



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Identificación y caracterización bioinformática de nuevos efectores asociados a los sistemas de secreción de tipo VI en *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Riviere Nahuel Agustín

Director de tesis: Dr. Mariano Larzábal

Director adjunto: Dr. Wanderson Marques Da Silva

Consejera de estudios: Dra. Nancy López

Lugar de trabajo: Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, INTA-CONICET

Hurlingham, Buenos Aires, 2024.

ÍNDICE

1	Resumen.....	1
2	Abstract	4
3	Agradecimientos.....	7
4	INTRODUCCIÓN	10
	Introducción	11
4.1	<i>Escherichia coli</i>	11
4.1.1	Serotipificación.....	12
4.2	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina shiga.....	12
4.2.1	Serotipos STEC	13
4.2.2	Reservorio de STEC y vías de contagio	14
4.2.3	Manifestaciones clínicas de la infección por STEC	15
4.2.4	Características del SUH y epidemiología.....	15
4.2.5	Mecanismo de infección de STEC y factores de virulencia involucrados 16	
4.2.5.1	Adeherencia inicial.....	16
4.2.5.2	Formación de pedestales: Sistema de secreción de tipo 3 y translocación de factores de virulencia.....	17
4.2.5.3	Translocación a placas de Peyer.....	18
4.2.5.4	Toxina Shiga	20
4.2.5.4.1	Subtipos de Toxina Shiga.....	21
4.3	Sistema de secreción de tipo VI (SST6) en <i>E. coli</i> patógenas	22
4.3.1	Organización genética y clasificación del SST6 en <i>E. coli</i>	23
4.3.2	Ensamblaje y mecanismo de acción del SST6	26
4.3.2.1	Complejo de membrana del SST6.....	26
4.3.2.2	Complejo de base del SST6	27
4.3.2.3	Complejo de cola del SST6.....	28
4.3.3	Mecanismo de acción del SST6.....	29
4.3.4	Efectores del SST6	31
4.3.4.1	Efectores cargo.....	31
4.3.4.2	Efectores especializados.....	32
4.3.5	El rol del SST6-2 en la patogénesis de <i>E. coli</i> patógenas.....	33
4.3.5.1	SST6-1, SST6-3 y efectores de <i>E. coli</i> con actividad antibacteriana 35	
4.4	Utilización del RNA-seq en el estudio de la interacción hospedador-patógeno 36	
5	. HIPÓTESIS	39

5.1	Hipótesis:	40
6	. OBJETIVOS.....	41
6.1	Objetivo general:.....	42
6.2	Objetivos específicos:	42
7	. MATERIALES Y MÉTODOS	43
7.1	Cepas de <i>Escherichia coli</i> , condiciones de crecimiento bacteriano y plásmidos 44	
7.2	Línea celular y condiciones de crecimiento.....	45
7.3	Reacciones de PCR.....	45
7.4	Preparación de E. coli DH5 α quimicompetentes	46
7.5	Metodología de edición génica CRISPR/Cas9	46
7.5.1	Selección de la región PAM del gen a mutar	46
7.5.2	Diseño del ADN guía (ADNg)	47
7.5.3	Clonado de ADNg en el plásmido pCRISPR-SacB	48
7.5.3.1	Fosforilación e hibridación de primers ADNg	48
7.5.3.2	Digestión del plásmido pCRISPR-SacB	49
7.5.3.3	Defosforilación del plásmido pCRISPR-SacB.....	49
7.5.3.4	Clonado del ADNg fosforilado e hibridado en el plásmido pCRISPR- SacB defosforilado y digerido	49
7.5.4	Diseño de ADN donador (ADNd).....	50
7.5.5	Transformación de EHEC O157:H7 EDL933 pCasRed-Cas9 + pCRISPR- SacB-ADNg+ADNd	52
7.5.6	Detección de clones mutantes por <i>colony</i> PCR.....	53
7.6	Ensayos de sobrevivencia de EHEC O157:H7 EDL933 en macrófagos murinos RAW 264.7	55
7.7	Microscopía confocal de fluorescencia.....	55
7.8	Aislamiento de RNA de EHEC O157:H7 fagocitada por macrófagos murinos RAW 264.7	56
7.9	Aislamiento de RNA de EHEC O157:H7 bajo condiciones de estrés.....	58
7.10	Preparación de la biblioteca de cDNA y profundidad de secuenciación	60
7.11	Ensayos de competencia interbacteriana	61
7.12	Clonado y expresión de proteínas	61
7.13	Electroforesis SDS-PAGE y <i>western blotting</i>	63
7.14	Análisis bioinformático.....	64
7.14.1	Identificación <i>in silico</i> del cluster del SST6 en STEC	64
7.14.2	Identificación de dominios catalíticos de potenciales efectores del SST6	64
7.14.3	Proksee	65
7.14.4	Alien hunter	65

7.14.5	MobileOG-db	65
7.14.6	Localización subcelular de proteínas.....	65
7.14.7	Predicción de factores de virulencia.....	65
7.14.8	Análisis bioinformático del RNA-seq	66
8	. RESULTADOS.....	67
8.1	Capítulo 1: Identificación y caracterización del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933: Explorando su vínculo con la supervivencia en macrófagos	68
8.1.1	Introducción.....	69
8.1.2	Resultados.....	70
8.1.2.1	Identificación y análisis bioinformático del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933	70
8.1.2.2	Clasificación y predicción de la actividad del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933	75
8.1.2.3	Identificación de potenciales efectores del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933	78
8.1.2.4	Identificación de efectores del SST6-2 basado en predicciones mediante un enfoque bioinformático.....	80
8.1.2.4.1	Predicción bioinformática de potenciales efectores codificados adentro del cluster del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933	83
8.1.2.4.2	Predicción bioinformática de potenciales efectores codificados por fuera del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933	85
8.1.2.5	Identificación de nuevos efectores del SST6-2 a partir de datos experimentales	92
8.1.2.6	Análisis de localización subcelular y péptido señal de candidatos a efectores	94
8.1.2.7	Obtención de cepas EHEC O157:H7 EDL933 mutantes para genes involucrados en la funcionalidad del SST6	95
8.1.2.8	Determinación de la actividad del SST6-2: de la predicción a la confirmación. ¿El SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 tiene actividad antibacterial ó está asociado con la sobrevida en macrófagos?.....	98
8.1.2.9	Evaluación de la actividad bactericida del SST6-2 en EHEC O157:H7 EDL933 a través de ensayos de competencia interbacteriana.....	98
8.1.2.10	Evaluación de la sobrevida de EHEC O157:H7 EDL933 en macrófagos murinos RAW 264.7	100
8.1.2.11	Determinación del porcentaje de supervivencia de EHEC O157:H7 EDL933 en macrófagos murinos RAW 264.7.....	101
8.1.3	Discusión	103
8.1.4	Conclusión	110
8.2	Capítulo 2. Transcriptómica de EHEC O157:H7: estudio de la interacción hospedador-patógeno con enfoque en el SST6-2 y efectores asociados.....	111
8.2.1	Introducción.....	112

8.2.2	Resultados.....	113
8.2.2.1	RNA-seq de EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada por macrófagos murinos RAW 264.7 y expuesta a condiciones de estrés extremas <i>in vitro</i>	113
8.2.2.2	Perfil transcripcional de EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada por macrófagos murinos RAW 264.7 y expuesta a estrés	114
8.2.2.3	Caracterización del perfil transcripcional de genes estructurales del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada y expuesta a estrés.....	116
8.2.2.4	Perfil de expresión diferencial de potenciales efectores del SST6-2 en EHEC O157:H7 fagocitada y expuesta a estrés	118
8.2.2.4.1	Expresión diferencial de efectores indentificados por bioinformática	120
8.2.2.4.2	Perfil de expresión diferencial de potenciales efectores del SST6-2 provenientes de datos experimentales.....	121
8.2.3	Identificación de candidatos a efectores del SST6-2 sobreexpresados en EHEC fagocitada y bajo condiciones de estrés <i>in vitro</i>	125
8.2.3.1	¿Los efectores predichos podrían considerarse factores de virulencia?	128
8.2.4	Discusión	130
8.2.5	Conclusión.....	137
9	Capítulo 3: Identificación y caracterización bioinformática de un SST6-1 antibacteriano y potenciales efectores asociados en STEC O22:H8 cepa 154.....	139
9.1	Introducción	140
9.2	Resultados.....	141
9.2.1	Identificación de un SST6-1 en STEC O22:H8 cepa 154	141
9.2.2	Caracterización de efectores adentro del SST6-1 de STEC O22:H8	154
		144
9.3	Identificación de un SST6-2 en STEC O22:H8.....	147
9.3.1	Operón estructural del SST6-2 de STEC O22:H8.....	149
9.3.2	Operón VgrG y efectores dentro del SST6-2	149
9.4	Caracterización de efectores en islas de patogenicidad en el genoma de STEC O22:H8 154.....	152
9.4.1	Isla de patogenicidad 1	152
9.4.2	Isla de patogenicidad 2	155
9.4.3	Isla de patogenicidad 3,4 y 5	157
9.4.4	Isla de patogenicidad 6	158
9.5	Ensayo de competencia.....	159
9.6	Discusión	161
9.7	Conclusión	163
10	Conclusión general.....	164
11	Referencias bibliográficas	167

12	Material suplementario: capítulo 1	183
12.1	Tabla suplementaria 1	183
12.2	Tabla suplementaria 2	188
12.3	Tabla suplementaria 3	191
13	Material suplementario capítulo 2.....	196
13.1	Control de calidad de muestras de RNA para secuenciar de EHEC O157:H7 fagocitada y expuesta a estrés <i>in vitro</i>	196
13.1.1	Eliminación de RNA ribosomales	197
13.1.2	Construcción de bibliotecas de cDNA.....	198
13.2	Clonado y expresión de proteínas para ensayos de secreción	199
14	Material suplementario capítulo 3.....	203
14.1	Tabla suplementaria 1	203
14.2	Tabla suplementaria 2	206

1 Resumen

Identificación y caracterización bioinformática de nuevos efectores asociados al sistema de secreción de tipo VI en *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) es un patógeno bacteriano implicado en enfermedades de transmisión alimentaria, cuya virulencia se debe principalmente a la producción de toxina Shiga (Stx). Esta toxina es responsable del desarrollo de síndrome urémico hemolítico (SUH), una complicación pediátrica grave de importancia en Argentina. *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) pertenece a un subgrupo de STEC y dentro de este subgrupo se encuentra el serotipo O157:H7, que está asociado con brotes de SUH. Se ha identificado que el ganado bovino es el principal reservorio de STEC y la principal fuente de diseminación al ambiente y contaminación alimenticia.

En el presente trabajo de tesis doctoral se investigaron dos cepas: EHEC O157:H7 EDL933 y STEC O22:H8 cepa 154, con el objetivo de identificar y caracterizar sus diferentes sistemas de secreción de tipo VI (SST6) y factores de virulencia (efectores) asociados. El SST6 es una nanomáquina proteica capaz de translocar moléculas efectoras que están vinculadas con la virulencia y que podrían aumentar su capacidad de colonización y supervivencia en un nicho específico.

El análisis bioinformático realizado sobre el genoma de EHEC O157:H7 EDL933, permitió identificar una copia completa del operón SST6-2 codificado en el genoma bacteriano. Las predicciones bioinformáticas sobre la función del SST6-2, basándose en la homología de secuencia con otros patógenos que poseen este tipo de SST6-2 han revelado su asociación con la supervivencia de la bacteria en fagosomas de macrófagos murinos. Para demostrar esta predicción, se generaron cepas mutantes de EHEC para el SST6-2 mediante la metodología de edición génica CRISPR/Cas9, lo que ha permitido confirmar la relevancia que posee el SST6-2 en la supervivencia de la bacteria en macrófagos murinos. Para elucidar el mecanismo molecular de la super-

vivencia EHEC O157:H7 EDL933 en el macrófago se realizó un análisis de RNA-seq de la interacción hospedador-patógeno. Además, se tomó la decisión estratégica de replicar *in vitro* las condiciones de un fagosoma tardío. Este enfoque permitió obtener el perfil transcriptómico global de EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada y expuesta a estrés extremo, observando una activación parcial de los genes estructurales del SST6-2. Para identificar nuevos efectores se empleó una combinación de predicciones bioinformáticas y datos experimentales recopilados de bibliografía. Esto condujo a la identificación de 98 potenciales efectores (26 provenientes de predicciones bioinformáticas y 72 de datos experimentales) del SST6-2 en EHEC O157:H7 EDL933. Al contrastar estos potenciales efectores con el resultado del RNA-seq considerando su sobreexpresión, localización subcelular se seleccionaron 38 candidatos a efectores del SST6-2. Teniendo en cuenta su función y la predicción sobre si estos potenciales efectores podrían contribuir a la virulencia bacteriana se redujo ese número a 6 potenciales efectores. Entre ellos YbjW que codifica para una proteína con actividad hidroxilamina reductasa y se encuentra asociado con la detoxificación frente al estrés nitrosativo. Por otro lado, se identificaron 5 candidatos asociados con procesos metabólicos como FumB, PurB y SucD y otros como YbeL e YccJ con funciones desconocidas. Los resultados obtenidos condujeron a la formulación de un modelo de acción del SST6-2 donde su estructura ya se encuentre previamente ensamblada en la membrana bacteriana, mientras que la expresión y asociación de efectores al complejo ocurra al momento de ser gatillada la respuesta de translocación.

Durante la segunda etapa del desarrollo de la tesis doctoral se investigó la presencia y accionar de potenciales efectores del SST6 en STEC O22:H8 cepa 154. Resultados previos reportados por Martorelli y colaboradores demostraron que el ganado bovino portador de STEC O22:H8 no fue colonizado por EHEC O157:H7, aunque el mecanismo detrás de esta exclusión competitiva era desconocido. En esta tesis doctoral se pudo evidenciar las bases moleculares de STEC O22:H8 154 durante la competencia bacteriana por el nicho contra EHEC O157:H7.

El análisis bioinformático del genoma de STEC O22:H8 reveló la presencia de dos SST6 completos: el SST6-1 y SST6-2. La presencia de un SST6-1 en una cepa STEC O22:H8 es un

evento significativo porque no se ha reportado previamente. Además, el análisis realizado permitió la identificación de potenciales efectores antibacterianos dentro y fuera de los operones del SST6. Otros estudios han informado que el SST6-1 está asociado con un fenotipo de competencia bacteriana, en el cual las cepas que lo poseen exhiben la capacidad de eliminar a otras. Para demostrar esta predicción se realizó un ensayo de competencia *in vitro* a través del cual se pudo confirmar la actividad antibacteriana de STEC O22:H8 154 contra EHEC O157:H7. Esto sugiere que STEC O22:H8 154 podría desplazar del nicho de colonización a EHEC O157:H7 mediante la competencia interbacteriana, al disponer de un SST6-1 y potenciales efectores antibacterianos.

PALABRAS CLAVES: toxina Shiga, virulencia, efectores, sistemas de secreción de tipo VI, macrófagos, sobrevida, competencia, RNA-seq, actividad antibacteriana.

2 Abstract

Identification and Bioinformatic Characterization of New Effectors Associated with the Type VI Secretion System in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is a bacterial pathogen implicated in foodborne illnesses, with its virulence primarily attributed to the production of Shiga toxin (Stx). This toxin is responsible for the development of hemolytic uremic syndrome (HUS), a severe pediatric complication of significant concern in Argentina. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) is a subgroup of STEC, with the serotype O157 being associated with HUS outbreaks. Cattle have been identified as the primary reservoir of STEC and the main source of environmental dissemination and food contamination.

