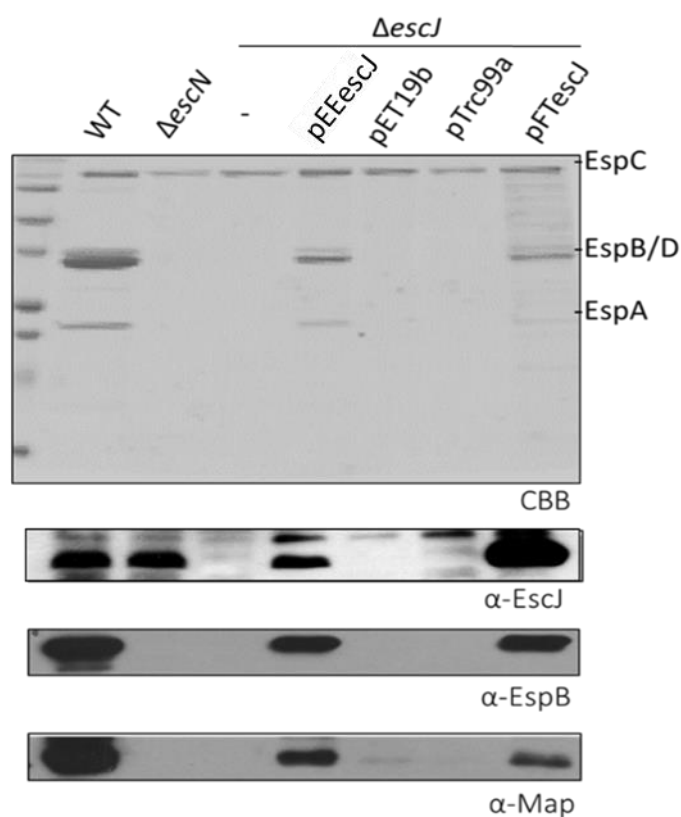


Figura 25. Fenotipo y ensayo de complementación de la mutante $\Delta escJ$. Las proteínas del sobrenadante de las cepas de EPEC silvestre (WT), una mutante de la ATPasa ($\Delta escN$), la mutante $\Delta escJ$ (-), la mutante $\Delta escJ$ transformada con la construcción que expresa a His-EscJ (pEEescJ), con vector vacío pET19b, con el vector vacío pTrc99A y con la construcción que expresa a EscJ sin etiqueta (pFTescJ). En el panel inferior se muestra la producción de EscJ mediante inmunodetección en la pastilla celular. Se muestra también la presencia en el sobrenadante de estas mismas cepas del translocador EspB y del efector Map mediante inmunodetección.

Para el análisis de la producción de EscJ se hizo una prueba de inmunodetección a muestras de la pastilla celular, se observó que es posible reconocer la producción de EscJ tanto en la pastilla de la cepa silvestre como en la de la mutante sin ATPasa. También se demuestra la producción de la proteína con las dos construcciones que se utilizaron para complementar, sin embargo, en la complementación con la construcción pFTescJ (pTrc99A/escJ) se observa mayor producción, posiblemente debido a que el promotor Trc es bastante más fuerte que el promotor T7 del vector pET19b en las cepas de EPEC.

6.3.1.- CAPÍTULO 3. Disección molecular de la proteína SepD

6.3.2.- Interacción entre las proteínas His-SepL-SepD

Datos previamente publicados (Younis et al. 2010; O'Connell et al. 2004; Deng et al. 2005) así como otros obtenidos en el laboratorio (Díaz, M., no publicado) muestran que las proteínas SepL y SepD, reguladoras de la jerarquía de secreción, interactúan entre sí de manera directa. Esta interacción se corroboró en el presente trabajo por ensayos de interacción tipo *pull-down* (Figura 26). A pesar de que estas dos proteínas son fundamentales para el funcionamiento apropiado del sistema, no se ha descrito qué regiones de las mismas se encuentran involucradas en esta interacción. En esta sección se explora qué regiones de SepD son necesarias para la interacción con SepL.

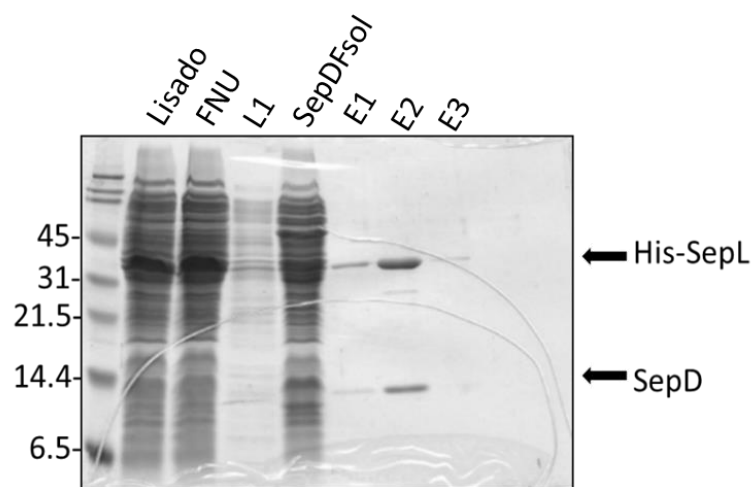


Figura 26. Análisis del ensayo de copurificación tipo pull-down de las proteínas His-SepL y SepD. Carriles: 1: Marcador de masa molecular en kDa, 2: Lisado celular completo, 3: Fracción no unida a la resina de níquel, L1: Lavado con 20 mM de imidazol, SepDFsol: Fracción soluble de la proteína SepD no unida a la resina. E1, 2 y 3, eluciones de las proteínas con 100 mM, 200 mM Y 300 mM de imidazol, respectivamente.

Se decidió dividir a la proteína SepD en 3 regiones distintas: el amino terminal (del aminoácido 1 al 111, versión a la que se le denominó SepD₁₋₁₁₁), el carboxilo terminal (del aminoácido 41 al 151, SepD₄₁₋₁₅₁) y la región central (del aminoácido 41 al 111, SepD₄₁₋₁₁₁). Para esto, se

diseñaron oligonucleótidos (tabla 4) para amplificar estas regiones mediante PCR y los fragmentos resultantes de cada una de las regiones se muestran en la Figura 27.

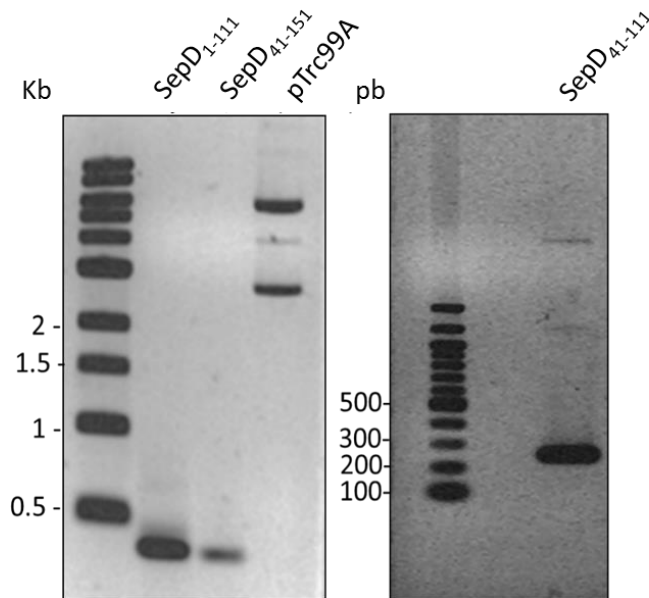


Figura 27. Amplificación por PCR de los fragmentos de sepD. Se muestran las regiones amplificadas del gen *sepD*, correspondientes al amino y carboxilo de SepD, purificadas para su posterior ligación en el vector de alto número de copias pTrc99AFF4. En el gel contiguo se observa la amplificación de la región central. El tamaño de los fragmentos SepD₁₋₁₁₁ y SepD₄₁₋₁₅₁ es de 333 pb y el de SepD₄₁₋₁₁₁ es de 213 pb.

6.3.3.- Producción de las versiones truncas de SepD

Una vez amplificados, los productos de PCR se clonaron en el vector pTrc99AFF4 como fragmentos NdeI-BamHI y se secuenciaron. Una vez que se obtuvieron estas construcciones, se transformaron en células BDP para hacer ensayos de inducción de las regiones de SepD. Como se muestra en la Figura 28, la proteína SepD y los fragmentos SepD₁₋₁₁₁ y SepD₄₁₋₁₅₁ se expresaron eficientemente migrando a su masa molecular esperada. En cambio, la región central no pudo ser sobreexpresada posiblemente porque esta versión de la proteína no sea estable.

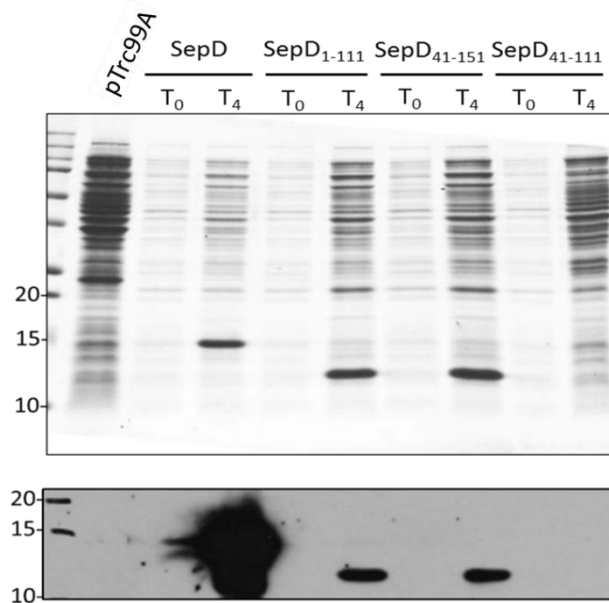


Figura 28. Sobreexpresión de SepD completa y versiones truncas de la proteína. Perfil de producción de proteínas en la cepa BL21(DE3) pLysS transformada con el vector vacío pTrc99A (pTrc99A), y la misma cepa bacteriana transformada con el vector que expresa a la proteína SepD (17.5 kDa) y sus versiones truncas SepD₁₋₁₁₁ (12.9 kDa), SepD₄₁₋₁₅₁ (13.1 kDa) y SepD₄₁₋₁₁₁ (8.46 kDa). En el panel inferior se observa el ensayo de inmunodetección con anticuerpos anti-SepD en el cual es reconocida la sobreproducción SepD y de las versiones SepD₁₋₁₁₁ y SepD₄₁₋₁₅₁.

Por otro lado, para determinar la funcionalidad de las versiones truncas, las construcciones que expresan a las distintas versiones de SepD se transformaron en la cepa mutante de EPEC $\Delta sepD$ para hacer ensayos de secreción. El ensayo mostró que ninguna de las versiones truncas de la proteína SepD es capaz de restaurar el fenotipo de la mutante $\Delta sepD$ (Figura 29).

6.3.4.- Complementación de Δ sepD con las versiones mutantes de SepD

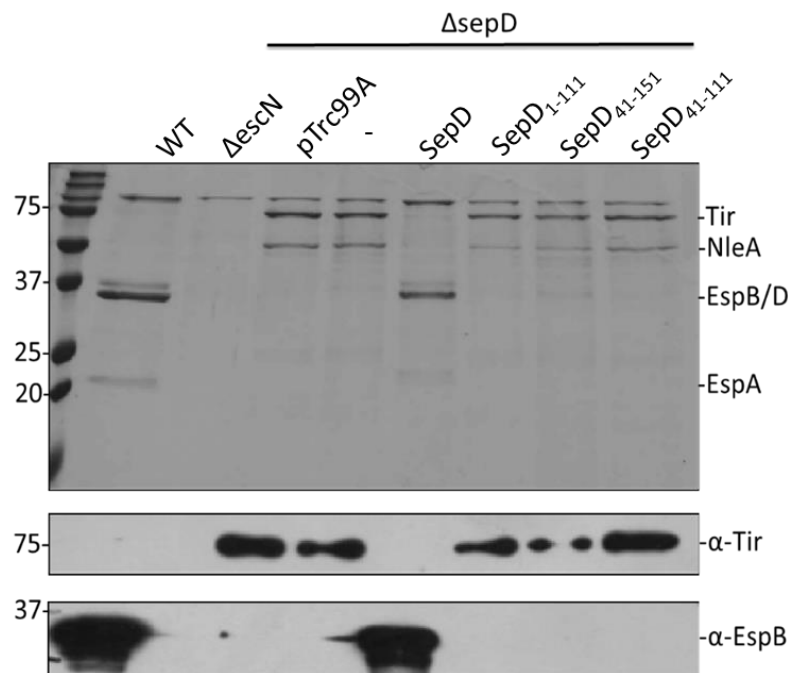


Figura 29. Ensayo de complementación de la mutante Δ sepD. (Panel superior) Las proteínas secretadas por las cepas de EPEC silvestre (WT), Δ escN, Δ sepD (-) y Δ sepD transformada con el vector pTrc99A_FF4 (pTrc), o con las construcciones que expresan a SepD o a sus versiones truncas SepD₁₋₁₁₁, SepD₄₁₋₁₅₁ y SepD₄₁₋₁₁₁ fueron analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. (Panel inferior) Inmunodetección del efector Tir y del translocador EspB en los sobrenadantes de las cepas indicadas.

Un análisis detallado del patrón de secreción muestra que a diferencia de una cepa de EPEC silvestre (WT) donde se detectan mayoritariamente translocadores, en una cepa Δ sepD se secretan principalmente efectores (Figura 29). Este fenotipo de “desregulación” se compensa al expresar a la versión completa de SepD. Sin embargo, ninguna de las versiones truncas de SepD es capaz de restablecer la regulación de sustratos de la mutante *sepD* lo que nos indica que tanto el amino como el carboxilo terminal de SepD son necesarios para la función de este regulador de la secreción.

Posteriormente, para probar la interacción de His-SepL con las versiones truncas de SepD mediante co-purificación se indujo la producción de estas proteínas en cepas de expresión. Posterior a esto, se separó la fracción soluble de la insoluble de cada una de las distintas cepas mediante centrifugación como se describe en materiales y métodos (Figura 30). Encontramos que, a diferencia de la versión silvestre de SepD, las versiones truncas se encuentran principalmente en la fracción insoluble.

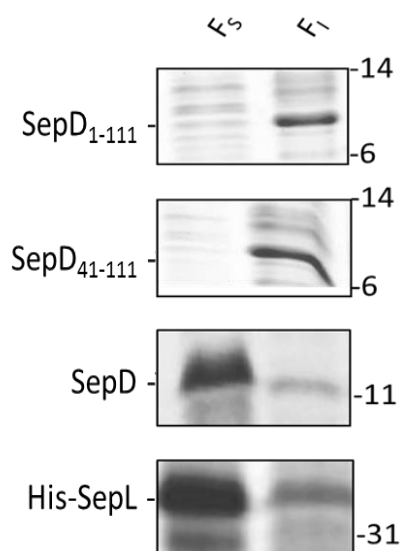


Figura 30. Las versiones truncas de SepD son insolubles. Se muestran la fracción soluble (Fs) e insoluble (FI) de las proteínas SepD completa, de los fragmentos truncos SepD₁₋₁₁₁, SepD₄₁₋₁₅₁ y de la proteína His-SepL. Las distintas muestras se analizaron mediante SDS-PAGE 17% y tinción con azul Coomassie. Las masas moleculares de las proteínas mostradas son SepD: 17.5 kDa, SepD₁₋₁₁₁: 12.9 kDa, SepD₄₁₋₁₅₁: 13.1 kDa y His-SepL: 41.3 kDa. A la izquierda de cada panel se muestra el marcador de masa molecular.

6.3.5.- Ensayos de inmunoréplica de afinidad

El que estas versiones truncas de SepD sean altamente insolubles nos impidió seguir con el protocolo estándar para probar interacción proteína-proteína mediante co-purificación. Por esta razón se buscó un método alternativo que nos permitiera observar la interacción de las versiones truncas de SepD, sin tener que obtener antes la fracción soluble de las mismas. El

ensayo de inmunoréplica de afinidad o “*far western blot*” se presenta entonces como un método ideal para abordar esta pregunta dada su metodología. Para montar este protocolo fue necesaria la purificación de la proteína His-SepL como se menciona en materiales y métodos (Figura 31).