In this doctoral thesis, two strains were investigated: EHEC O157 EDL933 and STEC O22 strain 154, with the objective of identifying and characterizing their different type VI secretion systems (T6SS) and associated virulence factors (effectors). The T6SS is a protein nanomachine capable of translocating effector molecules linked to virulence, potentially enhancing their ability to colonize and survive in specific niches. Bioinformatic analysis of the EHEC O157 EDL933 genome identified a complete copy of the T6SS-2 operon encoded in the bacterial genome. Bioinformatic predictions about the function of T6SS-2 revealed its association with bacterial survival in murine macrophage phagosomes, based on sequence homology with other pathogens possessing this type of T6SS-2. To demonstrate this prediction, EHEC mutant strains for T6SS-2 were generated using CRISPR/Cas9 gene editing, confirming the relevance of T6SS-2 in bacterial survival within murine macrophages. To elucidate the molecular mechanism of EHEC O157 EDL933 survival in macrophages, RNA-seq analysis of the host-pathogen interaction was performed. Additionally, an *in vitro* strategy was implemented to replicate the conditions of a late phagosome. This approach allowed for the acquisition of the global transcriptomic profile of phagocytized and stressed EHEC O157 EDL933, revealing partial activation of the structural

genes of T6SS-2. To identify new effectors, a combination of bioinformatic predictions and experimental data from the literature was employed. This led to the identification of 98 potential effectors (26 from bioinformatic predictions and 72 from experimental data) of T6SS-2 in EHEC O157 EDL933. By cross-referencing these potential effectors with RNA-seq results and considering their overexpression and subcellular localization, 38 candidates for T6SS-2 effectors were selected. Considering their function and predictions about their contribution to bacterial virulence, this number was reduced to six potential effectors. Among them, YbjW encodes a protein with hydroxylamine reductase activity associated with detoxification against nitrosative stress. Additionally, five candidates were identified associated with metabolic processes such as FumB, PurB, and SucD, and others like YbeL and YccJ with unknown functions. The results led to the formulation of a model for T6SS-2 action, where its structure is pre-assembled in the bacterial membrane, while the expression and association of effectors with the complex occur upon triggering the translocation response.

In the second phase of the doctoral thesis, the presence and action of potential T6SS effectors in STEC O22 strain 154 were investigated. Previous results reported by Martorelli and collaborators showed that cattle carrying STEC O22 were not colonized by EHEC O157, although the mechanism behind this competitive exclusion was unknown. In this doctoral thesis, the molecular bases of STEC O22 154 during bacterial competition for the niche against EHEC O157 were elucidated. Bioinformatic analysis of the STEC O22 genome revealed the presence of two complete T6SSs: T6SS-1 and T6SS-2. The presence of T6SS-1 in a STEC O22 strain is significant as it has not been previously reported. Additionally, the analysis identified potential antibacterial effectors within and outside the T6SS operons. Other studies have reported that T6SS-1 is associated with a bacterial competition phenotype, where strains possessing it exhibit the ability to eliminate others. To demonstrate this prediction, an in vitro competition assay was conducted, confirming the antibacterial activity of STEC O22 154 against EHEC O157. This suggests that STEC O22 154 could displace EHEC O157 from the colonization niche through interbacterial competition, utilizing T6SS-1 and potential antibacterial effectors. Therefore, a STEC O22 154 strain lacking the gene encoding Shiga toxin (Δ stx) could be used as a new strategy to prevent

intestinal colonization of cattle by EHEC O157, potentially reducing meat contamination and consequently decreasing HUS cases in humans.

KEYWORDS: Shiga toxin, virulence, effectors, type VI secretion systems, macrophages, survival, competition, RNA-seq, antibacterial activity.

3 Agradecimientos

En primer lugar, gracias a mi familia por ser incondicional siempre y el sostén en las buenas y en las malas.

Gracias a mi segunda casa, la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, que me formó en mi carrera de grado y ahora de posgrado y quién sabe en los próximos años.

A las instituciones que han permitido la realización de mi doctorado, primero a la ANPCyT por otorgarme la beca inicial y luego CONICET por la beca de finalización de doctorado.

A mi grupo de trabajo, que inicialmente formado por Angel Cataldi, Mariano Larzábal y Wanderson Marques Da Silva fueron los que confiaron en mí y me dieron la oportunidad de iniciar mi doctorado.

A Mariano por dirigirme, por su paciencia, su sabiduría y su total acompañamiento en este proceso de doctorado. A Wander por sus consejos, sus observaciones minuciosas, sus correcciones y su crítica constructiva. A Angel por su humildad, comprensión, sabiduría, consejos y por su espíritu inquieto que siempre nos impulsa a nuevos desafíos. ¡Gracias!

La vida nos pone a prueba y nos exige, pero eso se torna más fácil cuando transita ese camino bien acompañado. Esta carrera me ha puesto personas incondicionales: Pablo y Libia. Gracias por ser esa palmada en la espalda, ese abrazo y esa voz de “vos podés” en los momentos claves.

A una personita increíble que con un simple mensaje de aliento me dejó en claro que la vida es más que un doctorado. Gracias Lau por iluminarme, por acompañarme, por sacarme un poco del caos y mostrarme que valemos más de lo que pensamos, por enseñarme que a veces está bien dejarnos ayudar y que con amor podemos lograr grandes cosas.

A Dami por ser un incondicional al momento de escuchar, de ayudar, de aconsejar y de estar siempre dispuesto a dar una mano. ¡Gracias!

A Xime, mi compañera de laboratorio que me bancó desde el inicio y con quien vivimos a la par todas las etapas del doctorado. Gracias por estar siempre y por nuestras eternas charlas.

A Yami, mi compañera de oficina que supo tener las palabras de aliento en los momentos justos y por reírse de mi rutina para hacer arrancar la PC, jaja. ¡Gracias!

A Lu por estar siempre presente, gracias por ese mensajito de apoyo en los momentos justos. Por esas meriendas de nunca terminar y con charlas que nunca llegaban a su fin. ¡Gracias!

A Laurita por ser mi salvación a la hora de no llegar al micro y estar siempre al pie del cañón. ¡Gracias!

A mis compañeros/as de laboratorio Caro y Mica y también a los que han pasado por el labo y que por supuesto han dejado su huella: Ari, Xime y Jime. ¡Gracias!

A mis amigos de toda la vida que fueron testigos involuntarios de todo este proceso: Faby y Nahu. ¡Gracias!

A mis amigos de la música (mi cable a tierra): Sandra, Juli, Lucas, Nahu, Damuz. Gracias por formar parte de este hermoso arte de hacer música.

A mi querido instituto IABIMO por ser el lugar físico donde compartí todos estos años con todas las personas antes mencionadas. A todas las personas que a lo largo de mi

doctorado han estado y que han colaborado directa o indirectamente y que siempre han encontrado un motivo para festejar rompiendo con la rutina.

A Vale, Bru, Elena, Cindy y Faby. ¡Gracias! por esa cuota de alegría diaria.

Por último, quisiera expandir mi más profundo agradecimiento a cada habitante de este suelo argentino por financiar una educación pública, gratuita y de calidad. Este apoyo colectivo permite que hoy podamos investigar y hacer ciencia en nuestro país, contribuyendo al avance del conocimiento. No tengo dudas que este es y será el camino a seguir y que siempre habrá un pueblo dispuesto a defenderlo cuando se vea vulnerado, porque luchar por lo nuestro es lo mejor que sabemos hacer.

¡Gracias a todos y todas por ser parte de este esfuerzo!

4 INTRODUCCIÓN

Introducción

4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli fue nombrada así en honor a Theodor Escherich, un microbiólogo alemán que, en 1885 reportó su aislamiento a partir de heces de niños, denominándola inicialmente como *Bacterium coli commune* (1). Tradicionalmente, *E. coli* se clasifica como un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, perteneciente al género *Escherichia* de la familia Enterobacteriaceae.

E. coli es un comensal ubicuo en animales de sangre caliente y en humanos. La mayoría de las cepas de esta especie de enterobacterias son inofensivas y viven en una asociación mutuamente beneficiosa con sus huéspedes, causando enfermedades en raras ocasiones. Sin embargo, *E. coli* es una especie particularmente compleja que se ha diversificado en cepas patógenas (2).

Las *E. coli* patógenas pueden agruparse en dos grandes grupos (3), aquellas que causan diarrea son llamadas IPEC (Intestinal *pathogenic E. coli*) (4) mientras que aquellas que causan enfermedades en sitios extraintestinales (tracto urinario, sangre, abdomen, articulación, meninges, piel y tejidos blandos) se denominan ExPEC (*Extraintestinal Pathogenic E. coli*) (5).

ExPEC, como *E. coli* uropatógeno (UPEC), *E. coli* asociado a meningitis neonatal (MNEC), *E. coli* patógeno de aves (APEC), y *E. coli* responsable de mastitis (MPEC), pueden diseminarse a distintos órganos, produciendo los siguientes cuadros clínicos: infección en tracto urinario, septicemia, mastitis y meningitis (4).

IPEC, como *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *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), están limitados a la colonización de la mucosa intestinal, produciendo los siguientes cuadros clínicos: diarrea y enfermedad sistémica (5).

4.1.1 Serotipificación

Los diferentes patovares de *Escherichia coli* fueron reconocidos por primera vez cuando las cepas de *E. coli* se subtipificaron por test serológicos (6). En el año 1947, Kauffman propuso un esquema de tipificación serológico basado en aspectos somáticos del microorganismo y cadenas laterales de polisacáridos (antígenos O), antígeno capsular (K) y proteína flagelar (H) (7).

Actualmente hay alrededor de 200 grupos O diferentes en *E. coli* y 53 tipos H reconocidos (8). En la subtipificación de *E. coli* los antígenos O definen un serogrupo, y la combinación antígenos O y H el serotipo de un aislamiento. La subtipificación es usada actualmente para describir brotes y realizar vigilancia de *E. coli* asociada con enfermedades entéricas.

4.2 *Escherichia coli* productora de toxina shiga

E. coli productores de toxina Shiga (STEC) es un patógeno zoonótico que pertenece al grupo de *E. coli* productores de toxina Shiga o cual es capaz de causar diarrea severa y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos. La citotoxina expresada por estas cepas *E. coli*, inicialmente llamada verotoxina (VT), es estructural y funcionalmente similar a la toxina Shiga expresada por *Shigella dysenteriae* tipo 1 y llegó a ser conocida como toxina Shiga (Stx) (9). Este patógeno es responsable por diferentes brotes de intoxicación alimentar

en el mundo. Las cepas pertenecientes al grupo STEC posee un genoma con aproximadamente 5,4 MB lo que muestra una gran cantidad de genes que contribuyen para su proceso patofisiológico. El proceso patogénico de STEC es multifactorial y requieren la expresión coordinada de una red regulatoria de genes que son regulados en respuesta a diferentes estímulos ambientales encontrados por este enteropatógeno a lo largo de la infección (10).

4.2.1 Serotipos STEC

Las cepas STEC son una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo (11). Las infecciones por STEC en humanos pueden variar desde diarrea leve no sanguinolenta hasta colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH), enfermedad renal e incluso la muerte (11). Actualmente, se reconocen más de 470 serotipos de STEC basados en el antígeno O de *E. coli* (determinación del serogrupo O) y en la tipificación del antígeno H (flagelar) (12).

El serotipo O157:H7 es el más virulento (13) y es el que se encuentra más frecuente asociado con brotes de enfermedades e infecciones en humanos (14). En los años 1980s, múltiples brotes de diarreas sanguinolentas (colitis hemorrágica) fueron reportados en los Estados Unidos (15). El origen de estos brotes fue identificado en hamburguesas contaminadas y la bacteria causante de la enfermedad fue identificada con el serotipo O157:H7 de *E. coli*. Esta cepa es la que actualmente se denomina *E. coli* O157:H7 EDL933 y es utilizada como cepa EHEC de referencia.

Sin embargo, otros serotipos de STEC que no son O157 también han sido una causa importante de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y casos esporádicos, responsables de hasta el 50% de las infecciones por STEC en años recientes (16). Las STEC distintas del O157 más comunes son O26, O45, O103, O111, O121 y O145 y

se conocen con el nombre de “big six” porque causan enfermedades graves en humanos (17).

Un trabajo previo realizado por nuestro grupo reportó el aislamiento de cepas STEC no O157 a partir de hisopados recto-anales de ganado bovino sano (18). Tres cepas fueron identificadas como O22:H8, un serotipo previamente reportado en ganado de otros países (19) y raramente asociado con enfermedades en humanos (20). Además, se ha descubierto que el ganado que era colonizado por O22:H8 cepa 154 no era eficientemente colonizado por EHEC O157:H7 (18), lo que sugiere una posible interferencia en la competencia por el nicho de colonización.

4.2.2 Reservorio de STEC y vías de contagio

Los rumiantes, especialmente los bovinos, son los principales reservorios de STEC (21). Estos microorganismos colonizan al bovino en la región terminal del tracto gastrointestinal denominada juntura recto anal, ubicada en los últimos centímetros del recto (22). Las cepas STEC pueden ser transmitidas al humano en forma directa, a través de una amplia variedad de productos cárnicos o lácteos, o indirecta, vía la excreción fecal en el medio ambiente, conduciendo a la contaminación de otros productos o fuentes de agua (23) (Figura 1). También puede ser transmitida de persona a persona, pero la ingesta de carne picada vacuna mal cocida, comúnmente en forma de hamburguesa sigue siendo el principal vehículo de infección (24). Sin embargo, el consumo de vegetales crudos, como por ejemplo espinaca y lechuga contaminados por STEC ha sido responsable de varios brotes con alto número de infectados, en otros países (25).

La dosis infectiva para producir síntomas gastrointestinales severos por parte de STEC se estima entre 10 y 100 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (26), lo cual permite altas tasas de incidencia y de transmisión (27).

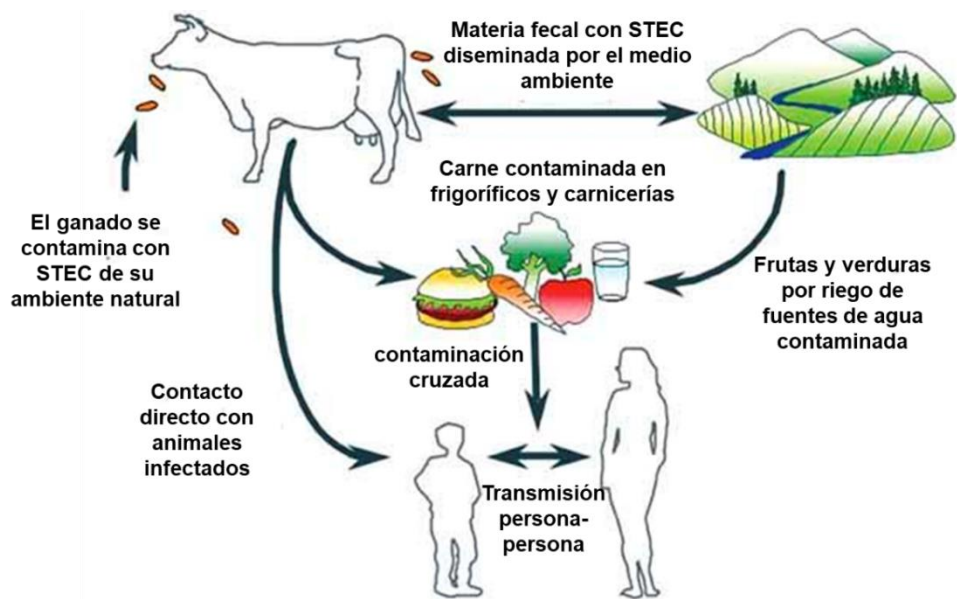


Figura 1. Esquema que representa las vías de contagio de STEC

4.2.3 Manifestaciones clínicas de la infección por STEC

La infección por STEC en humanos está ligada a diferentes cuadros clínicos que varían desde diarrea, hasta colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), una complicación que puede desembocar en insuficiencia renal y muerte (28). La toxina Shiga (Stx) es el principal factor de virulencia de STEC y es probable que la diarrea hemolítica sea producto de su acción sobre la vasculatura de la mucosa y sobre los enterocitos (29).