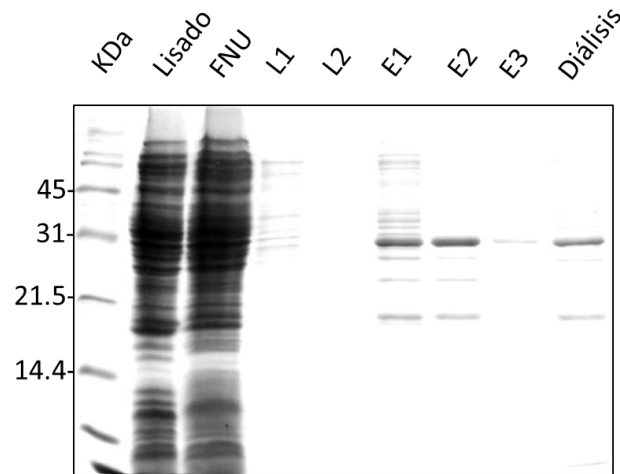


Figura 31. Purificación de la proteína recombinante His-SepL. Se muestran: Lisado: lisado celular completo, FNU: fracción no unida a la resina Ni-NTA. L1: Muestra de lavado con 40 mM de imidazol. L2: Muestra de lavado con 60 mM de imidazol. E1, 2 y 3, Muestras de las tres eluciones, todas con 400 mM de imidazol y por último: Muestra de las eluciones 1 y 2 combinadas y dializadas.

La proteína recombinante His-SepL (con una masa molecular predicha de 41.3 kDa) se purificó en condiciones nativas y se dializó contra un amortiguador con concentraciones decrecientes de imidazol (para eliminar posibles efectos secundarios de este sobre la interacción SepD-SepL) y la muestra se analizó por electroforesis en gel de acrilamida (Figura 31). Aunque con algunas proteínas contaminantes o productos de degradación de menor masa molecular, se logró obtener a la proteína recombinante His-SepL purificada y libre de imidazol. La proteína His-SepL se cuantificó mediante el método de Bradford.

Posteriormente, un lisado bacteriano de células BDP sobreexpresando a las proteínas SepD o a sus versiones truncas SepD₁₋₁₁₁, SepD₄₁₋₁₅₁, SepD₄₁₋₁₁₁ junto con una muestra de lisado bacteriano de células BDP transformadas con el vector pTrc99AaFF4 vacío, el cual se usó como control negativo de interacción, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. A continuación, se incubó a esta membrana con 6 µg/mL de proteína His-SepL purificada y dializada como proteína flotante.

Una vez hecho esto, la membrana se incubó con anticuerpos policlonales anti-SepL y se reveló. Como se muestra en la Figura 32, usando los anticuerpos anti-SepL se detecta una banda en el patrón de migración esperado para SepD (17.5 kDa, ver Figura 32 indicado con un asterisco rojo). Esta banda no se reconoce en el carril del control negativo. Esto nos indica que la interacción de SepD con SepL puede identificarse usando esta metodología. Sin embargo, en los carriles correspondientes a las versiones truncas de SepD no se distingue algún indicio de señal de interacción con His-SepL, al menos bajo las condiciones utilizadas. Lo anterior se debe a que las versiones truncas de SepD migran cerca del frente oscuro inespecífico al final de la membrana (Figura 32).

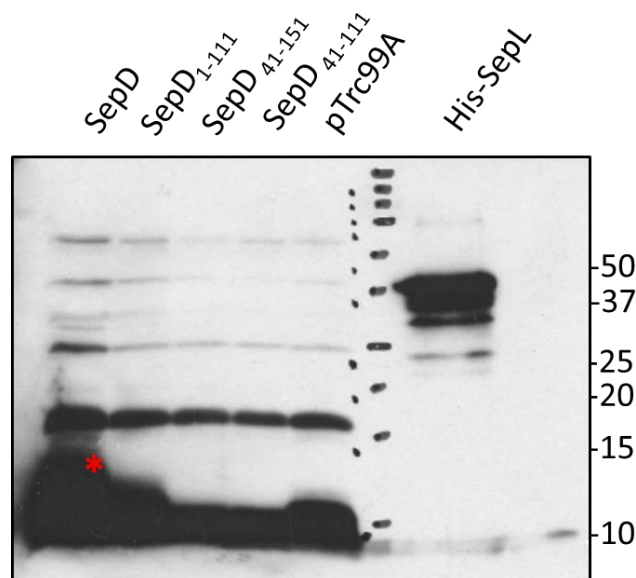


Figura 32. Interacción entre SepL y las versiones mutantes de SepD mediante inmunoréplica. Un lisado bacteriano sobre-expresando a la proteína SepD completa (SepD) y a sus versiones trucas (SepD₁₋₁₁₁, SepD₄₁₋₁₅₁ y SepD₄₁₋₁₁₁); además de un lisado de la cepa de expresión transformada con el vector pTrc99AFF4 como control negativo se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Como control positivo de reconocimiento por parte de los anticuerpos, una muestra de His-SepL purificada fue también transferida. Posteriormente se se incubó la membrana transferida con anticuerpos anti-SepL. El asterisco marcado en color rojo representa el reconocimiento de la interacción His-SepL-SepD.

Se trató de reducir la señal del fondo de la membrana limpiando los anticuerpos anti-SepL por inmunoabsorción incubándolos con un lisado de la cepa mutante en *sepL* (ver materiales y métodos), antes de utilizarlos sobre la membrana donde se transfirió a la proteína SepD y a sus versiones trucas. Como se observa en la Figura 33, a pesar de haber reducido el reconocimiento de la mayoría de bandas inespecíficas en la parte superior de la membrana, la mancha inespecífica en el fondo del gel sigue apareciendo (Figura 33).

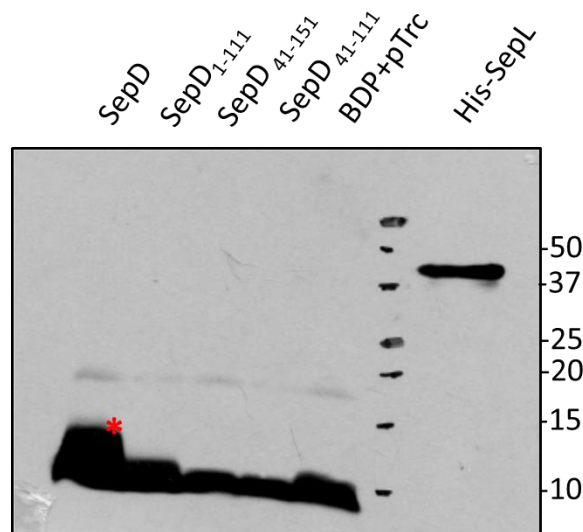


Figura 33. Ensayo de inmunoréplica con anticuerpos anti-SepL inmunoadsorbidos. Inmunodetección con anticuerpos anti-SepL limpiados por inmunoabsorción sobre un fondo con la proteína SepD completa (SepD), y sus versiones trucas SepD región amino terminal (SepD₁₋₁₁₁), SepD región carboxilo terminal (SepD₄₁₋₁₅₁) y SepD región central (SepD₄₁₋₁₁₁); además la cepa de expresión, BDP (DE3) pLysS transformada con el vector pTrc99AFF4 como control negativo (BDP) y como control positivo de reconocimiento por parte de los anticuerpos, una muestra del lisado completo de His-SepL sobreexpresada (His-SepL). El asterisco marcado en color rojo representa el reconocimiento de la interacción His-SepL-SepD.

Para solucionar el problema de la inespecificidad de los anticuerpos anti-SepL, se utilizó una versión de SepL fusionada a tres epítopes de FLAG en el C-terminal, que se puede inmunodetectar con anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Se decidió realizar con esta versión

de SepL un nuevo ensayo de inmunoréplica, para lo cual se determinó la funcionalidad y solubilidad de SepL-FLAG. Primeramente, se comprobó la capacidad de esta versión de restaurar el perfil de secreción de la cepa “desregulada” *sepL*. Para esto comparamos el perfil de secreción de la cepa de EPEC silvestre (WT), con el de la cepa $\Delta sepL$ y con el de la cepa $\Delta sepL$ transformada con la construcción que expresa SepL-FLAG. En la Figura 34 se observa como a diferencia de EPEC silvestre, la mutante *sepL* exhibe una hipersecreción de efectores mientras que la secreción de translocadores se ve suprimida. De manera interesante, la cepa complementada de la mutante *sepL* con la versión SepL-FLAG, recupera el control sobre la secreción de efectores, pero no sobre la de translocadores llevando a una restauración parcial del perfil de secreción típico de EPEC.