4.2.4 Características del SUH y epidemiología

El SUH fue descrito en nuestro país en una serie de trabajos publicados desde 1964 por Gianantonio y colaboradores; que definieron a esta enfermedad como una tríada de insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia (30). Estos investigadores llamaron la atención sobre su incidencia, aunque aún no se sabía su asociación con infecciones

por STEC. En Argentina el organismo fue aislado por primera vez en 1987 en terneros con colibacilosis (31).

El SUH está ampliamente distribuido en el mundo y frecuentemente se lo describe como una enfermedad epidémica de baja tasa de incidencia en países industrializados como EEUU, Canadá y Japón, donde se registran de 1 a 3 casos cada 100.000 niños, en niños menores de 5 años (32).

Sin embargo, en Argentina, país de mayor incidencia de SUH en el mundo, se producen de 12 a 14 casos cada 100.000 niños, en niños menores de 5 años; con alrededor de 500 nuevos casos por año, con una letalidad en la fase aguda del 3,2 % (33). El 60 % de los pacientes infectados con STEC supera la fase aguda y se recupera sin secuelas después de dos o tres semanas de hospitalización. Aunque en la mayoría de los casos la diarrea por STEC es autolimitada, aproximadamente del 5 al 10 % de los niños infectados evolucionan a SUH, para el cual no existe un tratamiento específico, sino de sostén. Eventualmente, los pacientes con SUH pueden desarrollar insuficiencia renal crónica (34). Así, el SUH constituye la primera causa de insuficiencia renal aguda en la edad pediátrica y la segunda de insuficiencia renal crónica, siendo además responsable del 20 % de los trasplantes renales en niños y adolescentes (30).

4.2.5 Mecanismo de infección de STEC y factores de virulencia involucrados

Se ha propuesto un modelo de tres estados de la patogénesis para STEC: adherencia inicial, formación de pedestales y translocación del patógeno a Placas de Peyer (35).

4.2.5.1 Adeherencia inicial

La adherencia inicial a las células huésped es el primer paso de la infección de EHEC. La importancia de este paso en la infección reside en que (i) la adherencia es el

primer contacto entre las bacterias y las células intestinales sin el cual los otros pasos no pueden ocurrir, y (ii) la adherencia es la base de la especificidad del huésped para muchos patógenos (36). En esta etapa EHEC coloniza, mediante las adhesinas folicúlos asociados al epitelio en las placas de Peyer en en la superficie de la mucosa intestinal (37).

4.2.5.2 Formación de pedestales: Sistema de secreción de tipo 3 y translocación de factores de virulencia

En algunos serotipos de STEC como por ejemplo el O157:H7, se observa en su genoma la presencia de una isla de patogenicidad de 35,6 Kb, conocida como *locus of enterocyte effacement* (LEE). Las cepas que albergan esta isla de patogenicidad son llamadas de LEE-positivas y las que no poseen son llamadas de LEE-negativas (38). En LEE podemos encontrar los genes que codifican al sistema de secreción de tipo 3 (SST3) que le confiere la capacidad de producir una lesión histopatológica en el epitelio intestinal conocida como *attaching and effacing* (A/E), caracterizada por la íntima adherencia al enterocito y la eliminación de las microvellosidades intestinales (39). Luego de la adherencia inicial a la célula eucariota, la bacteria utiliza el SST3 para inyectar proteínas efectoras (factores de virulencia) dentro del citosol de la célula epitelial del hospedador, subvirtiéndolo así los procesos celulares del epitelio blanco para ventaja de la bacteria (40). En el operón LEE se encuentra codificada la proteína Intimina, una adhesina de membrana externa, responsable de la adherencia íntima entre la bacteria y los enterocitos del hospedador; y su propio receptor Tir (*Translocated intimin receptor*) sintetizado por la bacteria, el cual es translocado a través del SST3 al citoplasma donde luego se dirige a la membrana de la célula del hospedador (41). Las proteínas Intimina y su receptor Tir son requeridas para la adherencia entre la bacteria y la célula epitelial del hospedador en el sitio de la lesión A/E (41).

4.2.5.3 Translocación a placas de Peyer

La adhesión en el intestino humano ocurre en regiones con folículos asociados al epitelio que superpone con las placas de Peyer (42). Estos folículos contienen células M especializadas en la translocación de patógenos desde el lumen intestinal al lado basolateral del epitelio, donde las bacterias luego son fagocitadas por macrófagos (42) (Figura 2).

Los macrófagos internalizan a la bacteria en un fagosoma temprano, el cual luego sufre un proceso de maduración hacia un fagosoma tardío (43). En el fagosoma el nivel de oxígeno disminuye como consecuencia de la reducción O_2 a O_2^- vía NADPH oxidasa, lo cual incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando un entorno hipóxico y oxidativo (44). Los macrófagos activados pueden generar especies reactivas de nitrógeno tales como óxido nítrico (ON) a través de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS2) (45,46). Luego de atravesar la membrana del fagosoma el ON puede reaccionar en el lumen del fagosoma y generar dióxido de nitrógeno (NO_2), nitrosotioles, nitroxil (HNO) y complejos dinitrosil-hierro. Estos intermediarios de nitrógeno pueden ejecutar su actividad microbicida a través de la destrucción oxidativa de la membrana lipídica y del ADN (46).

La acidificación del fagosoma, que inicia posteriormente a la fagocitosis, puede alcanzar valores de pH cercanos a 4,5 (Jankowski et al., 2002). Además, se ha reportado que una estrategia de defensa de los macrófagos es limitar el acceso a nutrientes (concepto de inmunidad nutricional), tales como fuentes de carbono y iones metálicos como hierro, manganeso, magnesio, cobre y zinc (47).

Además, el metabolismo celular puede producir subproductos e intermediarios que dañan el ADN, como ROS. Juntos, estos agentes representan una amenaza constante

para el genoma de un organismo, de manera que un daño no reparado en el ADN presenta un desafío muy serio para una célula porque puede dar lugar a mutaciones perjudiciales o provocar la muerte celular (48).

En respuesta a esas amenazas, los organismos han desarrollado múltiples mecanismos para abordar el daño del ADN de una manera propensa a errores y sin errores. *E. coli*, entre otras bacterias, ha desarrollado un sistema inducible, denominado respuesta SOS, que le permite sobrevivir a aumentos repentinos del daño en el ADN (48). No obstante, la síntesis de toxina Shiga por *E. coli* se encuentra corregulada mediante la inducción del bacteriófago integrado que codifica el gen de la toxina y su inducción está relacionada con la respuesta bacteriana SOS (49). De esta manera, la respuesta SOS induciría la producción de Stx, la cual puede inducir apoptosis de la célula hospedadora (50).

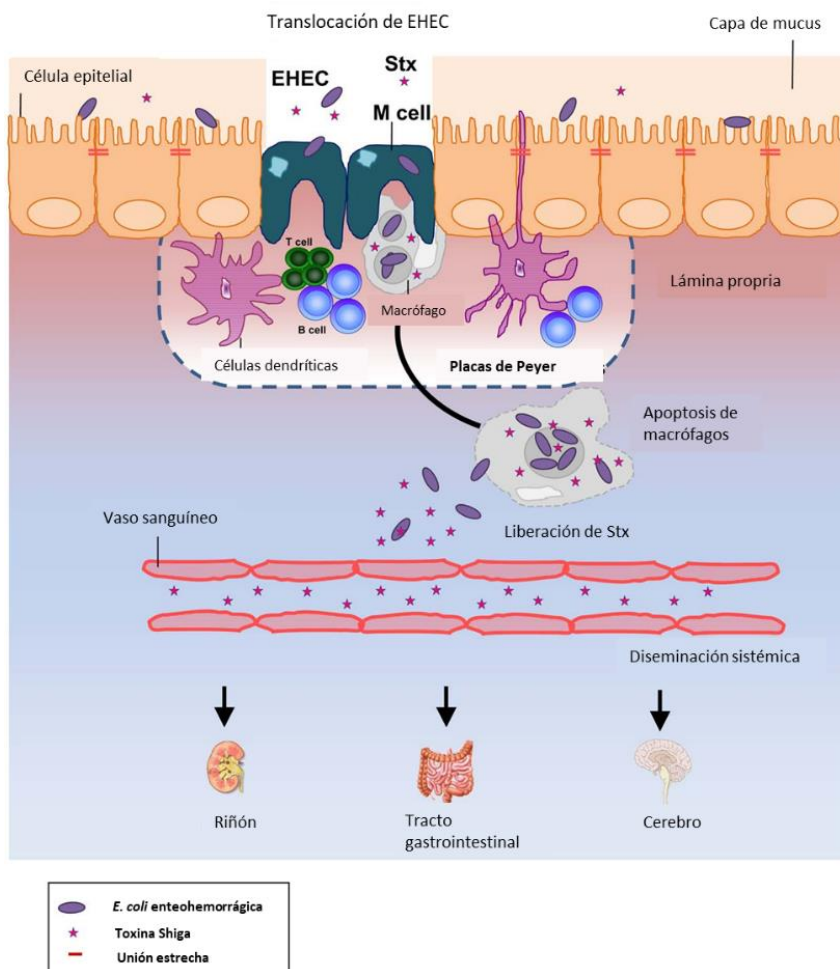


Figura 2. Modelo de infección de EHEC en humanos. El diagrama representa una monocapa de células endoteliales infectadas con EHEC en el lumen intestinal. La bacteria atraviesa la barrera endotelial mediante células M. Una vez en la lámina propia, la bacteria es fagocitada por macrófagos, donde sobrevive y produce Stx. Tras la replicación bacteriana en el macrófago, la producción de la Stx induce la apoptosis del mismo, liberando la toxina al torrente sanguíneo, donde puede alcanzar el riñón, intestino y cerebro. El daño ocasionado en estos órganos puede resultar en serias complicaciones de salud en los humanos (42).

4.2.5.4 Toxina Shiga

La producción de toxina Shiga representa el atributo de virulencia más importante de STEC. La toxina Shiga se encuentra codificada por los genes *stx1* y *stx2* transportados por fagos del tipo lambdoides (51) (52) que están insertados en el genoma de la bacteria. Las variantes de Stx se encuentran actualmente organizadas en tres subtipos de Stx1 (a, c y d) y siete de Stx2 (a, b, c, d, e, f, y g) (53).

Stx está constituida por una subunidad A de 32-kDa y cinco subunidades B de 7.7-kDa, que forman una estructura pentamérica (A1B5), de anillo, alrededor de la subunidad A. Esta última une Stx a receptores globotriaosilceramida (Gb3) o globotetraosilceramida (Gb4) (32), presentes en algunas células eucariotas y se internaliza hacia los endosomas (54). Las vesículas endosomales sufren un transporte retrógrado al de secreción de proteínas, vía el aparato de Golgi, al retículo endoplásmico antes de ser traslocadas al citosol. Durante este proceso, la subunidad A es clivada por una proteasa, generando un fragmento activo, A1 (55). Este fragmento posee actividad N-glicosidasa, que actúa removiendo una base de adenina específica del ARNr 28S de la subunidad ribosomal 60S, lo cual inhibe la elongación de las cadenas peptídicas, llevando a la muerte celular (56). La subunidad B puede desencadenar procesos apoptóticos (56,57).

4.2.5.4.1 Subtipos de Toxina Shiga

Stx1 solo tiene un cambio de aminoácido en la subunidad A respecto a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae*, mientras que Stx2 tiene solo 56 % de identidad con Stx1 (58). Para Stx2 se han descrito numerosas variantes, entre ellas Stx2c (stx2vh-a y stx2vh-b), Stx2d (stx2d-Ount y stx2dOX3), Stx2e, Stx2f, y Stx2g (59,60). Stx2c y Stx2d, fueron identificadas en aislamientos humanos, la primera de ellas en cepas O157 y no-O157, y la segunda solo en cepas STEC no-O157. Si bien los miembros de la familia de Stx muestran similitud en su estructura y función, cada uno de los subtipos presenta grandes diferencias en su toxicidad en tejidos celulares y en animales. Stx2 tiene una actividad citotóxica de 100 a 1000 veces superior a Stx1. Estudios previos sugieren que individuos infectados con cepas Stx2 presentan mayor riesgo de desarrollar SUH (61). Asimismo, se ha determinado que Stx2a y Stx2d son 25 veces más citotóxicas en células Vero que Stx1 y que las variantes Stx2b y Stx2c; debido principalmente a la existencia de diferencias en la secuencia aminoacídica de la subunidad B, responsable de la unión

de la toxina al receptor Gb3 (62). Por lo tanto, la prevalencia de cepas STEC de determinados genotipos *stx* junto a otros factores de virulencia podrían contribuir al desarrollo de SUH en humanos y explicar la alta incidencia de enfermedades y la gravedad de los casos clínicos (62).

4.3 Sistema de secreción de tipo VI (SST6) en *E. coli* patógenas

Existen varios sistemas de secreción en bacterias Gram negativas que permiten la translocación de proteínas al medio extracelular o a células procariotas o eucariotas, favoreciendo su ventaja adaptativa frente al entorno en el que se encuentra la bacteria. El SST6 es uno de los más recientes sistemas especializados identificados en Gram-negativos, se encuentra ampliamente distribuido en proteobacteria y puede existir en múltiples copias en el cromosoma bacteriano (63).

El SST6 está formado por una estructura proteica que atraviesa la doble membrana bacteriana que, como muchos otros sistemas de secreción, permite la translocación unidireccional de “efectores” en un único paso, liberándolos desde el citoplasma bacteriano hacia el espacio extracelular o la célula blanco. Toda la maquinaria proteica involucrada en la estructura del SST6 requiere de 13 subunidades diferentes que conforman el núcleo estructural, las cuales se encuentran codificadas en un locus de aproximadamente 30 kb sobre el cromosoma (64) (Figura 3).

Básicamente, el SST6 puede visualizarse como una estructura tipo “jeringa” anclada a la doble membrana bacteriana (65). La estructura tipo “jeringa” del SST6 está relacionada evolutivamente, estructuralmente y funcionalmente con la cola contráctil de los bacteriófagos. No obstante, no está establecido si los genes que codifican el SST6 provienen de genes de bacteriófagos (66) (Figura 3).

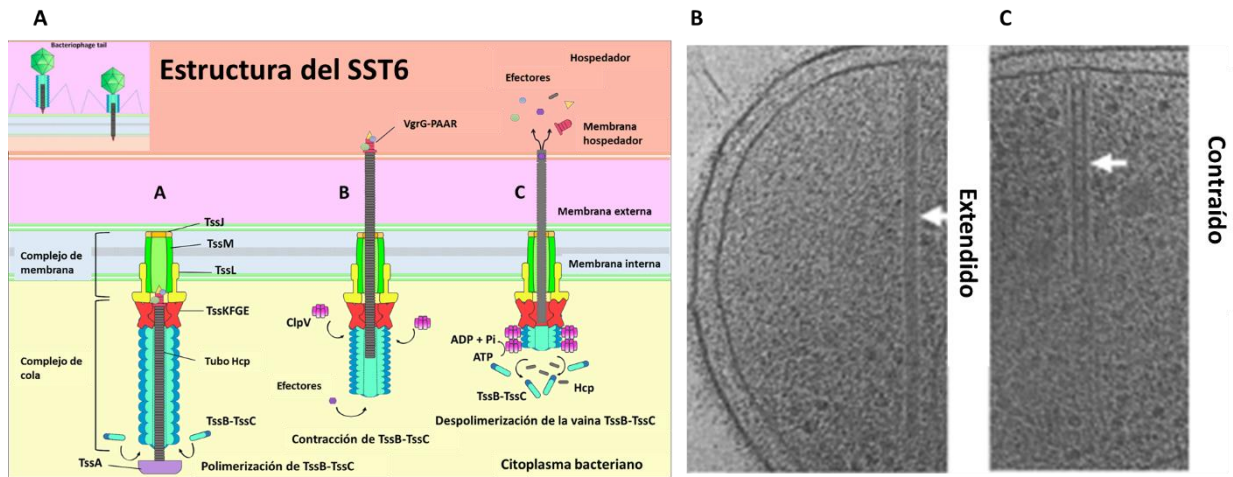


Figura 3. A) esquema que representa al SST6 en su forma extendida y contraída. B y C) son cortes tomográficos de un SST6 extendido y contraído en células de *M. xanthus* hidratadas y congeladas. Imágenes tomadas de la revisión sobre el SST6-2 por Navarro y colaboradores (67)

4.3.1 Organización genética y clasificación del SST6 en *E. coli*

Los genes que codifican los componentes del SST6 se encuentran agrupados en islas genéticas (68) (Figura 4). El contenido de GC de estas regiones es generalmente diferente del resto del genoma, lo que sugiere que fueron adquiridos por eventos de transferencia horizontal (64). Estos grupos de genes codifican los 13 componentes centrales del SST6 que corresponden a las subunidades proteicas necesarias para ensamblar un SST6 funcional. En numerosos casos, el núcleo estructural del SST6 se encuentra acompañado por proteínas adicionales (69). Aunque, las funciones de muchas proteínas adicionales son desconocidas, se piensa que podrían modular, facilitar el ensamblado o complementar la función del SST6 (70).

Según la organización genética y la homología/similitud los SST6 de *E. coli* se agrupan en tres grupos filogenéticos: SST6-1, SST6-2 y SST6-3 (Figuras 4 y 5) (68). Esto sugiere que estos *clusters* estaban presentes en un ancestro común o que hubo intercam-

bios genéticos entre cepas que comparten el mismo nicho. Sin embargo, la primera hipótesis es más probable porque cada grupo filogenético del SST6 fue encontrado en cepas de *E. coli* intestinales y no intestinales y estos grupos no comparten el mismo nicho con especies como *Salmonella* o *Enterobacter* que también presentan SST6 (68).

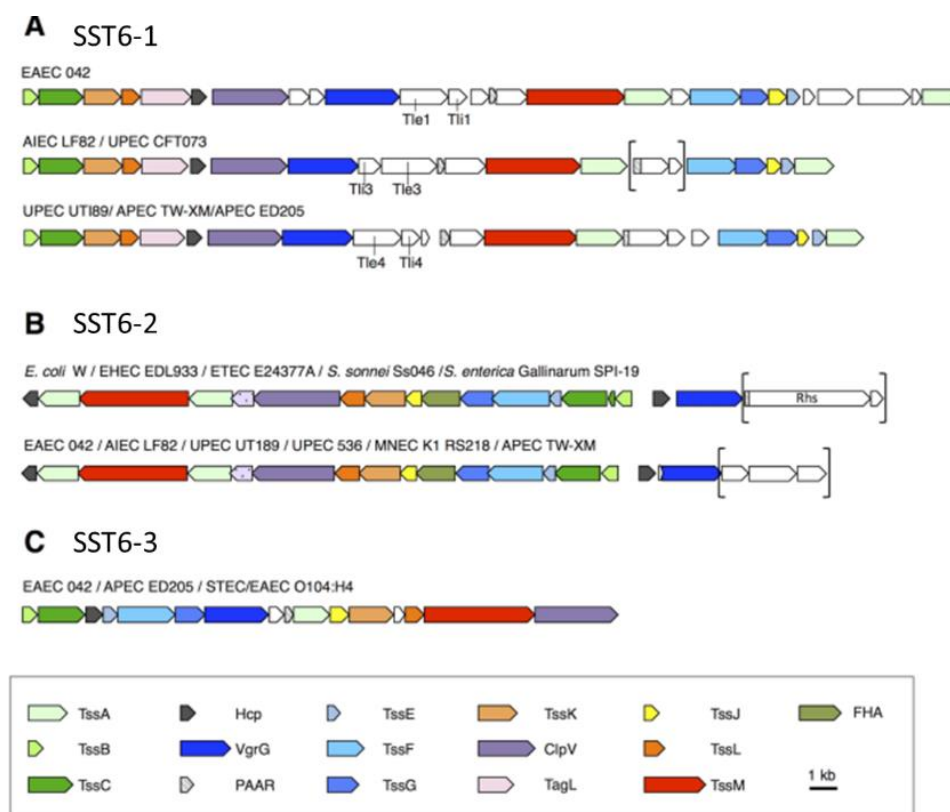


Figura 4. Esquema que representa la organización genética de los SST6-1 a SST6-3. Los genes que codifican el SST6-1 (A), SST6-2 (B) y SST6-3 (C) en cepas de *E. coli* y otras especies con similitud en sus SST6. Los genes homólogos poseen el mismo color (ver recuadro con la anotación de los genes y sus respectivos colores). Aquellos genes con función desconocida se muestran en color blanco, mientras que aquellos entre los símbolos de llave no están presentes o son idénticos en las cepas listadas. Tomado de Journet y colaboradores (68).

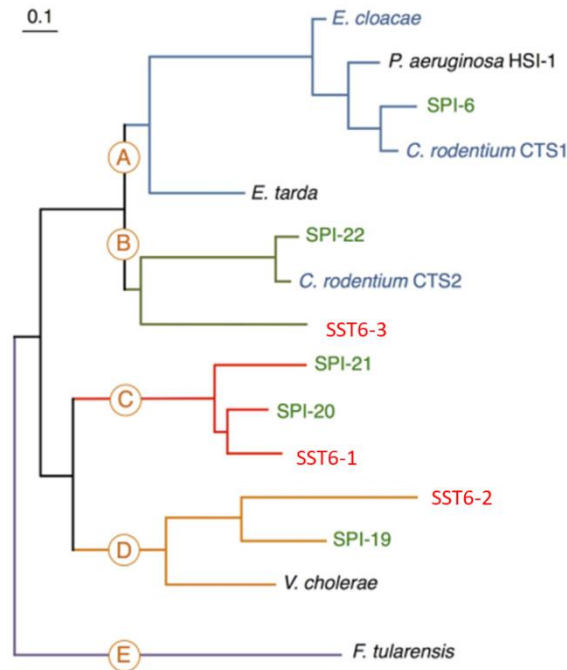


Figura 5. Árbol filogenético de grupos de genes del SST6. Los SST6 se agrupan en 5 categorías (A-E). La distribución de los SST6 asociados a *E. coli* (SST6-1 a SST6-3, en rojo) y asociados a *Salmonella* (SPI, en verde), así como también aquellos correspondientes a *E. cloacae*, *C. rodentium* (en azul), *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *Edwardsiella tarda* y *Francisella tularensis* (negro). La figura fue preparada con phylogeny.fr usando las secuencias de TssB. Tomado de Journet y colaboradores (58).

Entre los tres grupos filogenéticos, los SST6-1 y SST6-2 son los más encontrados en los genomas de *E. coli*. En este sentido, es interesante destacar que el SST6-2 está sobrerrepresentado en cepas patológicas con alta virulencia como EHEC O157:H7 y EAEC (71).

La mayoría de las cepas pueden contener una o varias copias del SST6, esta multiplicidad podría corresponder con el estilo de vida y el nicho que ocupa, lo que podría reflejar la funcionalidad del cluster SST6 (72). Sin embargo, poco se sabe respecto a si estos *clusters* poseen funciones específicas o similares en diferentes condiciones. No obstante, la mayoría de los SST6 de las cepas de *E. coli* y *Salmonella* estudiados hasta ahora han mostrado participación en adherencia a superficies abióticas y bióticas asociadas a la formación de biopelículas, competencia bacteriana o virulencia hacia células eucariotas.

En función de la información disponible respecto a los SST6 en *E. coli*, los SST6-1 y SST6-3 están relacionados con actividad antibacteriana y el SST6-2 con la patogénesis (68).

Se evidenció un fenotipo antibacteriano en las cepas EAEC 17-2 que alberga los SST6-1 y SST6-3 (73,74), y en APEC TW-XM con SST6-1 (75). En EAEC 17-2 se ha reportado una asociación entre el SST6-1 con la formación de biopelícula (76).

La patogénesis dependiente del SST6 ha sido documentada en numerosas cepas bacterianas. En este contexto, el SST6-2 es particularmente significativo, ya que se encuentra con alta prevalencia en cepas patógenas de *E. coli* con alta virulencia, como APEC DE719 y SEPT362. El SST6-2 mostró un rol importante en la diseminación sistémica y en la sobrevida en macrófagos de pollos (77,78). En APEC cepa TW-XM, el SST6-2 es importante para la infección cerebral y la penetración a la barrera hematoencefálica (79).

Esto demuestra que el SST6 emergió como un factor clave en la patogénesis bacteriana, que depende de la translocación de efectores. La maquinaria del SST6 está formada por tres grandes complejos que permiten la translocación de efectores desde el citoplasma bacteriano a la célula blanco: el complejo de membrana, el complejo de cola y el complejo de base(67).

4.3.2 Ensamblaje y mecanismo de acción del SST6

4.3.2.1 Complejo de membrana del SST6

El complejo de membrana del SST6 está conformado por las proteínas TssJ, TssL y TssM (Figura 6 A) (80). La función esencial de la proteína TssM es facilitar la conexión entre la lipoproteína de membrana externa, TssJ, y la proteína de membrana interna,

TssL(81). TssM desempeña un papel crucial como componente central del complejo de membrana al establecer el vínculo entre las membranas externa e interna (81). Su dominio citoplasmático posibilita la oligomerización tanto consigo misma como con TssL, además de interactuar con los componentes de la placa base, TssK y TssG (82).

4.3.2.2 Complejo de base del SST6

Se ha reportado que las proteínas TssA, TssF, TssG y TssK desempeñan un papel esencial como componentes fundamentales en la formación del complejo de base del SST6 (Figura 3 B) (67). TssK, un trímero proteico citoplasmático, se asocia con oligómeros que constituyen el complejo de membrana interna, siendo un elemento crucial para el ensamblaje del SST6 (82). La colaboración de las proteínas de la base resulta imprescindible para este proceso. Se ha reportado que el aislamiento del complejo de base mostró una interacción entre VgrG y TssF-TssG-TssE y que se requiere una red de interacción entre varios componentes de la placa base y los componentes de la cola, incluidos TssE, TssG, TssF, TssA, TssK, y VgrG. Estas seis proteínas son requeridas para la eventual formación del complejo de cola. La fase inicial de la formación del complejo de base implica la interacción entre TssG y la proteína TssM del complejo de membrana. TssA desempeña un papel multifacético a lo largo del ensamblaje del SST6 al unirse al complejo de membrana y reclutar proteínas hacia la base del complejo (83). De manera secuencial, TssA interacciona con distintos complejos: primero, con las proteínas del complejo de membrana (TssL y TssK), seguido por las proteínas de la base (TssF, TssG, TssK, TssE y VgrG), y finalmente con las proteínas del complejo de cola. Este proceso es necesario para la formación exitosa de este sofisticado SST6 (67).

4.3.2.3 Complejo de cola del SST6

El complejo de membrana del SST6 se encarga de unir las proteínas que conforman el complejo de cola (Figura 6 C). Esta estructura presenta una vaina proteica compuesta por TssB-TssC que se dispone perpendicularmente a la membrana plasmática, extendiéndose a lo largo del citoplasma (84). En su interior, se forma un tubo conformado por polímeros de la proteína Hcp, el cual está recubierto por la mencionada vaina TssB-TssC. Las proteínas Hcp se ensamblan formando hexámeros, generando así una estructura tubular con un diámetro interno aproximado de 35-45 Å (66,85). Se ha demostrado que el dominio N-terminal de VgrG interactúa con Hcp, de hecho, es requerida para la correcta polimerización del tubo Hcp así como también para promover la dinámica del complejo de cola y la liberación de Hcp (86). El trímero compuesto por VgrG y la proteína PAAR se localiza en el centro del complejo de base formando una punta conocida como espiga, la cual es la plataforma que nuclea el ensamblado del complejo de cola (85). Las proteínas TssB y TssC son necesarias para armar la vaina (Figura 6 C) que recubre al tubo Hcp de manera similar al complejo de cola del bacteriófago T4, donde la vaina formada por subunidades gp18 cubre el tubo central (87). Esta tubería interna actúa como un espacio donde se acomodan pequeñas proteínas, ya sea completamente o parcialmente plegadas.

El trímero de la proteína VgrG está localizado centralmente en el complejo de base formando una espiga, la cual parece ser una plataforma donde se nuclea y polimeriza el complejo de cola (85). En la mayoría de los casos, una proteína llamada PAAR interactúa con VgrG y agudiza su extremidad, dándole forma de punta (88).

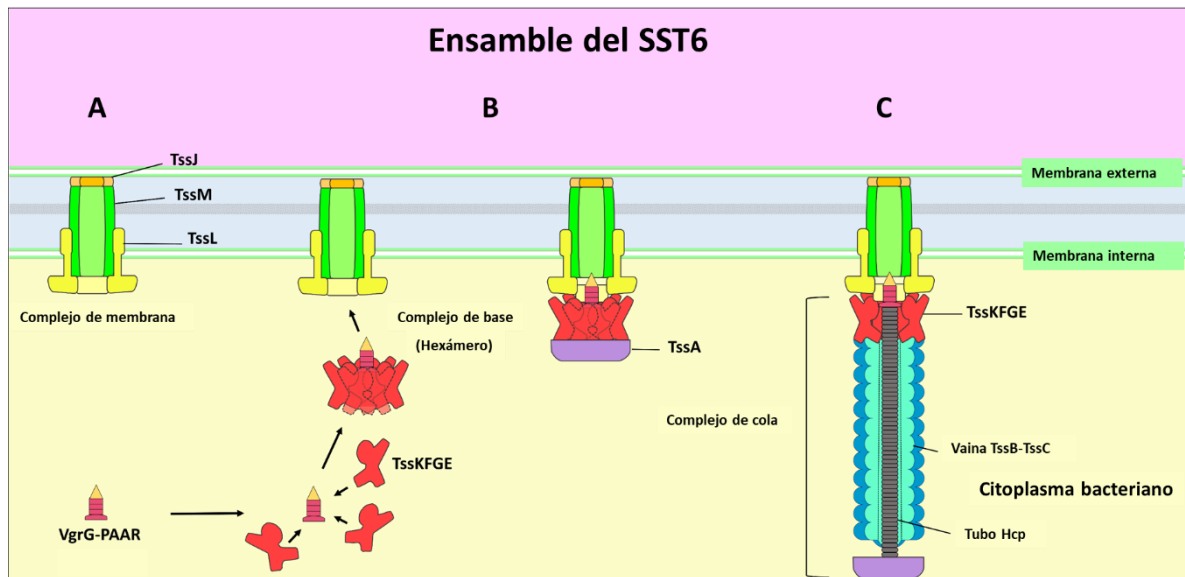


Figura 6. Esquema representativo del ensamblaje del SST6 a través de la formación sucesiva de los distintos complejos proteicos que lo componen: **A)** el complejo de membrana, **B)** el complejo de base y **C)** el complejo de cola. Imagen tomada de Navarro y colaboradores (67).

4.3.3 Mecanismo de acción del SST6

Recientemente, aspectos relacionados al mecanismo de acción del SST6 han sido descritos. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia a intervalos han proporcionado una visión dinámica de cómo se ensambla y funciona el sistema. Se ha propuesto un modelo para el mecanismo de acción del SST6 basado en estos datos, así como en el conocimiento de estructuras contráctiles similares, como los bacteriófagos o las piocinas (80,89,90).

La biogénesis del SST6 inicia con el ensamblado del complejo de membrana, que sirve como andamiaje para el anclaje del complejo de base a partir del cual empezará formarse el complejo de cola. El tubo central compuesto por Hcp y en su punta por VgrG-PAAR es cubierto por la vaina estructural TssB-TssC que empieza a polimerizar extendiéndose por el citoplasma (Figura 7 A). Se ha reportado que esta estructura oscila entre elongada y contraída (91). Esto se debe a que, en el proceso de polimerización del com-

plejo de cola, las proteínas TssB-TssC sufren cambios en su estructura llevando a la contracción y permitiendo, de esta manera, la eyección del tubo Hcp (92). La contracción de la vaina propulsa el tubo central que en su extremo posee las proteínas VgrG y PAAR que perforan la membrana de la célula blanco y de esta manera facilita la entrega de los efectores (Figura 7 B).