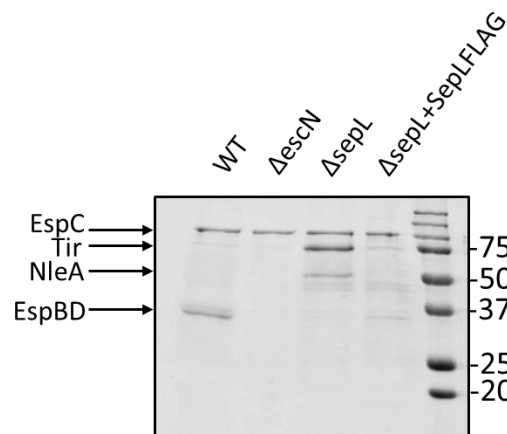


Figura 34. Ensayo de complementación de la cepa EPEC mutante en *sepL* con la construcción SepL-FLAG. (A) Perfiles de secreción de las cepas EPEC silvestre (WT), mutante en la ATPasa ($\Delta escN$), mutante en SepL ($\Delta sepL$) y cepa mutante en SepL transformada con SepL-FLAG.

Posteriormente para seguir con el ensayo de inmunoréplica de afinidad, la proteína SepL-FLAG se sobreprodujo induciendo con 5% (v/v) de arabinosa, y posteriormente se separó la fracción soluble de la insoluble. Tal como se observa en la Figura 35 la mayor parte de la proteína recombinante sobreproducida se encuentra en la fracción soluble.

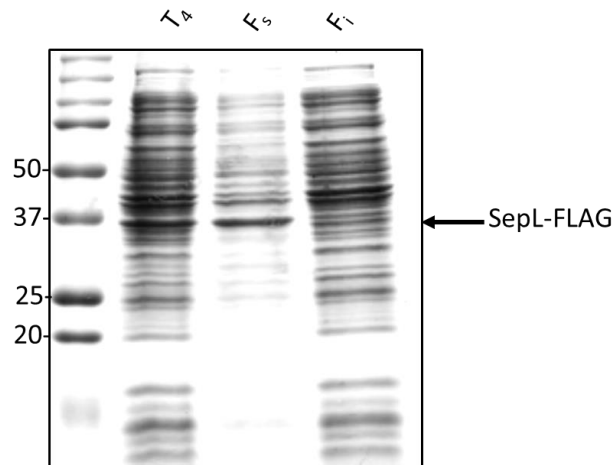


Figura 35. Sobreexpresión de la proteína recombinante SepL-FLAG. Se observa a la izquierda el marcador de masa molecular, en la muestra del carril T₄ la muestra correspondiente al tiempo 4 de la sobreproducción de la proteína recombinante SepL-FLAG (T₄), la muestra de la fracción soluble del lisado celular (F₅) donde es posible observar que se encuentra la mayor parte de la proteína SepL-FLAG y por último se encuentra la fracción insoluble del lisado celular (F₁).

Hasta el momento los resultados no han sido más favorables que los anteriores con la versión His-SepL al no conseguir encontrar las condiciones óptimas donde la interacción con alguna de las versiones mutantes se pueda comprobar.

7.-DISCUSIÓN

Hoy en día la diarrea continúa siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial más frecuente en niños menores de 5 años, con aproximadamente 1.3 millones de muertes al año (Bhutta y Das 2013). Dada su alta prevalencia y al ser causante de diarrea persistente, EPEC es uno de los patógenos infantiles más importantes a nivel mundial (Ochoa y Contreras 2011).

EPEC es considerado un patógeno no invasivo cuya virulencia es dependiente de un SST3 a través del cual inyecta diversas proteínas efectoras a la célula hospedera para alterar sus funciones celulares normales (Ochoa y Contreras 2011). Esta estrategia de inyección de proteínas es usada por varios patógenos para modificar en su beneficio las funciones de la célula infectada (Hayward et al. 2006). En este sentido, la emergencia de numerosos patógenos bacterianos con nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos ha encendido alarmas globales (van Hoek et al. 2011). Además de EPEC, otras bacterias Gram-negativas que infectan a humanos como *Salmonella* (Agbor y McCormick 2011), *Shigella* (Schroeder y Hilbi 2008), *Yersinia* (Atkinson y Williams 2016) y *Chlamydia* (Betts-Hampikian y Fields 2010) usan un SST3 como estrategia de invasión. Debido a esto, es de suma importancia entender la biogénesis y funcionamiento de este complejo sistema de secreción.

La secreción de efectores por EPEC sucede una vez ensamblado el SST3, para lo cual se requieren diversas proteínas. En el presente trabajo se generaron herramientas bioquímicas y moleculares para el estudio de diferentes proteínas con diversas funciones: Map, un efector translocado a la célula hospedera, EscJ un componente estructural y SepD un regulador de la jerarquía de secreción de proteínas.

7.1.- Generación de anticuerpos anti-Map

Map es una proteína efectora asociada a mitocondria, que además de favorecer malformaciones mitocondriales, induce la formación de extensiones tipo filopodio y contribuye en la disrupción de la función de la barrera intestinal, proceso que está asociado con la diarrea (Simpson et al. 2006). Además de esto, el efector Map contribuye al proceso de esfacelamiento de las microvellosidades intestinales al actuar en conjunto con los efectores Tir y EspF (Dean et al. 2006).

La inmunodetección puede ser utilizada para determinar distintas características del antígeno, como la abundancia relativa o la asociación con otros antígenos en ensayos de inmunoprecipitación e inmunoréplica de afinidad. La inmunodetección es un método robusto, relativamente simple y bastante sensible. Debido a esto, la generación de anticuerpos ha sido una herramienta sumamente valiosa en el trabajo de investigación en el laboratorio. Antes de la realización de esta parte de mi proyecto en el laboratorio sólo se contaba con anticuerpos policlonales contra dos efectores (EspF y Tir). La generación de los anticuerpos policlonales anti-Map permitió ampliar el catálogo de anticuerpos disponibles para estudiar el funcionamiento del inyectisoma de EPEC. Esto es sumamente importante pues nos permitió corroborar que las cepas mutantes en reguladores de la secreción (p.e. *ΔsepL*, *ΔsepD*, *ΔescP*) hipersecretan a este efector.

La proteína recombinante His-Map resultó ser sumamente insoluble (Figura 12). A pesar de esto se logró purificar siguiendo un protocolo de purificación mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes (Figura 13). Se obtuvo a la proteína His-Map pura,

misma que fue renaturalizada mediante un proceso de diálisis (Figura 14) con el objetivo de eliminar o reducir la concentración del agente caotrópico para así poder utilizarla en la generación de anticuerpos policlonales anti-Map.

Una vez obtenidos, pudimos probar que los anticuerpos anti-Map son capaces de reconocer tanto a la proteína Map como a la versión con etiqueta His-Map cuando éstas fueron sobreexpresadas en una cepa de expresión. Para analizar si los anticuerpos anti-Map podían reconocer al efector en ensayos de secreción de proteínas a través del inyectisoma, se hizo la inmunodetección de Map en EPEC, tanto en los sobrenadantes como en la pastilla celular. Los anti-Map reconocieron exitosamente una banda en la masa molecular esperada en el sobrenadante de EPEC silvestre, mientras que en el sobrenadante de la mutante $\Delta escN$, cepa usada como control negativo de secreción, no se reconoció ninguna banda. Este resultado nos habla de la especificidad de los anticuerpos generados. También usando estos anticuerpos se pudo confirmar que Map es un efector que se hipersecreta en las cepas $\Delta sepL$ y $\Delta escP$ (O'Connell et al. 2004; Monjarás Feria et al. 2012). En contraste, no fue posible detectar de manera inequívoca la presencia de la proteína dentro de la bacteria usando los anticuerpos anti-Map generados. Es posible que la cantidad de Map intracelular no sea suficiente para obtener señal detectable mediante inmunodetección. Aunque ya no se exploró en este trabajo, una opción para probar esta hipótesis sería analizar en un fondo mutante $\Delta grIR$ la presencia de Map usando los anticuerpos generados. GrIR es un regulador negativo de los operones y unidades transcripcionales de la isla LEE, por lo tanto, en esta cepa de EPEC mutante hay una mayor producción de proteínas del LEE, incluido Map (Jiménez et al. 2010; Padavannil et al. 2013).