Por último, ClpV, una proteína citoplasmática con actividad ATPasa induce el desarmado del túbulo TssB-TssC dependiente del gasto de ATP. ClpV se une específicamente al complejo de cola retráctil desarmándolo y permitiendo la liberación de las subunidades TssB-TssC para su reutilización en un nuevo evento de polimerización y contracción del complejo de cola (Figura 7 C) (93).

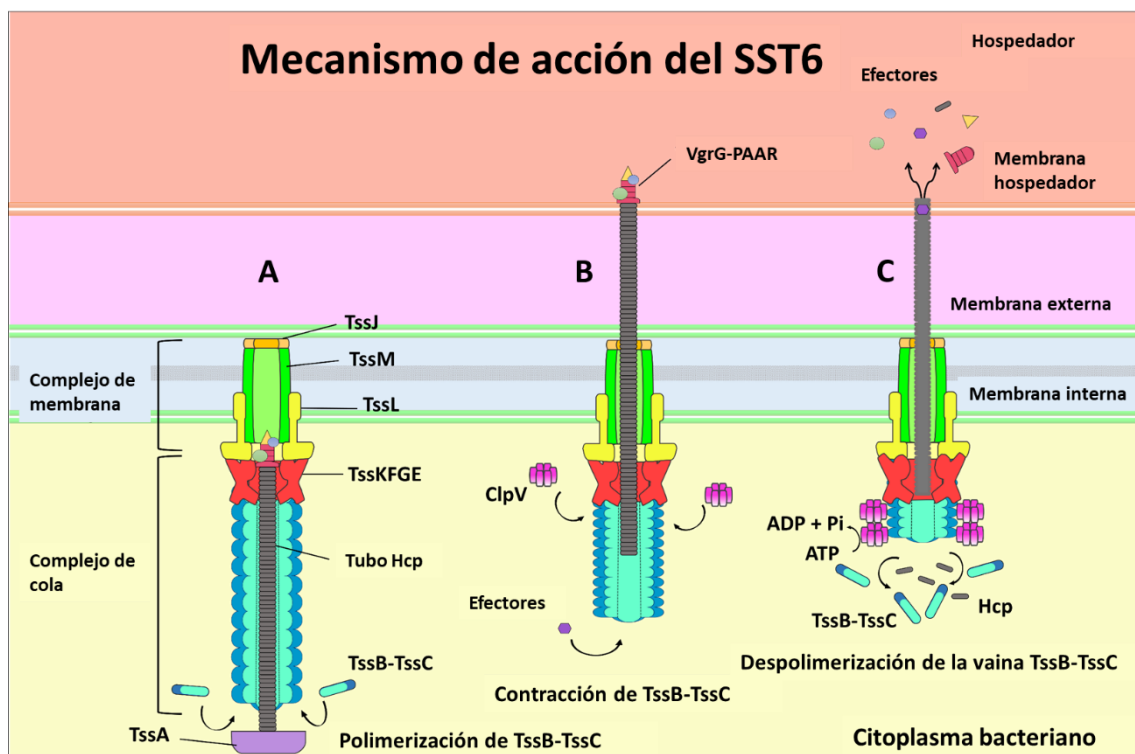


Figura 7. Esquema representativo del mecanismo de acción del SST6. **A)** La biogénesis del SST6 inicia con el ensamblado del complejo de membrana y el reclutamiento del complejo de base, los cuales sirven como plataforma para la polimerización del complejo de cola. Durante la elongación del complejo de cola los efectores son cargados en el tubo central compuesto por Hcp o unidos a proteínas de la espiga VgrG por medio de interacciones con el dominio PAAR. **B)** Seguido de la contracción del complejo de cola, el tubo Hcp se eyecciona y la espiga VgrG perfora la membrana de la

célula blanco, permitiendo la liberación de los efectores. C) Finalmente, ClpV desarma el complejo de cola retráctil liberando las subunidades TssB-TssC al citoplasma, disponibles para un nuevo evento de polimerización y contracción. Imagen tomada de Navarro y colaboradores (67).

4.3.4 Efectores del SST6

Estas moléculas que son translocadas por el SST6 se denominan efectores. En este aspecto el estudio del SST6 ha cobrado interés por la capacidad de dirigir su accionar tanto a células eucariotas como procariotas por la entrega de efectores con actividades catalíticas que incluyen hidrolasas, fosfolipasas, peptidoglicano hidrolasa entre otras (70,94,95).

Cómo las proteínas efectoras son específicamente reconocidas y translocadas por el SST6 es una incógnita por resolver. Sin embargo, estudios recientes han reportado que los efectores pueden ser translocados por el SST6 de dos maneras: fusionados a componentes estructurales (translocación de efectores “especializada”) o por interacción no covalente (“carga”) (Figura 8) (96,97).

En ambos casos, los efectores están asociados con los componentes que son eyectados como Hcp-VgrG-PAAR, dejando en evidencia que múltiples efectores decoran la estructura tipo aguja del SST6 que luego inyecta en la célula blanco (88) .

4.3.4.1 Efectores carga

Los efectores translocados vía carga no presentan uniones covalentes a las proteínas estructurales del SST6 y, en algunos casos, no están vinculadas con ningún gen del SST6. Sin embargo, pueden encontrarse en la proximidad de los genes *vgrG*, *hcp* o *paar*, lo que sugiere que su secreción podría estar asociada con componentes estructurales (98,99).

Los efectores cargo interactúan directamente o requieren chaperonas específicas o adaptadores que les permiten cargarse en el lumen del tubo Hcp (Figura 8 A), en la espiga VgrG o en PAAR. Las chaperonas del SST6 incluyen proteínas que poseen DUF4123, DUF1795 y DUF2169 son requeridas para cargar efectores en la espiga VgrG (100). Por ejemplo, se identificó que una proteína que contiene el dominio DUF4123 actúa como chaperona en *V. cholerae* al evidenciar su interacción con VgrG-1 y el efector TseL mediante co-inmunoprecipitación, siendo este último un efector que posee actividad antibacteriana (101).

4.3.4.2 Efectores especializados

Por otro lado, los efectores especializados son proteínas estructurales del SST6 que poseen un dominio con actividad catalítica (Figura 8 B) como VgrG-1 de *V. cholerae* que fue el primer componente estructural caracterizado con un dominio efector (102). VgrG-1 muestra una extensión de 446 aminoácidos en su extremo C-terminal que posee la capacidad de alterar los filamentos de actina e inducir redondeo celular (102). Las proteínas VgrG que presentan un dominio tóxico en su extremo C-terminal son llamadas VgrGs evolucionadas (103).

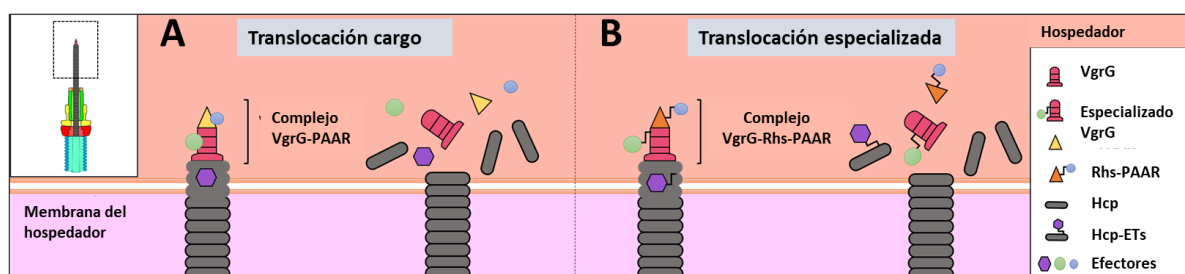
Estudios han reportado que cuando el tubo central del SST6 es eyectado VgrG perfora la membrana de la célula blanco y tanto VgrG como Hcp son translocados (102,104).

Análisis bioinformáticos realizados en 17 especies bacterianas de la familia *Enterobacteriaceae* han demostrado que algunas de las proteínas del tubo Hcp poseen dominios catalíticos en sus extremos C-terminal, conocidos como Hcp-ET (por *extension toxin*). Entre ellas, Hcp-ET1 de STEC se destaca, ya que tanto las predicciones bioinformáticas como las demostraciones experimentales han confirmado que presenta actividad

HNH-DNasa y que, al ser translocada por el SST6, inhibe el crecimiento de la bacteria blanco (105).

Por otro lado, PAAR, una proteína del SST6 con estructura cónica, forma el extremo de la espiga tras unirse a VgrG (88). PAAR y VgrG son co-dependientemente secretadas (106). Se ha reportado que algunas proteínas efectoras poseen un dominio PAAR en su extremo N-terminal que permitiría su interacción con VgrG favoreciendo su translocación (107). Más recientemente, varios ejemplos de dominios de efectores fusionados a dominios PAAR para la translocación por el SST6 han sido descritos en diferentes organismos (108,109). En particular, las proteínas efectoras Rhs asociadas al SST6 son toxinas polimórficas, compuestas por un extremo N-terminal conteniendo un dominio PAAR, una región central Rhs con repeticiones Y/D conservadas y un dominio variable C-terminal asociado a una actividad catalítica (110,111).

Figura 8. Esquema que representa los modos de entrega de efectores del SST6. Los efectores son translocados vía



cargo y especializada. A) Los efectores cargo también pueden presentar dominios con actividad catalítica e interactuar no covalentemente con VgrG, Hcp o PAAR directamente o a través de chaperonas que facilitan su interacción con las proteínas estructurales. B) Los efectores especializados tienen diversos dominios tipo toxina fusionado a una proteína estructural como VgrG, Hcp o PAAR. Imagen tomada de Navarro y colaboradores (67).

4.3.5 El rol del SST6-2 en la patogénesis de *E. coli* patógenas

Como se mencionó anteriormente, los SST6 en *E. coli* se clasifican en tres categorías: SST6-1, SST6-2 y SST6-3. Si bien no hay una determinación en cuanto al tipo de

SST6 y su función, se sabe que en la mayoría de los casos detectados el SST6-2 se encuentra mayormente representado en cepas de *E. coli* patógenas con alta virulencia. La pérdida de funcionalidad de este sistema ha demostrado perjudicar la patogenicidad en el hospedador (112).

E. coli K1 cepa RS218, serotipo O18:H7 aislada de líquido cefalorraquídeo de un recién nacido codifica un SST6-2, donde la delección de los genes estructurales *evfB* y *hcp1* perjudicaron la invasión a células endoteliales de la microvasculatura cerebral humana (CEMCH) en relación a la cepa salvaje. Además, se reportó que Hcp1, un efector especializado, indujo reordenamiento de los filamentos de actina, apoptosis y liberación de interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8) en CEMCH (113). De manera similar, se reportó en APEC cepa SEPT362 aislada de pollo septicémico, que las mutantes *clpV* y *hcp* del SST6 mostraron una disminución de su capacidad de adherencia y reordenamiento de filamentos de actina en células epiteliales (114). Recientemente, un efector del SST6-2, KatN con actividad catalasa fue identificado en EHEC O157:H7 EDL933. KatN, una proteína secretada por la bacteria facilita el crecimiento de ésta en ambientes con estrés oxidativo. Esta proteína es translocada al citoplasma del macrófago por el SST6-2 cuando la bacteria es fagocitada. Este proceso resulta en una reducción de las especies reactivas de oxígeno, lo que promueve la supervivencia de EHEC dentro del macrófago (115). Además, el análisis del proteoma diferencial de sobrenadantes de cepas EHEC O157:H7 EDL933 salvaje y mutantes del SST6 reveló la existencia de 74 potenciales nuevos efectores, los cuales son secretados exclusivamente por el SST6 y representan una fuente de estudio para su caracterización y potencial implicancia en la subversión celular (115).

4.3.5.1 SST6-1, SST6-3 y efectores de *E. coli* con actividad antibacteriana

Los microbios pueden ocupar todos los hábitats imaginables de nuestro mundo, y cada microecosistema logra su homeostasis manteniendo el equilibrio relativo entre la composición de las especies y la ingesta nutricional (116). Sin embargo, muchos microbios patógenos pueden alterar el equilibrio del microecosistema y de esta manera facilitar su propia invasión a nuevos hábitats y posteriormente causar enfermedades graves (117). En este sentido han desarrollado diversos mecanismos de ataque que le otorgan ventajas adaptativas en el proceso de colonización, que incluyen la producción de antibióticos, la secreción e inyección de toxinas en células objetivo (118). En muchas bacterias Gram negativas, se ha descubierto que el SST6-1 funciona en este proceso mediante la translocación efectores tóxicos para la competencia interbacteriana (119).

La actividad antibacteriana del SST6 involucra un mecanismo de ataque y defensa cuando dos especies bacterianas con SST6 entran en conflicto. Estas interacciones llamadas “duelos SST6”, ocurren en un contexto de competencia, donde una inyecta sus toxinas en la otra. Si las bacterias son de la misma especie, la presencia de proteínas de inmunidad impide efectos antibacterianos, pero si son de especies diferentes y no presentan estas proteínas, la bacteria receptora puede ser eliminada. Esto se debe a que las proteínas con actividad tóxica suelen estar asociadas con proteínas de inmunidad que neutralizan su actividad, protegiendo así a la bacteria. Además, estas proteínas suelen estar codificadas en tándem en unidades bicistrónicas (120).

Hasta el momento los efectores del SST6 antibacterianos son divididos en: efectores que atacan la pared celular, la membrana, ácidos nucleicos y otras funciones biológicas (94).

Ma y colaboradores han aportado conocimiento en el campo de los efectores con actividad antibacteriana al revelar proteínas Rhs con dominios metalopeptidasa, DNasa, RNasa, deaminasa y fosfolipasa (107).

Se ha reportado que los SST6-1 y SST6-3 tienen actividades antibacterianas. El SST6-1 de *E. coli* codifica fosfolipasas río arriba del gen *vgrG* sugiriendo como se muestra para *V. cholerae*, que usan a la proteína VgrG como transportador para su translocación (121). Recientemente, se reportó que la proteína Tle1 de EAEC 17-2 es translocada por el SST6-1 a bacterias blanco donde ejerce su actividad fosfolipasa 1 y en consecuencia genera la lisis bacteriana. La cepa productora es protegida por la presencia de una proteína de inmunidad de alta afinidad por Tle1 (74).

Curiosamente, una inspección minuciosa de estos genes de fosfolipasa sugiere que pertenecen a familias diferentes: los SST6-1 de AIEC LF82 o UPEC CFT073 codifican fosfolipasas de la familia Tle3, mientras que los SST6-1 de EAEC 042 y APEC TW-XM codifican fosfolipasas Tle1 y Tle4, respectivamente (68).

El SST6-1 otorga una ventaja adaptativa frente a la competencia bacteriana, cuando es usado como componente clave en la translocación de efectores dentro de la bacteria presa. Esto resulta en la inhibición del crecimiento cuando estas compiten por un nicho (122).

4.4 Utilización del RNA-seq en el estudio de la interacción hospedador-patógeno

La transcripción de un subconjunto de genes en moléculas de RNA especifica la identidad celular y regula las actividades biológicas dentro de la célula. Conocidas colectivamente como el transcriptoma, estas moléculas de RNA son fundamentales para interpretar los elementos funcionales del genoma (123).

Inicialmente el estudio del transcriptoma de un organismo fue realizado por tecnologías basadas en microarray que fueron desarrolladas a mediados de 1990 (124). Los microarrays consisten en oligómeros de nucleótidos cortos, conocidos como "sondas", que se colocan sobre un sustrato sólido (por ejemplo, vidrio) y miden las abundancias de un conjunto definido de transcriptos mediante su hibridación a una matriz de sondas complementarias (125).