Se probó también si se podía aumentar la sensibilidad de reconocimiento de los anticuerpos al purificar las inmunoglobulinas (Ig's) del suero total. Para esto, las Ig's se precipitaron con sulfato de amonio saturado y posteriormente se probó su capacidad de reconocimiento de la proteína Map. Se encontró que la especificidad de las Ig's purificadas no mostró una diferencia significativa aparente respecto al reconocimiento que presenta el suero completo.

Con estos resultados concluimos que se generaron exitosamente anticuerpos específicos que reconocen al efector Map los cuales servirán para tener una mejor comprensión del proceso de secreción de efectores a través del SST3 de EPEC.

7.2.- Generación de la mutante nula no polar *escJ*

EscJ es una proteína estructural del cuerpo basal del SST3 encargada de formar uno de los anillos concéntricos de membrana interna, se encuentra posicionada hacia la cara periplásmica y anclada a la membrana por un dominio de lipiación en su amino terminal. Si bien se ha visto que homólogos de EscJ en otros SST3 son esenciales para el proceso de secreción (Kimbrough y Miller 2000; Silva-Herzog et al. 2008; Allaoui, Sansonetti, y Parsot 1992) a diferencia de estos homólogos, EscJ no presenta en su N-terminal el cruce transmembranal característico que le permite a esta familia anclarse a la membrana (Gaytán et al. 2016). Para descartar que la pérdida de esta hélice transmembranal cambiara la función de este componente en EPEC decidimos generar la mutante nula $\Delta escJ$ para caracterizar el fenotipo de la misma.

La mutante nula del gen *escJ* se generó mediante recombinación homóloga usando el sistema basado en la recombinasa del fago λ descrito por Datsenko (Datsenko y Wanner 2000). En

nuestro laboratorio este sistema ha resultado eficiente para generar mutantes nulas no polares de genes de la isla LEE de EPEC (Andrade et al. 2007; Romo-Castillo et al. 2014; Soto et al. 2017). Se encontró que la eliminación del gen que codifica para la proteína EscJ en EPEC causa el abatimiento en la secreción tanto de translocadores como de efectores (Figura 25), por lo que es un componente indispensable del SST3.

Río abajo del gen *escJ*, que se encuentra codificado en el operón LEE2 de la isla LEE, se localizan genes esenciales para el correcto ensamblado del inyectisoma de EPEC (el regulador de la jerarquía de secreción *sepD* y la secretina *escC*) por lo que se corría el riesgo de tener un efecto polar sobre estos genes y afectar el funcionamiento del SST3 al eliminar a *escJ* mediante este método. Sin embargo, se logró demostrar también que el fenotipo de no secreción de la mutante $\Delta escJ$ se debe sólo a la falta de la proteína EscJ y no a un efecto polar causado por la inserción del casete de resistencia, ya que al expresar *in trans* a *escJ* en esta mutante se restaura la secreción de proteínas a través del inyectisoma (Figura 25). También es importante mencionar que la ausencia de EscJ no altera los niveles intracelulares de sustratos lo que indicaría que EscJ no se encuentra involucrado ni en la producción ni en la estabilidad de éstos. En su conjunto, los resultados obtenidos de esta caracterización funcional indican que EscJ es un componente estructural del inyectisoma de EPEC esencial para la secreción de sustratos en esta bacteria.

Por otro lado, es necesario mencionar que cuando se expresó a *escJ* desde un vector de alto número de copias como lo es pTrc99AFF4, observamos numerosas bandas de proteínas en la muestra del sobrenadante (Figura 25). Es probable que este fenómeno se deba a que la proteína EscJ está en el periplasma asociada a la membrana interna, por lo que al

sobreexpresarla posiblemente se vea comprometida la integridad membranal en alguna parte de la población bacteriana, o bien se desencadene una respuesta de estrés en el periplasma que pueda conllevar a lisis bacteriana. Tomando todos estos resultados en conjunto se concluyó que la proteína EscJ es esencial para el correcto ensamblaje del sistema de secreción tipo III y por lo tanto para la translocación de proteínas de virulencia y para la patogenicidad de EPEC. Esto concuerda con lo reportado previamente para *C. rodentium* donde identificaron que la ausencia de EscJ en este patógeno murino evita el correcto funcionamiento del inyectisoma previniendo la infección en ratón (Wanyin Deng et al. 2004).

7.3.- Disección molecular del regulador de la secreción SepD

En los SST3 de virulencia existen complejos proteicos capaces de regular la jerarquía de secreción entre translocadores y efectores. Tal es el caso del segundo interruptor molecular, conformado en EPEC por las proteínas SepD, SepL y CesL. En EPEC, la delección de los genes *sepD* y *sepL* tiene como consecuencia la desregulación de la jerarquía de secreción, presentando un fenotipo de abatimiento de la secreción de translocadores e hipersecreción de efectores (W. Deng et al. 2005). Este segundo interruptor molecular evita la salida prematura de efectores hasta que se ensambla el poro de translocación; de esta manera se controla que los efectores sean transportados directamente hacia el citosol de la célula hospedera.

Para el estudio del SST3 de diversos patógenos se han logrado identificar y caracterizar diversas interacciones proteína-proteína mediante diferentes métodos experimentales como ensayos de copurificación por cromatografía de afinidad, ensayos de doble híbrido en levadura o inmunoprecipitación.

Para el caso de EPEC, se sabe que SepL y SepD forman un complejo estable (O'Connell et al. 2004; W. Deng et al. 2005), sin embargo, la región de interacción entre estas dos proteínas no ha sido explorada anteriormente. El conocer estas regiones de interacción nos permitirá obtener información estructural acerca del complejo SepD/SepL para entender cómo lleva a cabo su función reguladora. Para abordar esta pregunta, en el presente trabajo se hicieron deleciones secuenciales de la proteína SepD. La estrategia a seguir fue la deleción de los primeros 40 aminoácidos de la región amino terminal, los últimos 40 aminoácidos del carboxilo terminal y una última versión donde se eliminaron ambos extremos dejando únicamente la región central de SepD. Un alineamiento entre SepD e YscB de *Yersinia pestis* (el homólogo de SepD mejor caracterizado (Day y Plano 1998; Schubot et al. 2005) revela que existen sitios conservados entre estas dos proteínas a lo largo de todo el alineamiento. Por lo tanto, esta primera aproximación de dividir a la proteína en 3 segmentos nos permitiría explorar a grandes rasgos las posibles zonas de interacción con SepL mediante ensayos de copurificación tipo "pull-down" entre estas dos proteínas.

Una vez generadas las construcciones que codifican para las tres distintas versiones de SepD, éstas se transformaron en una cepa de expresión. Mientras que las primeras dos versiones se pudieron sobreexpresar exitosamente, la tercera versión no pudo ser sobreproducida. Esto sugiere que posiblemente esta versión de la proteína SepD, carente del N-terminal y C-terminal no es estable.

Cuando las versiones SepD N-terminal y SepD C-terminal se sobreprodujeron en cepas bacterianas de expresión, se encontró que ambas fueron sumamente insolubles

impidiéndonos continuar con nuestro protocolo de rutina de co-purificación con SepL. Por esta razón se decidió probar un método de interacción proteína-proteína que no requiriera la obtención de las versiones de SepD de forma soluble.

Un método ampliamente usado para la caracterización de interacciones proteína-proteína de maquinarias bacterianas es el llamado ensayo de inmunoréplica, mejor conocido como “Far Western”. Este ensayo se basa en el reconocimiento de una proteína “presa” previamente inmovilizada en una membrana, por parte de una proteína “cañada” flotante previamente purificada. Cuando la proteína “cañada” reconoce a la proteína presa se puede detectar el patrón de reconocimiento mediante inmunodetección usando un anticuerpo contra la proteína “cañada”. En nuestro caso se esperaba observar la interacción entre la proteína His-SepL y la proteína SepD, interacción que se ha descrito con anterioridad por nuestro equipo de trabajo y en reportes previos. En esta técnica, las proteínas del lisado celular completo se separan por electroforesis y transfieren a una membrana de nitrocelulosa, se utilizaron los lisados de la sobreexpresión de SepD que habría de servir como control positivo de interacción con His-SepL y las versiones SepD N-terminal y SepD C-terminal. Es importante mencionar que al usar los lisados completos no fue necesaria la solubilización de dichos fragmentos.

Mediante el ensayo de inmunoréplica usando anticuerpos policlonales anti-SepL pudimos detectar una banda que posiblemente corresponda a la interacción SepD/SepL al reconocer una banda cercana a la banda del marcador correspondiente a 15 KDa, banda cercana a la cual es posible observar a la proteína SepD sobreexpresada (Figura 22). Sin embargo, en el análisis de inmunoreconocimiento se observó gran inespecificidad de estos anticuerpos. Para

tratar de obtener una mayor especificidad, se llevó a cabo un protocolo de inmunoadsorción para tratar de reducir el reconocimiento de bandas inespecíficas. A pesar de que en cierta medida se logró reducir el número de bandas inespecíficas reconocidas por el anti-SepL se continuó observando una “mancha de reconocimiento” en la parte inferior de la membrana (Figura 23). Esta mancha inespecífica posiblemente es el reconocimiento del anticuerpo a las proteínas del frente del gel. Lamentablemente dicha inespecificidad se presenta en la masa molecular esperada para las versiones truncas de la proteína SepD, por lo que fue imposible reconocer alguna interacción.

Para probar si el uso de un anticuerpo monoclonal comercial permitía obtener una mayor especificidad en la inmunodetección se decidió usar una versión recombinante de SepL marcada con 3 epítopes FLAG en el C-terminal. Este experimento está en proceso y pronto se resolverá esta pregunta.

Es posible que las versiones truncas de la proteína SepD no hayan readquirido su conformación nativa en el ensayo de inmunoréplica, lo que probablemente impida que interactúen con la proteína SepL. Sin embargo, la interacción se podría analizar por otros métodos como co-inmunoprecipitación *in vivo* o ensayos de doble híbrido.

Cabe mencionar que cuando se probó la capacidad de las versiones truncas de SepD para complementar a la cepa mutante $\Delta sepD$, se encontró que ninguna de las versiones truncas restaura la secreción silvestre de EPEC (Figura 29). Aunque no fue posible detectar la expresión de estas versiones truncas en EPEC, de confirmarse este resultado nos indicaría que

tanto el extremo N-terminal como el C-terminal de SepD se requieren para que esta proteína lleve a cabo su función regulatoria.

8.- CONCLUSIONES

8.1.- Generación de anticuerpos anti-Map

- Utilizando técnicas de biología molecular, se subclonó al gen que codifica al efector Map en el vector de expresión bacteriana pTrc99AFF4.
- A pesar de que la proteína recombinante His-Map resultó ser sumamente insoluble, se logró purificar a la proteína en condiciones desnaturalizantes.
- Se lograron obtener anticuerpos policlonales que reconocen de manera específica al efector Map, mismos que serán de gran utilidad para futuros análisis inmunoquímicos.

8.2.- Generación de la mutante nula *escJ*

- Se clonó al gen *escJ* en un vector de expresión
- Se generó en EPEC la mutante nula no polar del gen *escJ*.
- Se determinó que la proteína EscJ es esencial para la secreción de efectores y translocadores en EPEC

8.3.- Disección molecular de SepD

- Se generaron 3 versiones truncas del componente del segundo interruptor molecular, SepD.
- Se lograron sobreexpresar las versiones truncas SepD₁₋₁₁₁ y SepD₄₁₋₁₅₁, correspondientes a la región amino y carboxilo, respectivamente.
- Hasta el momento no se ha logrado encontrar el método por el cuál determinar la región de interacción de SepD con SepL.

9.- PERSPECTIVAS

- Escindir el casete de kanamicina de la mutante nula *escJ* para poder generar dobles mutantes en este fondo $\Delta escJ$.
- Explorar metodologías alternas para determinar la región de interacción de SepD con SepL. Una opción sería probar la interacción entre SepL y las distintas versiones de SepD mediante el sistema de doble híbrido en levadura. O etiquetar la proteína flotante con una etiqueta diferente para la cual haya en existencia anticuerpos más específicos.

10.- REFERENCIAS

- Abby, S. S. and E. P. Rocha (2012). "The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems." *PLoS Genet* **8**(9): e1002983.
- Agbor, Terence A., and Beth A. McCormick. 2011. "Salmonella Effectors: Important Players Modulating Host Cell Function during Infection." *Cellular Microbiology* **13** (12): 1858–69.
- Akeda, Y. and J. E. Galan (2005). "Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion." *Nature* **437**(7060): 911-915.
- Akeda, Yukihiro, and Jorge E. Galán. 2005. "Chaperone Release and Unfolding of Substrates in Type III Secretion." *Nature* **437** (7060): 911–15.
- Allaoui, A., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1992. "MxiJ, a Lipoprotein Involved in Secretion of Shigella Ipa Invasins, Is Homologous to YscJ, a Secretion Factor of the Yersinia Yop Proteins." *Journal of Bacteriology* **174** (23): 7661–69.
- Anantha, R. P., K. D. Stone and M. S. Donnenberg (2000). "Effects of bfp mutations on biogenesis of functional enteropathogenic Escherichia coli type IV pili." *J Bacteriol* **182**(9): 2498-2506.
- Andrade, Angel, Juan Pablo Pardo, Norma Espinosa, Gerardo Pérez-Hernández, and Bertha González-Pedrajo. 2007. "Enzymatic Characterization of the Enteropathogenic Escherichia Coli Type III Secretion ATPase EscN." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **468** (1): 121–27.
- Atkinson, Steve, and Paul Williams. 2016. "Yersinia Virulence Factors - a Sophisticated Arsenal for Combating Host Defences." *F1000Research* **5** (June). doi:10.12688/f1000research.8466.1.
- Bergeron, Julien R. 2016a. "Structural Modeling of the Flagellum MS Ring Protein FliF Reveals Similarities to the Type III Secretion System and Sporulation Complex." *PeerJ* **4** (February): e1718.
- Betts-Hampikian, Helen Jennifer, and Kenneth A. Fields. 2010. "The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut." *Frontiers in Microbiology* **1**. doi:10.3389/fmicb.2010.00114.
- Bhutta, Z. A., and J. K. Das. 2013. "Global Burden of Childhood Diarrhea and Pneumonia: What Can and Should Be Done?" *Pediatrics* **131** (4): 634–36.
- Bieber, D., S. W. Ramer, C. Y. Wu, W. J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez and G. K. Schoolnik (1998). "Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic Escherichia coli." *Science* **280**(5372): 2114-2118.
- Biemans-Oldehinkel, E., N. Sal-Man, W. Deng, L. J. Foster and B. B. Finlay (2011). "Quantitative proteomic analysis reveals formation of an EscL-EscQ-EscN type III complex in enteropathogenic Escherichia coli." *J Bacteriol* **193**(19): 5514-5519.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bustamante, V. H., M. I. Villalba, V. A. Garcia-Angulo, A. Vazquez, L. C. Martinez, R. Jimenez and J. L. Puente (2011). "PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic Escherichia coli." *Mol Microbiol* **82**(2): 398-415.
- Buttner, D. (2012). "Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria." *Microbiol Mol Biol Rev* **76**(2): 262-310.