No obstante, el desarrollo de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (NGS) ha permitido estudiar el transcriptoma a través de la secuenciación de moléculas de RNA (RNA-seq) (126). Estos avances han permitido estudiar el transcriptoma de un organismo con mayor profundidad y resolución respecto a la tecnología de microarray. Además, las cantidades de RNA para su estudio son mucho menores para RNA-Seq (cantidad en nanogramos) en comparación con los microarrays (cantidad en microgramos), lo que permitió un examen más detallado de las estructuras celulares (127). Por este motivo los análisis de RNA-seq han adquirido un rol protagónico en el estudio de las interacciones hospedador-patógeno ya que proporcionan un medio poderoso para obtener información precisa sobre mecanismos adaptativos de los patógenos respecto a la respuesta inmune de las células eucariotas del hospedador (126). Se han reportado numerosos trabajos que han implementado la metodología de RNA-seq para comprender la interacción hospedador-patógeno.

Bordetella pertussis, el agente causante de la tos ferina, es un patógeno extracelular estrictamente humano. Sin embargo, se ha demostrado que las células de *B. pertussis* pueden escapar de la destrucción fagocítica y sobrevivir en macrófagos tras su internalización. Los datos de secuencia de RNA resueltos en el tiempo sugieren que *B. pertussis* se adapta eficientemente al entorno intramacrófago y responde a las actividades bactericidas del huésped (128). En patógenos como *Salmonella Typhimurium* se ha descrito un

estudio transcriptómico de la bacteria fagocitada por macrófagos murinos, en el cual se ha profundizado en el perfil de expresión diferencial de genes asociados con la sobrevivencia bacteriana frente a esas condiciones hostiles (129).

Poirier y colaboradores en el año 2008 demostraron que EHEC O157:H7 puede sobrevivir en macrófagos humanos THP-1 hasta 24 hs post fagocitosis (130) y ha reportado un estudio transcripcional de la bacteria fagocitada mediante la tecnología de microarray, obteniendo información relevante en cuanto a mecanismos adaptativos que se activan en respuesta a la acción del macrófago (130). Sin embargo, no se han reportado otros trabajos en EHEC O157:H7 que reporten el análisis transcripcional frente a la fagocitosis con respecto al estudio del SST6-2 y a la identificación de nuevos efectores.

5 . HIPÓTESIS

5.1 Hipótesis:

La adaptación de bacterias a nichos ecológicos depende no solo de circuitos regulados específicamente que adaptan el metabolismo y el crecimiento a las condiciones extracelulares, sino también de la liberación de moléculas al nicho que colonizan. Para facilitar su transporte a través de la barrera física que representan las membranas, las moléculas son seleccionadas específicamente y secretadas por maquinarias llamadas sistemas de secreción.

Particularmente postulamos como hipótesis global que los SST6-2 y SST6-1 de EHEC O157:H7 EDL933 y STEC O22:H8, respectivamente, les proporcionan ventajas adaptativas ante condiciones adversas, dependiendo del entorno que ocupan. Con base en esta premisa fundamental, formulamos las siguientes hipótesis como punto de partida:

- Basándonos en trabajos previos que han demostrado que EHEC O157:H7 EDL933 alberga un único SST6-2 en el genoma (68,115) y que este sistema está implicado en procesos patogénicos postulamos que la viabilidad de EHEC O157:H7 en fagosomas de macrófagos es dependiente del accionar y la expresión de genes específicos asociados al SST6-2, así como por la presencia de posibles efectores que podrían ser expresados y secretados hacia el citoplasma de la célula hospedadora favoreciendo su supervivencia.
- Se ha reportado que bovinos naturalmente colonizados con STEC O22:H8, evitan la colonización por parte de EHEC O157:H7 (18). Este fenómeno sugiere una competencia entre O22:H8 y EHEC O157:H7 por el mismo nicho. Esta observación nos impulsa a plantear la hipótesis de que el serotipo O22:H8 podría estar equipado con un SST6-1 y con potenciales efectores con dominios catalíticos, que podrían otorgarle actividad antibacteriana. Estas características le conferirían la capacidad de competir eficazmente con otras bacterias, entre ellas con EHEC O157:H7, por la colonización del nicho.

6 . OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

El propósito integral de este estudio es analizar la funcionalidad de los SST6-1 y 2 e identificar nuevos efectores vinculados a la patogénesis de STEC

Para probar las hipótesis mencionadas, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

6.2 Objetivos específicos:

1. Determinar la presencia de SST6 codificados en los genomas de EHEC O157:H7 y STEC O22:H8 mediante análisis bioinformático, predecir la naturaleza de su función y los posibles efectores asociados.
2. Caracterización bioinformática de potenciales efectores identificados en las cepas O157:H7 y O22:H8.
3. Generar cepas mutantes de EHEC O157:H7 mutantes del SST6 utilizando la metodología de edición génica CRISPR Cas9.
4. Realizar ensayos para determinar la función de los SST6 en EHEC O157:H7 y O22:H8, incluyendo pruebas de supervivencia en macrófagos y estudios de competencia interbacteriana.
5. Caracterizar la expresión génica del SST6 de potenciales efectores de EHEC O157:H7 frente a la respuesta específica del macrófago mediante ensayos de transcriptómica.

7 . MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

7.1 Cepas de *Escherichia coli*, condiciones de crecimiento bacteriano y plásmidos

Para el presente trabajo se utilizaron dos cepas de STEC pertenecientes a la colección de nuestro laboratorio cuyos genomas fueron secuenciados y se encuentran depositados en *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), EHEC O157:H7 cepa EDL933 (AE005174.2) y STEC O22:H8 cepa 154 (CP067426.1). Para el cultivo bacteriano, los aislamientos de STEC fueron crecidos en medio líquido luria bertani (LB) (LB, laboratorios Difco, EE. UU) o en placas de Petri con LB agar (1,5%), en condiciones aeróbicas, a 37 °C o a 30 °C cuando las condiciones lo requirieron. Cuando necesario, los medios de cultivo fueron suplementados con Ampicilina (Amp) 100 µg/ml; Cloramfenicol (Cm), 30 µg/ml o Kanamicina (Km) 50 µg/ml. La información de los plásmidos utilizados en este estudio puede ser visualizada en la tabla 1.

Tabla 1. Plásmidos utilizados en esta tesis doctoral

Nombre del plásmido	Tamaño (kb)	Origen de replicación	Genes de resistencia	Promotor(es)	Características generales	Tipo	Referencias
pCasRed	4,2	p15A	Cloranfenicol	pBAD	<i>Cas9, gam, bet, exo</i>	λ helper	(131)
pCRISPR-SacB	2,4	pBR322	Kanamicina		<i>sacB</i>	clonado	(131)
pGEM-T	3	f1	Ampicilina	-	<i>lacZ</i>	clonado	Promega
pTrcHisB	4,4	pBR322	Ampicilina	pTrc; lac O	-	expresión	ThermoFisher
pBAD 18	4,5	pBR322	Ampicilina	araBAD	-	expresión	ThermoFisher
pSEVA 2513	4,5	pBR322	Gentamicina	pj23119	-	expresión	(132)

7.2 Línea celular y condiciones de crecimiento

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, provista por el servicio de células del Instituto de Virología de CCVyA-INTA, fueron mantenidas a 37 °C, en una atmósfera que contiene 5% de CO₂ en medium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, EE. UU) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Interne-gocios, Argentina) y 100 µg/ml gentamicina cuando fuese necesario.

7.3 Reacciones de PCR

Las amplificaciones de ADN se realizaron con las condiciones de ciclado indicadas en la tabla 2. La etapa de hibridación es la única que tuvo que ser modificada en su temperatura para adaptarse a los requerimientos de cada gen.

Tabla 2. Condiciones generales de reacciones de PCR

Reactivos	Concentración final	Ciclado
Buffer 5X	1X	95 °C 5 min
dNTPs	0,8 mM	94 °C 30 seg
MgCl₂	2,5 mM	50, 53, 54 o 58 °C según gen 30 seg
Primers 20 µM	0,3 µM	
GoTaq	1,25 U	72°C 30 seg X 30 ciclos
ADN templado	0,5 pmol/µl	
Volúmen final de la reacción= 50 µl		72 °C 5 min

7.4 Preparación de *E. coli* DH5 α quimicompetentes

Se realizó un cultivo *overnight* 1:100 de *E. coli* DH5 α en 3 ml de medio de cultivo LB a 37 °C con una agitación de 200 rpm. Posteriormente, se realizó un inóculo (1:100) en 250 ml de LB se cultivó a 37 °C en agitación, hasta DO_{600nm} de 0,4 – 0,5. Una vez alcanzada la DO requerida se incubó el cultivo en hielo por 15 minutos. Luego el cultivo fue centrifugado por 10 minutos a 4.000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en 10 ml de TFB I (30 mM de Acetato de potasio, 400 mM de Cloruro de potasio, 10 mM de Cloruro de calcio, 50 mM Cloruro de manganeso) a un pH de 5,8 y se centrifugó por 10 minutos a 4.000 rpm 4 °C. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 ml de TFB II (10 mM de MOPS, 75 mM de Cloruro de calcio, 10 mM de Cloruro de Potasio y 10% de Glicerol) a un pH de 6,5. Se realizaron alícuotas de 200 μ L en eppendorfs de 1,5 ml y se conservaron a -80 °C.

7.5 Metodología de edición génica CRISPR/Cas9

Los ensayos de edición génica fueron realizados sobre la cepa EHEC O157:H7 EDL933.

7.5.1 Selección de la región PAM del gen a mutar

Para proceder con la metodología de CRISPR/Cas9, inicialmente se identificó la región PAM (*protospacer adjacent motif*) (5'-NGG-3') dentro del gen a mutar más cercana al extremo 5'. Para este propósito se utilizó el software online CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no>). Una vez seleccionada la región PAM con mayor eficiencia de corte para la Cas9 y sin off target se procedió a diseñar el ADN guía y el ADN donador para la mutagénesis con CRISPR/Cas9.

7.5.2 Diseño del ADN guía (ADNg)

Se generó un fragmento de ADNg dirigido contra la región PAM seleccionada, el cual fue luego clonado en el vector pCRISPR-SacB-ADNg.

El diseño del ADNg comenzó identificando la región PAM más cercana al extremo 5' sobre el gen que se desea mutar (5'-NGG-3, donde la "N" representa cualquiera de los cuatro nucleótidos). Luego, se seleccionaron 30 pb río arriba de la región PAM (Figura 9).

Para evitar efectos off-target de la enzima Cas9 se hizo un BLAST del ADNg contra el genoma de EHEC O157:H7 EDL933.

Finalmente, después de haber seleccionado la región PAM y el protospacer (30 pb), se agregaron nucleótidos en los extremos para facilitar la ligación en el subsecuente clonado en el plásmido pCRISPR-SacB. En el extremo 5' del forward ADNg se agregan cuatro nucleótidos (AAAC), mientras que en el extremo 3', la secuencia PAM (NGG) se reemplaza y se agrega solo un nucleótido (G). Por otro lado, se diseñó el primer reverse por complementariedad de bases con el forward. En el extremo 5' del reverse ADNg se agregan cinco nucleótidos (AAAAC) (Figura 9) (Ver tabla 3).

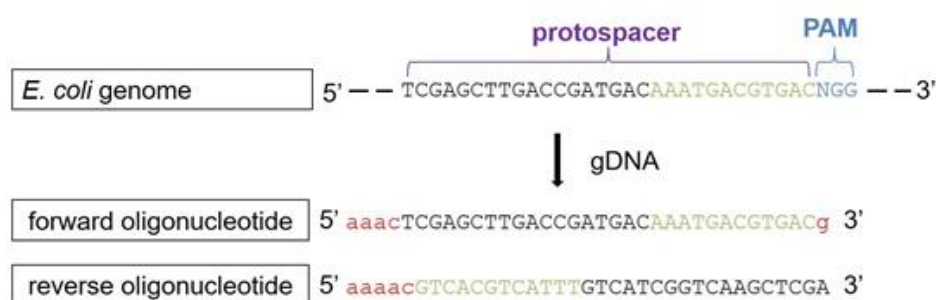


Figura 9. Ilustración sobre el diseño del ADNg para la mutagénesis del gen mediante selección de un sitio blanco para la enzima Cas9. A partir de la elección de la región PAM con mayor eficiencia de corte según el software CHOPCHOP, se seleccionan 30 pb río abajo. Al forward se le añaden 4 nucleótidos (AAAC) en el extremo 5' y un nucleótido (G) en el extremo 3'. Por otro lado, al reverse se le añaden 5 nucleótidos (AAAAC) en el extremo 5' (Ver tabla 3).

Tabla 3. Diseño de ADNg utilizados para la edición génica de *clpV* y *tssB* en EHEC O157:H7 EDL933

Nombre	Secuencia	Largo (nt)
ADNg <i>clpV</i> (Forward)*	AAACGTCGGCTGAGATGCAGCACAGCGAACTGCGG	35
ADNg <i>clpV</i> (Reverse)*	AAAACCGCAGTTCGCTGTGCTGCATCTCAGCCGAC	35
ADNg <i>tssB</i> (Forward)*	AAACTATCGTATGTCCCAAAAACAGATGGCCAGAG	35
ADNg <i>tssB</i> (Reverse)*	AAAACTCTGGCCATCTGTTTTTGGGACATACGATA	35

* primers hechos en este trabajo

7.5.3 Clonado de ADNg en el plásmido pCRISPR-SacB

7.5.3.1 Fosforilación e hibridación de primers ADNg

Para clonar el ADNg en el plásmido pCRISPR-SacB, es necesario fosforilar e hibridar los primers complementarios utilizando la enzima T4 Polynucleotide Kinase (PNK) (New England Biolabs). Para este proceso, se toma 1 µl de cada primer forward y reverse, y se agrega 1 µl de la enzima T4 PNK junto con su correspondiente buffer, completando el volumen hasta 25 µl con agua destilada. La mezcla se incuba durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, se añaden 1,25 µl de NaCl 1M a la mezcla para favorecer la hibridación de los primers, y se calienta a 95 °C durante 5 min. Luego, se deja enfriar a temperatura ambiente.

7.5.3.2 Digestión del plásmido pCRISPR-SacB

Antes de clonar el ADNg en el plásmido pCRISPR-SacB, es necesario digerir y fosforilar este último. Para ello, 7 μ l de pCRISPR-SacB (160 ng/ μ l) se digirieron con 1 μ l de la enzima de restricción Bsa I de New England Biolabs, utilizando el buffer correspondiente y completando el volumen hasta 50 μ l con agua destilada. La reacción se incubó durante 16 horas a 37 °C. Posteriormente, la mezcla se separó en un gel de agarosa al 1,5% y se purificó la banda correspondiente al plásmido pCRISPR-SacB digerido (lineal). La purificación de la banda de agarosa que contenía el plásmido se llevó a cabo utilizando el kit Easy Pure Quick Gel Extraction de Transgene. El plásmido purificado se cuantificó en un nanodrop y se dejó listo para su defosforilación.

7.5.3.3 Defosforilación del plásmido pCRISPR-SacB

El plásmido pCRISPR-SacB previamente digerido fue defosforilado para prevenir su recircularización. Se tomaron 35 μ l del plásmido pCRISPR-SacB (35 ng/ μ l) previamente digerido y se trató con 1 μ l de la enzima Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) de New England Biolabs, utilizando el buffer correspondiente y completando el volumen hasta 50 μ l con agua destilada. La mezcla fue incubada durante 5 hs a 37 °C.

7.5.3.4 Clonado del ADNg fosforilado e hibridado en el plásmido pCRISPR-SacB defosforilado y digerido

Inicialmente se realizó el clonado del ADNg previamente fosforilado e hibridado, en el plásmido pCRISPR-SacB digerido y defosforilado. Para esto, 1,5 μ l del plásmido pCRISPR-SacB (30ng/ μ l) fue incubado con 5 μ l del ADNg junto con la enzima T4 ligasa

(New England Biolabs) más buffer y agua suficiente para un volumen de 20 μ l. La mezcla fue incubada durante 16 hs a 15 °C.