- Clarke, S. C., R. D. Haigh, P. P. Freestone and P. H. Williams (2003). "Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen." *Clin Microbiol Rev* **16**(3): 365-378.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." *Nat Rev Microbiol* **4**(11): 811-825.
- Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6640-6645.
- Day, J. B., and G. V. Plano. 1998a. "A Complex Composed of SycN and YscB Functions as a Specific Chaperone for YopN in *Yersinia Pestis*." *Molecular Microbiology* **30** (4): 777–88.
- Dean, P. and B. Kenny (2009). "The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell." *Curr Opin Microbiol* **12**(1): 101-109.
- Dean, Paul, Marc Maresca, Stephanie Schüller, Alan D. Phillips, and Brendan Kenny. 2006. "Potent Diarrheagenic Mechanism Mediated by the Cooperative Action of Three Enteropathogenic *Escherichia Coli*-Injected Effector Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** (6): 1876–81.
- Deane, J. E., P. Abrusci, S. Johnson and S. M. Lea (2010). "Timing is everything: the regulation of type III secretion." *Cell Mol Life Sci* **67**(7): 1065-1075.
- Deng, W., Y. Li, P. R. Hardwidge, E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, S. Lee, S. Gruenheid, N. C. J. Strynacka, J. L. Puente, and B. B. Finlay. 2005a. "Regulation of Type III Secretion Hierarchy of Translocators and Effectors in Attaching and Effacing Bacterial Pathogens." *Infection and Immunity* **73** (4): 2135–46.
- Deng, W., Y. Li, P. R. Hardwidge, E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, S. Lee, S. Gruenheid, N. C. Strynacka, J. L. Puente and B. B. Finlay (2005). "Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens." *Infect Immun* **73**(4): 2135-2146.
- Deng, Wanyin, José L. Puente, Samantha Gruenheid, Yuling Li, Bruce A. Vallance, Alejandra Vázquez, Jeannette Barba, 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): 3597–3602.
- Diepold, A. and S. Wagner (2014). "Assembly of the bacterial type III secretion machinery." *FEMS Microbiol Rev* **38**(4): 802-822.
- Donnenberg, M. S., C. O. Tacket, S. P. James, G. Losonsky, J. P. Nataro, S. S. Wasserman, J. B. Kaper and M. M. Levine (1993). "Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection." *J Clin Invest* **92**(3): 1412-1417.
- Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel and J. B. Kaper (2000). "The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *Infect Immun* **68**(11): 6115-6126.
- Finlay, B. B., I. Rosenshine, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper (1992). "Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells." *Infect Immun* **60**(6): 2541-2543.
- Frankel, G. and A. D. Phillips (2008). "Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal." *Cell Microbiol* **10**(3): 549-556.
- Garmendia, J., G. Frankel and V. F. Crepin (2005). "Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation." *Infect Immun* **73**(5): 2573-2585.
- Gauthier, A., J. L. Puente and B. B. Finlay (2003). "Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization." *Infect Immun* **71**(6): 3310-3319.

- Gaytán, Meztlli O., Verónica I. Martínez-Santos, Eduardo Soto, and Bertha González-Pedrajo. 2016a. "Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6. doi:10.3389/fcimb.2016.00129.
- Ghosh, P. (2004). "Process of protein transport by the type III secretion system." *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(4): 771-795.
- Goosney, D. L., S. Gruenheid and B. B. Finlay (2000). "Gut feelings: enteropathogenic E. coli (EPEC) interactions with the host." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 173-189.
- Ham, H., A. Sreelatha and K. Orth (2011). "Manipulation of host membranes by bacterial effectors." *Nat Rev Microbiol* **9**(9): 635-646.
- Ham, Hyeilin, Anju Sreelatha, and Kim Orth. 2011. "Manipulation of Host Membranes by Bacterial Effectors." *Nature Reviews. Microbiology* 9 (9): 635-46.
- Hayward, Richard D., John M. Leong, Vassilis Koronakis, and Kenneth G. Campellone. 2006. "Exploiting Pathogenic Escherichia Coli to Model Transmembrane Receptor Signalling." *Nature Reviews. Microbiology* 4 (5): 358-70.
- Hicks, Stuart W., and Jorge E. Galán. 2013. "Exploitation of Eukaryotic Subcellular Targeting Mechanisms by Bacterial Effectors." *Nature Reviews. Microbiology* 11 (5): 316-26.
- Hoek, Angela H. A. M. van, Dik Mevius, Beatriz Guerra, Peter Mullany, Adam Paul Roberts, and Henk J. M. Aarts. 2011. "Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview." *Frontiers in Microbiology* 2 (September): 203.
- Hu, Bo, Maria Lara-Tejero, Qingke Kong, Jorge E. Galán, and Jun Liu. 2017. "In Situ Molecular Architecture of the Salmonella Type III Secretion Machine." *Cell* 168 (6): 1065-74.e10.
- Iizumi, Y., H. Sagara, Y. Kabe, M. Azuma, K. Kume, M. Ogawa, T. Nagai, P. G. Gillespie, C. Sasakawa and H. Handa (2007). "The enteropathogenic E. coli effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function." *Cell Host Microbe* **2**(6): 383-392.
- Jarvis, K. G., J. A. Giron, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper (1995). "Enteropathogenic Escherichia coli contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7996-8000.
- Jepson, M. A., S. Pellegrin, L. Peto, D. N. Banbury, A. D. Leard, H. Mellor and B. Kenny (2003). "Synergistic roles for the Map and Tir effector molecules in mediating uptake of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) into non-phagocytic cells." *Cell Microbiol* **5**(11): 773-783.
- Jimenez, R., S. B. Cruz-Migoni, A. Huerta-Saquero, V. H. Bustamante and J. L. Puente (2010). "Molecular characterization of GrlA, a specific positive regulator of ler expression in enteropathogenic Escherichia coli." *J Bacteriol* **192**(18): 4627-4642.
- Kalman, D., O. D. Weiner, D. L. Goosney, J. W. Sedat, B. B. Finlay, A. Abo and J. M. Bishop (1999). "Enteropathogenic E. coli acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals." *Nat Cell Biol* **1**(6): 389-391.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro and H. L. Mobley (2004). "Pathogenic Escherichia coli." *Nat Rev Microbiol* **2**(2): 123-140.
- Kenny, B. (1999). "Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications." *Mol Microbiol* **31**(4): 1229-1241.
- Kenny, B. and M. Jepson (2000). "Targeting of an enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) effector protein to host mitochondria." *Cell Microbiol* **2**(6): 579-590.
- Kenny, Brendan, Sarah Ellis, Alan D. Leard, Jonathan Warawa, Harry Mellor, and Mark A. Jepson. 2002. "Co-Ordinate Regulation of Distinct Host Cell Signalling Pathways by Multifunctional

- Enteropathogenic Escherichia Coli Effector Molecules." *Molecular Microbiology* 44 (4): 1095–1107.
- Kimbrough, T. G., and S. I. Miller. 2000. "Contribution of Salmonella Typhimurium Type III Secretion Components to Needle Complex Formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (20): 11008–13.
- Knutton, S., I. Rosenshine, M. J. Pallen, I. Nisan, B. C. Neves, C. Bain, C. Wolff, G. Dougan and G. Frankel (1998). "A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic Escherichia coli involved in protein translocation into epithelial cells." *Embo J* 17(8): 2166-2176.
- Levine, M. M. and R. Edelman (1984). "Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis." *Epidemiol Rev* 6: 31-51.
- Levine, M. M., E. J. Bergquist, D. R. Nalin, D. H. Waterman, R. B. Hornick, C. R. Young and S. Sotman (1978). "Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive." *Lancet* 1(8074): 1119-1122.
- Ma, Caixia, Mark E. Wickham, Julian A. Guttman, Wanyin Deng, John Walker, Karen L. Madsen, Kevan Jacobson, Wayne A. Vogl, B. Brett Finlay, and Bruce A. Vallance. 2006. "Citrobacter Rodentium Infection Causes Both Mitochondrial Dysfunction and Intestinal Epithelial Barrier Disruption in Vivo: Role of Mitochondrial Associated Protein (Map)." *Cellular Microbiology* 8 (10): 1669–86.
- McNamara, B. P. and M. S. Donnenberg (1998). "A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic Escherichia coli via the type III export pathway." *FEMS Microbiol Lett* 166(1): 71-78.
- McNamara, B. P., A. Koutsouris, C. B. O'Connell, J. P. Nougayrede, M. S. Donnenberg and G. Hecht (2001). "Translocated EspF protein from enteropathogenic Escherichia coli disrupts host intestinal barrier function." *J Clin Invest* 107(5): 621-629.
- Monjaras Feria, J., E. Garcia-Gomez, N. Espinosa, T. Minamino, K. Namba and B. Gonzalez-Pedrajo (2012). "Role of EscP (Orf16) in injectisome biogenesis and regulation of type III protein secretion in enteropathogenic Escherichia coli." *J Bacteriol* 194(22): 6029-6045.
- O'Connell, Colin B., Elizabeth A. Creasey, Stuart Knutton, Simon Elliott, Lynette J. Crowther, Wensheng Luo, M. John Albert, James B. Kaper, Gad Frankel, and Michael S. Donnenberg. 2004. "SepL, a Protein Required for Enteropathogenic Escherichia Coli Type III Translocation, Interacts with Secretion Component SepD." *Molecular Microbiology* 52 (6): 1613–25.
- Ochoa, Theresa J., and Carmen A. Contreras. 2011. "Enteropathogenic Escherichia Coli Infection in Children." *Current Opinion in Infectious Diseases* 24 (5): 478–83.
- Ogino, T., R. Ohno, K. Sekiya, A. Kuwae, T. Matsuzawa, T. Nonaka, H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi and A. Abe (2006). "Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic Escherichia coli." *J Bacteriol* 188(8): 2801-2811.
- Ohnishi, K., F. Fan, G. J. Schoenhals, M. Kihara and R. M. Macnab (1997). "The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of Salmonella typhimurium: putative components for flagellar assembly." *J Bacteriol* 179(19): 6092-6099.
- Padavannil, Abhilash, Chacko Jobichen, Erez Mills, Adrian Velazquez-Campoy, Mo Li, Ka Yin Leung, Yu Keung Mok, Ilan Rosenshine, and J. Sivaraman. 2013. "Structure of GrlR–GrlA Complex That Prevents GrlA Activation of Virulence Genes." *Nature Communications* 4. doi:10.1038/ncomms3546.
- Papatheodorou, Panagiotis, Grazyna Domanska, Marius Oxle, Johannes Mathieu, Olaf Selchow, Brendan Kenny, and Joachim Rassow. 2006. "The Enteropathogenic Escherichia Coli (EPEC) Map Effector Is Imported into the Mitochondrial Matrix by the TOM/Hsp70 System and Alters Organelle Morphology." *Cellular Microbiology* 8 (4): 677–89.