El resultante constructo pCRISPR-*SacB*-ADNg fue usado para transformar competentes químicas *E. coli* DH5- α , las cuales fueron sembradas en medio sólido LB agar suplementado con kanamicina.

La correcta inserción del ADNg fue chequeada por PCR *colony*. Aquellas colonias que de *E. coli* DH5- α que fueron positivas fueron crecidas en medio LB con kanamicina. Posteriormente el plásmido pCRISPR-*SacB*-ADNg fue purificado con el kit de miniprep (EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit).

7.5.4 Diseño de ADN donor (ADNd)

El ADNd es una construcción lineal de 70 pb diseñado para introducir un codón STOP y eliminar 30 pb dentro del gen blanco mediante un evento de recombinación homóloga que a su vez remueve el protospacer y la secuencia PAM (NGG).

Una vez que se ha identificado la secuencia PAM se diseñan dos primers complementarios entre sí de 70 pb, forward y reverse. Para este fin se seleccionan 35 pb río arriba de la región PAM sin incluirla y otros 35 pb río abajo del protospacer, de manera que los brazos del ADNd hibriden contra el gen blanco y eliminen 30 pb e incorporen un codón STOP por un evento de recombinación homóloga mediado por el sistema λ red (Figura 10) (Ver tabla 4).

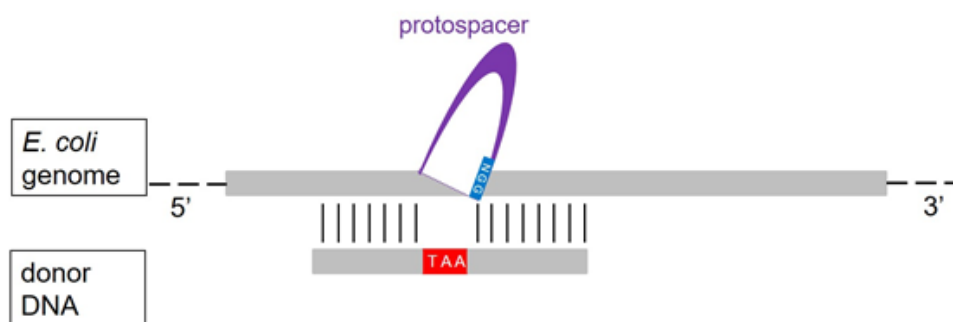


Figura 10. Esquema del diseño del ADNd. Para eliminar el protospacer y la secuencia PAM (NGG) identificada por la Cas9 para el clivaje, el extremo 5' del ADNd debe hibridar 35 nucleótidos a la secuencia que se encuentra río abajo del protospacer y PAM (sin incluirla), mientras que la región 3' del ADNd debe hibridar con 35 nucleótidos río arriba del protospacer. Para inactivar el transcripto un codón stop debe ser insertarse en el marco de lectura y la región PAM debe ser eliminada para prevenir futuros clivajes por Cas9.

Finalmente, el ADNd es generado al hibridar 5 µl de cada primer, forward y reverse, en un volumen final de 20 µl a 95 °C durante 5 minutos lo que va a permitir que los oligonucleótidos hibriden por complementariedad de bases dando lugar a la doble hebra de ADNd.

Tabla 4. Diseño de ADNd utilizados para la edición génica de *clpV* y *tssB* en EHEC O157:H7 EDL933

Nombre	Secuencia	Largo (nt)
ADNd <i>clpV</i> (Forward)*	TGAGTGGCTTAAAGA- GGGCTGGCTGCTGGCGTC TAA CGGCGTGTT- GCTGCTGGCCTTGCTGCATTCGCCG	70
ADNd <i>clpV</i> (Reverse)*	CGGCGAATGCAGCAAGGCCAGCAGCAACACGCCGT- TAGACGCCAGCAGCCAGCCCTCTTTAAGCCACTCA	70
ADNd <i>tssB</i> (Forward)*	AAGGCAGCGTCGCGCCTCGCGAACGTAT TA ATA- TAACTGAAGTGGAAGTTCCGCTTAACATGCTCGTTGT	70
ADNd <i>tssB</i> (Reverse)*	ACAACGAGCATGT TA AGCGGAAGTTCCACTTCAGT- TATATTAATACGTTTCGCGAGGCGGACGCTGCCTT	70

* primers hechos en este trabajo

7.5.5 Transformación de EHEC O157:H7 EDL933 pCasRed-Cas9 + pCRISPR-SacB-ADNg+ADNd

Para iniciar la edición génica por CRISPR/Cas9, la cepa EHEC O157:H7 pCasRed-Cas9 (Cm^r) fue transformada por electroporación con el plásmido pCRISPR-SacB-ADNg (Km^r) y el ADNd (Figura 11).

Para este fin se llevó a cabo un cultivo EHEC O157:H7 pCasRed-Cas9 (Cm^r) durante 16 horas a 37°C y 200 revoluciones por minuto (rpm) en medio líquido suplementado con cloranfenicol. Posteriormente, se realizó un subcultivo utilizando una dilución 1:100 en medio fresco LB, el cual se dejó crecer a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 600 nm (DO₆₀₀) de 0,2. Se agregó L-arabinosa (0,2%) para inducir la expresión del sistema λ red y Cas9 que se encuentran bajo un promotor pBAD en el plásmido pCasRed, y se permitió crecer hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6.

Las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 4000 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavaron con 50 ml de glicerol al 10% frío. Posteriormente, se centrifugó durante 20 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se repitió este proceso de lavado con glicerol en tres ocasiones más. Finalmente, las células se resuspendieron en 4 ml de glicerol al 10%.

Para la transformación por electroporación, se utilizaron 40 μ l de la suspensión bacteriana en glicerol al 10% más 3 μ l del plásmido pCRISPR-SacB-ADNg (150 ng/ μ l) y 20 μ l de ADN hibridado. Las bacterias fueron sometidas a un pulso eléctrico de 2,5 kV, 200 Ω y 25 μ F en cubetas de electroporación de 2 mm (BioRad), utilizando un electroporador BioRad Micro Pulser. Posteriormente, las bacterias transformadas fueron recuperadas con 1 ml de medio LB e incubadas durante 2-3 horas a 30 °C y 200 rpm. Finalmente, las bacterias fueron sembradas en medio sólido LB agar suplementado con cloranfenicol y kanamicina.

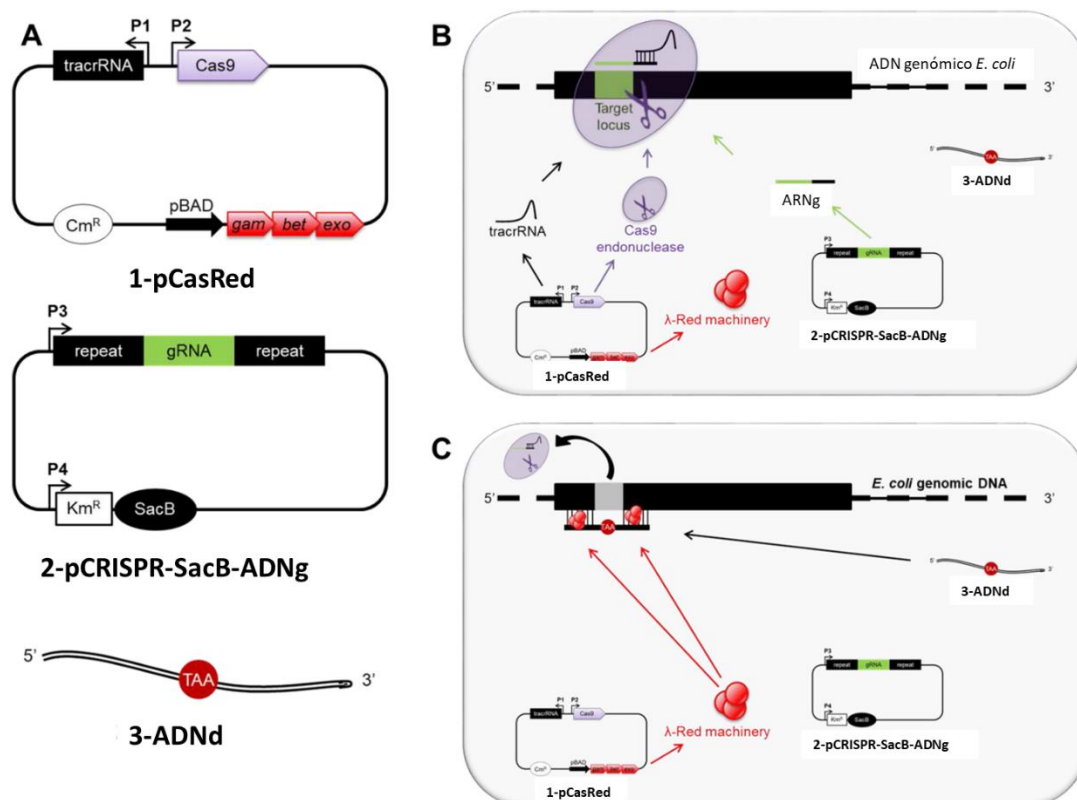


Figura 11. Descripción general de la estrategia de edición genética CRISPR/Cas9 en EHEC O157:H7 EDL933. En (A) se muestra los tres componentes requeridos para la edición genética en EHEC: 1) el plásmido pCasRed que codifica el sistema λ red (Exo, Beta, Gam), la endonuclease Cas9 y tracrARN (ARN trans activador de CRISPR); 2) el plásmido pCRISPR-SacB-ADNg que codifica el ARNg y el gen SacB; 3) un ADNd sintético. Después de la transformación, el tracrARN se hibrida con el ARNg, que especifica el sitio de escisión de Cas9, lo que da como resultado un complejo de tres componentes en el locus objetivo, donde la actividad endonucleasa media la rotura de la doble cadena del ADN cromosómico (B). La ruptura de la doble hebra es reparada por el sistema λ red por medio de recombinación homóloga que tiene lugar entre los extremos del ADN cromosómico escindido y el ADNd (C).

7.5.6 Detección de clones mutantes por *colony* PCR

El evento de mutagénesis se evaluó mediante *colony* PCR en la cepa EHEC O157:H7 pCASRED-Cas9 transformada con el plásmido pCRISPR-SacB-ADNg y ADNd y crecidas durante 16 hs a 37 °C en placas de LB (Km+Cm). Se diseñaron primers específicos que flanquean la región del protospacer y PAM, lo que resulta en un amplicón

de aproximadamente 200 pb (Ver tabla 5). Este tamaño de amplicón es ideal para distinguir una diferencia de 30 pb entre el genotipo salvaje y mutante en un gel de agarosa 2%. Los amplicones derivados de clones mutados mostrarán mayor recorrido en el gel de agarosa respecto al salvaje (Figura 12).

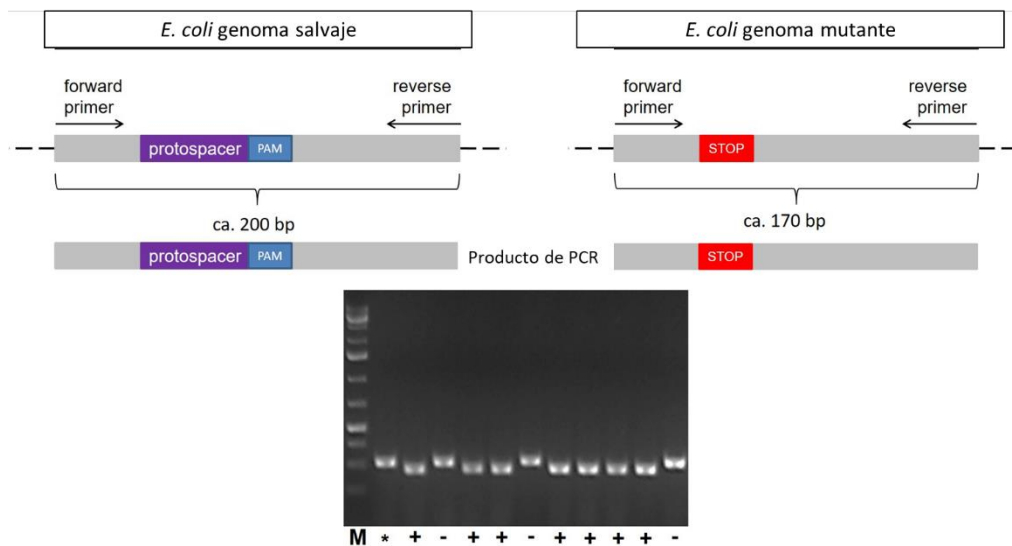


Figura 12. Esquema de colony PCR. Los primers forward y reverse son diseñados para que hibriden río arriba y río abajo de la secuencia protospacer y PAM respectivamente, resultando en la amplificación de un fragmento aproximado de 200 pb en el genotipo salvaje y 170 en el mutante. Acorde al tamaño de la deleción de 30 pb el tamaño del amplicón mutante (170 pb) (+) es más corto que el salvaje (200) (-). Los amplicones pueden discriminarse en un gel de agarosa 2%.

Tabla 5. Primers para la detección por colony PCR las mutantes *clpV* y *tssB* en EHEC O157:H7 EDL933 obtenidas por CRISPR/Cas9

Nombre	Secuencia	Largo (nt)
PCR <i>clpV</i> (Forward)*	GTAGAGAACTACACAACCGCCC	22
PCR <i>clpV</i> (Reverse)*	GTCCACTGCACAAAGTCCTGT	21
PCR <i>tssB</i> (Forward)*	AAAAATTTGAAGGCAGCGTC	22
PCR <i>tssB</i> (Reverse)*	ATATTCAGCGCCACATTCATTT	22

* primers hechos en este trabajo

7.6 Ensayos de sobrevida de EHEC O157:H7 EDL933 en macrófagos murinos RAW 264.7

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 fueron sembradas en 1×10^6 por pocillo en una placa de 12 pocillos y co-incubadas con un cultivo bacteriano de EHEC O157:H7 EDL933 en fase exponencial con una DO_{600} 0,6 nm y a una multiplicidad de infección (MOI)=100. Para sincronizar la infección, se centrifugó la placa a 400 g durante 5 minutos y se incubó por 30 minutos (tiempo 0h) a 37 °C y 5% CO_2 . Posteriormente la monocapa de células infectadas fueron lavadas tres veces con PBS 1X y posteriormente se agregó medio DMEM + SFB 10% suplementado con 100 µg/ml de gentamicina con la finalidad de eliminar las bacterias extracelulares, no fagocitadas. Después de 2 hs de incubación a 37 °C y 5% CO_2 , las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X y lisadas con una solución de SDS 0,025% y luego diluido en PBS 1X para hacer recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) en placas de LB agar.

Para ensayar la sobrevida intracelular de la bacteria, se reemplazó el medio por DMEM +SFB 10% conteniendo 15 µg/ml de gentamicina y se incubaron 24 hs a 37°C y 5% CO_2 para cuantificar finalmente el recuento bacterias de viables y determinar un porcentaje de sobrevida y relativo al obtenido a las 2hs (determinado como el 100 %).

7.7 Microscopía confocal de fluorescencia

Se visualizó por microscopía confocal de fluorescencia la sobrevida intracelular de EHEC O157:H7 EDL933 en macrófagos murinos RAW 264.7 luego de 24 hs de incubación. Para ello se siguió el mismo protocolo de infección de células RAW 264.7 para evaluar la sobrevida.