- Romo-Castillo, Mariana, Angel Andrade, Norma Espinosa, Julia Monjarás Feria, Eduardo Soto, Miguel Díaz-Guerrero, and Bertha González-Pedrajo. 2014. "EscO, a Functional and Structural Analog of the Flagellar FliJ Protein, Is a Positive Regulator of EscN ATPase Activity of the Enteropathogenic Escherichia Coli Injectisome." *Journal of Bacteriology* 196 (12): 2227–41.
- Ryu, J. and R. J. Hartin (1990). "Quick transformation in Salmonella typhimurium LT2." *Biotechniques* 8(1): 43-45.
- Sal-Man, N., W. Deng and B. B. Finlay (2012). "EscI: a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic Escherichia coli." *Biochem J* 442(1): 119-125.
- Schmidt, H. and M. Hensel (2004). "Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis." *Clin Microbiol Rev* 17(1): 14-56.
- Schroeder, Gunnar N., and Hubert Hilbi. 2008. "Molecular Pathogenesis of Shigella Spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion." *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1): 134–56.
- Schubot, Florian D., Michael W. Jackson, Kerri J. Penrose, Scott Cherry, Joseph E. Tropea, Gregory V. Plano, and David S. Waugh. 2005. "Three-Dimensional Structure of a Macromolecular Assembly That Regulates Type III Secretion in Yersinia Pestis." *Journal of Molecular Biology* 346 (4): 1147–61.
- Sekiya, K., M. Ohishi, T. Ogino, K. Tamano, C. Sasakawa and A. Abe (2001). "Supermolecular structure of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 11638-11643.
- Shames, S. R., M. A. Croxen, W. Deng and B. B. Finlay (2011). "The type III system-secreted effector EspZ localizes to host mitochondria and interacts with the translocase of inner mitochondrial membrane 17b." *Infect Immun* 79(12): 4784-4790.
- Shames, S. R., W. Deng, J. A. Guttman, C. L. de Hoog, Y. Li, P. R. Hardwidge, H. P. Sham, B. A. Vallance, L. J. Foster and B. B. Finlay (2010). "The pathogenic E. coli type III effector EspZ interacts with host CD98 and facilitates host cell pro-survival signaling." *Cell Microbiol.*
- Silva-Herzog, Eugenia, Franco Ferracci, Michael W. Jackson, Sabrina S. Joseph, and Gregory V. Plano. 2008. "Membrane Localization and Topology of the Yersinia Pestis YscJ Lipoprotein." *Microbiology* 154 (Pt 2): 593–607.
- Simpson, Nandi, Rob Shaw, Valerie F. Crepin, Rosanna Mundy, Anthony J. FitzGerald, Nicola Cummings, Ania Straatman-Iwanowska, Ian Connerton, Stuart Knutton, and Gad Frankel. 2006. "The Enteropathogenic Escherichia Coli Type III Secretion System Effector Map Binds EBP50/NHERF1: Implication for Cell Signalling and Diarrhoea." *Molecular Microbiology* 60 (2): 349–63.
- Soto, Eduardo, Norma Espinosa, Miguel Díaz-Guerrero, Meztli O. Gaytán, José L. Puente, and Bertha González-Pedrajo. 2017. "Functional Characterization of EscK (Orf4), a Sorting Platform Component of the Enteropathogenic Escherichia Coli Injectisome." *Journal of Bacteriology* 199 (1). doi:10.1128/JB.00538-16.
- Spears, K. J., A. J. Roe and D. L. Gally (2006). "A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli pathogenesis." *FEMS Microbiol Lett* 255(2): 187-202.
- Spreter, T., C. K. Yip, S. Sanowar, I. Andre, T. G. Kimbrough, M. Vuckovic, R. A. Pfuetzner, W. Deng, A. C. Yu, B. B. Finlay, D. Baker, S. I. Miller and N. C. Strynadka (2009). "A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system." *Nat Struct Mol Biol* 16(5): 468-476.

- Tomson, F. L., V. K. Viswanathan, K. J. Kanack, R. P. Kanteti, K. V. Straub, M. Menet, J. B. Kaper and G. Hecht (2005). "Enteropathogenic *Escherichia coli* EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier." *Mol Microbiol* **56**(2): 447-464.
- Torres, Alfredo G. 2010. *Pathogenic Escherichia Coli in Latin America*. Bentham Science Publishers.
- Tu, X., I. Nisan, C. Yona, E. Hanski and I. Rosenshine (2003). "EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **47**(3): 595-606.
- Vidal, J. E., A. Canizalez-Roman, J. Gutierrez-Jimenez and F. Navarro-Garcia (2007). "Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*." *Salud Publica Mex* **49**(5): 376-386.
- Yamaguchi, S., H. Fujita, T. Taira, K. Kutsukake, M. Homma and T. Iino (1984). "Genetic analysis of three additional fla genes in *Salmonella typhimurium*." *J Gen Microbiol* **130**(12): 3339-3342.
- Yang, Hongjing, Zhiying Shan, Jaewha Kim, Weihui Wu, Wei Lian, Lin Zeng, Laijun Xing, and Shouguang Jin. 2007. "Regulatory Role of PopN and Its Interacting Partners in Type III Secretion of *Pseudomonas Aeruginosa*." *Journal of Bacteriology* **189** (7): 2599–2609.
- Yerushalmi, G., Y. Litvak, L. Gur-Arie and I. Rosenshine (2014). "Dynamics of expression and maturation of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **196**(15): 2798-2806.
- Yip, C. K., B. B. Finlay and N. C. Strynadka (2005). "Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone." *Nat Struct Mol Biol* **12**(1): 75-81.
- Younis, Rasha, Lewis E. H. Bingle, Sarah Rollauer, Diana Munera, Stephen J. Busby, Steven Johnson, Janet E. Deane, Susan M. Lea, Gad Frankel, and Mark J. Pallen. 2010. "SepL Resembles an Aberrant Effector in Binding to a Class 1 Type III Secretion Chaperone and Carrying an N-Terminal Secretion Signal." *Journal of Bacteriology* **192** (22): 6093–98.
- Yu, Xiu-Jun, Kieran McGourty, Mei Liu, Kate E. Unsworth, and David W. Holden. 2010. "pH Sensing by Intracellular *Salmonella* Induces Effector Translocation." *Science* **328** (5981): 1040–43.
- Zaritsky, A. and C. L. Woldringh (1978). "Chromosome replication rate and cell shape in *Escherichia coli*: lack of coupling." *J Bacteriol* **135**(2): 581-587.
- Zarivach, R., M. Vuckovic, W. Deng, B. B. Finlay and N. C. Strynadka (2007). "Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system." *Nat Struct Mol Biol* **14**(2): 131-137.