Las células fueron crecidas sobre cover slips en placa de 12 pocillos. Antes de iniciar la infección de células RAW 264.7, 1 ml de cultivo bacteriano en fase exponencial

con una DO_{600} de 0,6 fue centrifugado a 4000 rpm durante 3 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó con PBS 1x. Luego el pellet bacteriano fue resuspendido en 995 μ l de PBS 1x e incubado con 5 μ l de *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) (Termo Fisher) por 30 minutos y posteriormente se procedió a infectar la monocapa de macrófagos con una $MOI=100$. Después de la incubación durante 24 hs, la monocapa de células RAW 264.7 infectada con EHEC O157:H7 EDL933 fue fijada con paraformaldehído (PFA) 4% (Sigma-Aldrich) en PBS 1X durante 20 minutos. Posteriormente se lavó 3 veces la monocapa con PBS 1X y se procedió a permeabilizar las células agregando 200 μ l/pocillo de Tritón 0,15% (Sigma-Aldrich) y dejándolo actuar durante 15 minutos. Luego de la incubación se agregó 200 μ l/pocillo de BSA 1% para bloquear y evitar pegado inespecífico dejando actuar durante 15 min. Por último, se realizó la marcación con el anticuerpo primario Lysosome-associated membrane glycoprotein 3 (LAMP3) (Termo Fisher) diluido en PBS 1X (1:50) incubándolo durante 1,5 horas y luego de tres lavados con PBS 1X se agregó el anticuerpo secundario Cy5 diluido en PBS 1X (1:600) incubándolo 1,5 horas. Finalmente, los cover-slips fueron lavados tres veces con PBS 1X y montados sobre portaobjetos y sellados con VectaShield. Las muestras fueron visualizadas por microscopio confocal de fluorescencia laser de barrido (CLSM), Leica Sp5.

7.8 Aislamiento de RNA de EHEC O157:H7 fagocitada por macrófagos murinos RAW 264.7

Se realizó un ensayo de transcriptómica mediante la metodología de *RNA-seq* para obtener el perfil de expresión génica de EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada por los macrófagos murinos RAW 264.7 a las 2 hs post-infección (Figura 13 A). Para esto se replicó la misma metodología de infección de monocapa de células RAW 264.7 como se describió previamente. Para obtener buena cantidad de RNA procariota, se realizaron pools de placas, donde 6 placas de 12 pocillos corresponden a una réplica biológica y se realizaron

3 réplicas biológicas, lo que resultó en un volumen total de trabajo de 18 placas. Todos los pocillos contenían 1×10^6 células RAW 264.7 con una confluencia cercana al 90%. La infección de la monocapa celular se realizó con un cultivo bacteriano de EHEC con una DO_{600} 0,6 para obtener una $MOI=100$.

A las 2 hs post infección, los macrófagos infectados fueron lisados en frío con una solución de lisis diferencial estabilizadora de RNA (0,025 % SDS, 19 % etanol y 1 % fenol) e incubada en hielo durante 30 minutos. El lisado conteniendo EHEC intracelular fue colectado por centrifugación a 4100 rpm, 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado tres veces con una solución compuesta por 19% etanol y 1 % fenol. Luego, el pellet celular fue disuelto en 1 ml de Trizol (TransGene) en hielo. Se agregaron 200 µl de cloroformo y se centrifugaron las muestras a 10000 xg, 4°C durante 15 minutos. Luego, se transfirió la fase acuosa y se procedió a realizar la purificación del RNA total siguiendo las indicaciones del kit Monarch Total RNA Miniprep (New England Biolabs). Para enriquecer la muestra con el RNA bacteriano se realizó un segundo paso de purificación de RNA empleando el kit MICROB*Enrich* (Ambion). El RNA purificado se resuspendió en agua y se almacenó a -80 °C hasta la construcción de la biblioteca de cDNA. La integridad del RNA fue verificada usando un Agilent Bioanalyzer 2100 y la concentración medida usando el fluorómetro Qubit.

El RNA control se aisló de EHEC O157:H7 EDL933 crecida en las mismas condiciones de infección, en medio DMEM+SFB 10% durante 2 hs de incubación. El proceso de infección, preparación de RNA, secuenciación y análisis fueron realizados por triplicado.

7.9 Aislamiento de RNA de EHEC O157:H7 bajo condiciones de estrés

Se expuso EHEC O157:H7 a condiciones de estrés *in vitro* para evaluar los niveles de transcripción de ARN (Figura 13 B). El cultivo de EHEC O157:H7 se cultivó hasta una DO₆₀₀ de 0,6 y se centrifugó a 4.000 rpm durante 5 minutos. Luego, las bacterias se lavaron tres veces con PBS antes de agregar medio mínimo M9, un medio sin fuentes de carbono agregadas para recrear un ambiente libre de nutrientes. El medio se complementó con peróxido de hidrógeno 800 mM para generar estrés oxidativo y bipyridil 400 µM como quelante de cationes divalentes (115). La condición de crecimiento fue a pH 4,5 para generar estrés ácido y baja tensión de oxígeno (43). Esta condición se logró cubriendo el tubo con el medio mínimo de cultivo y sin agitar para evitar la aireación. El ARN total se extrajo de los cultivos incubados durante 2 hs en las condiciones descritas. Se realizó por triplicado

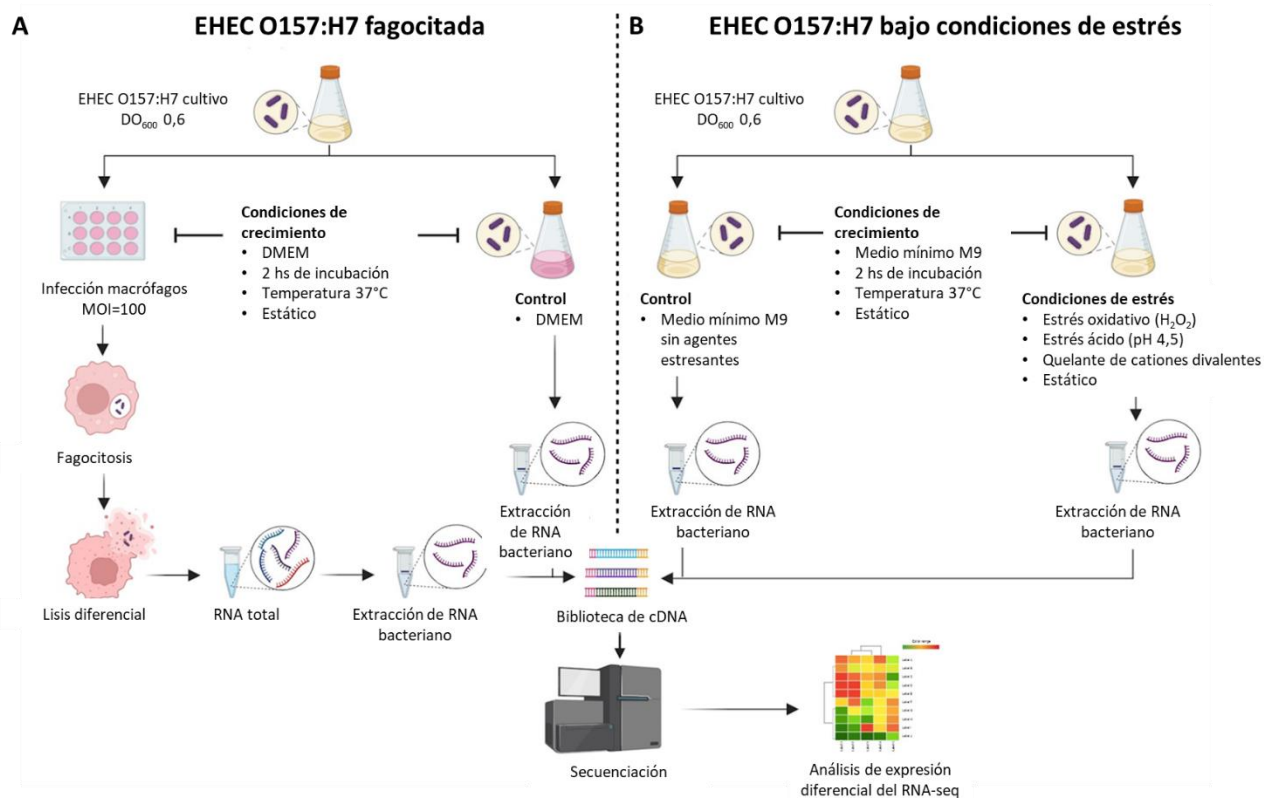


Figura 13. Diseño experimental para RNA-seq de EHEC O157:H7 fagocitada y expuesta a estrés.

A) EHEC O157:H7 fagocitada. Se incubó un cultivo fresco de EHEC O157:H7 con macrófagos a MOI = 100 durante 2 hs con gentamicina (ensayo de protección de gentamicina). Las bacterias fagocitadas se recuperaron mediante lisis diferencial. Luego se extrajo el ARN con TransZol. El ADNc generado se secuenció para el análisis de expresión diferencial y los datos se compararon con EHEC cultivado en medio DMEM (control).

B) EHEC O157:H7 en condiciones de estrés. En condiciones de estrés, EHEC O157:H7 se sometió a un período de incubación de 2 hs en medio mínimo M9, diseñado para simular un ambiente de fagosoma tardío. Posteriormente, se realizó la extracción de ARN mediante el método TransZol. El ADNc resultante se sometió a secuenciación para análisis de expresión diferencial y luego los datos obtenidos se compararon con los perfiles de expresión génica de EHEC cultivadas en condiciones de control en medio mínimo M9, sin ningún factor estresante.

7.10 Preparación de la biblioteca de cDNA y profundidad de secuenciación

El RNA total obtenido de las réplicas biológicas fue tratado inicialmente con Ribo-Zero Plus rRNA depletion Kit (Illumina Inc., USA) para eliminar el rRNA. A través de la metodología de Ribo-Zero Plus se elimina el abundante rRNA del RNA total mediante hibridación dirigida a sondas de DNA y posterior escisión mediada por RNasa H.

Luego del tratamiento con Ribo-Zero las muestras fueron cuantificadas con Qubit y analizadas con Fragment Bioanalyzer. Para la construcción de las bibliotecas de cDNA se siguió el protocolo de Truseq de Illumina para preparar bibliotecas de DNA de 300 pb – 500 pb *single end*.

Durante el proceso de construcción de la biblioteca de cDNA, el RNA total se fue fragmentado químicamente a una longitud de aproximadamente 300 pares de bases (pb), según indicaciones del protocolo Illumina. Luego, se generó una hebra de cDNA monocatenario utilizando *random* primers. Posteriormente, se sintetiza la segunda hebra de cDNA para producir una molécula de cDNA de doble cadena, que está lista para el flujo de trabajo de la construcción de la biblioteca TruSeq. Se agrega una base A a cada fragmento para permitir la unión de los adaptadores. Cada adaptador contiene una base -T en su extremo 3', proporcionando un extremo complementario para la unión a cada fragmento con el extremo A. Cada adaptador tiene una secuencia característica llamada índice que permite reconocer a cada muestra.

Los cDNAs fueron purificados por beads magnéticas y analizadas por electroforesis capilar en Fragment Analyzer.

Finalmente, las muestras fueron secuenciados en la plataforma Illumina NextSeq 500 del servicio de secuenciación del Hospital Gutiérrez, de la ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina. Se calcularon entre 10 y 70 millones de *reads* para aumentar la

profundidad de secuenciación y obtener el transcriptoma de EHEC expuesta a condiciones de estrés *in vitro* y fagocitada, respectivamente.

7.11 Ensayos de competencia interbacteriana

Para determinar la actividad antibacterial por parte del SST6 se realizaron ensayos de competencia interbacteriana. Para esto cultivos de EHEC O157:H7 EDL933 salvaje y mutantes del SST6, DH5- α y STEC O22:H8 fueron crecidas en cultivo líquido LB durante 16 hs a 37 °C y 200 rpm y luego diluidos hasta una DO₆₀₀ 0,6 en LB. Las bacterias fueron centrifugadas a baja revoluciones (6000 rpm) durante 5 minutos y lavadas tres veces con PBS 1X para eliminar los residuos de antibióticos. La cepa predadora se mezcló con la cepa presa en una relación predador:presa igual a 3:1. Se sembraron 25 μ l de la mezcla en forma de gota sobre LB agar y se incubó durante 16 hs a 37°C. Posteriormente, los puntos de siembra fueron cortados y resuspendidos en 1 ml de PBS 1X estéril. Se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en LB agar conteniendo antibiótico para seleccionar a las cepas presas resistentes. Finalmente, las colonias de las cepas presas sobrevivientes fueron cuantificados por recuento de UFC y los resultados se expresaron como log₁₀ UFC/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado.

7.12 Clonado y expresión de proteínas

El gen *hcp-2* y *hcaE* de EHEC O157:H7 cepa EDL933 fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) y subsecuentemente la construcción obtenida fue transformada en *E. coli* XL-1 (transformantes químicas). El plásmido pGEM-T-efector se purificó a partir de cultivos de 16 hs de colonias transformantes. La construcción pGEM-T-efector se digirió con las enzimas de restricción BamHI y HindIII (ambas de Promega), y el gen se subclonó en los plásmidos pTrcHisB, pBAD18 y pSEVA, el cual le fusiona a la

secuencia codificante los epítopes His6 en el extremo C-terminal. El vector pTrcHisB posee una secuencia promotora inducible por IPTG, pBAD18 es inducible por L-arabinosa y pSEVA de expresión constitutiva. Se transformaron bacterias competentes DH5- α y EHEC O157:H7 EDL933 y luego se evaluó la expresión de las proteínas por *Western Blotting*. Las construcciones fueron confirmadas por PCR y por medio de secuenciación de Sanger en la unidad genómica de IABIMO de CCVyA-INTA-CONICET.

La expresión de pTrc-efector-His6 se obtuvo por la adición de IPTG 0,5mM a un cultivo de *E. coli* DH5- α y EHEC O157:H7 EDL933 crecidas en 20 ml de medio líquido LB hasta una $DO_{600} = 0,5$ en presencia de ampicilina (100 μ g/ml). Luego de 4 hs de incubación en agitación a 37°C se tomó 1 ml del cultivo bacteriano en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml estéril, se centrifugó a 5000 rpm durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer desnaturalizante. En el caso de la construcción pBAD18-efector-His6, el procedimiento fue el mismo, la única diferencia fue que se agregó 0,2% de L-arabinosa para la inducción. En el caso de la construcción pSEVA-efector-His6 no fue necesaria la inducción porque el plásmido es constitutivo.

Se evaluó la secreción de Hcp-2 en la cepa EHEC O157:H7. Para este fin se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos a 4°C el cultivo líquido bacteriano a las 4 hs de inducción. El sobrenadante se filtró con filtros de 0,22 μ m (Biofil Jet) y se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 16 hs a 4°C. Luego el sobrenadante fue centrifugado a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C, el sobrenadante retirado y el precipitado fue lavado con acetona 1 ml de acetona, por duplicado. Finalmente, se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos a 4°C para eliminar el remanente de acetona. Por último, el precipitado fue resuspendido en 50 μ l de buffer de carga.

Tabla 6. Primers utilizados para el clonado de Hcp 2 y Hcae

Nombre	Secuencia	Largo (nt)
Hcp 2-F *	GCTCGAGAAGCAA- AAAATTG	20
Hcp 2-R*	GGTACCTTTATTGCTCACCT	20
Hcae -F*	GGATCCGACCACACCCT- CAGA	21
Hcae-R*	AAGCTTCCTTTCATCAC- CTCCT	21

* primers hechos en este trabajo

7.13 Electroforesis SDS-PAGE y *western blotting*

La identificación de las proteínas HcaE-His y Hcp-2-His se realizó de manera específica utilizando anticuerpos específicos anti-histidina (Mouse Mab Anti-polyHistidine H1029, Sigma-Aldrich) y un anticuerpo secundario (IgG Anti mouse-peroxidase A9044, Sigma-Aldrich) conjugado con peroxidasa empleando los reactivos.

Se sembraron las proteínas HcaE y Hcp-2 en un gel de poliacrilamida SDS-page 10%. Luego de la separación electroforética de las proteínas, se utilizó el sistema de transferencia para geles Mini Trans-Blot™ (BioRad). Los geles se sumergieron en buffer de transferencia (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, glicina 196 mM, CH₃OH 20%) y se utilizó una membrana de nitrocelulosa (Whatman™, Protran BA 83. GE Healthcare Life Sciences). La transferencia se llevó a cabo a 200 mA durante 1 hora. Una vez transferidas las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau (Rojo Ponceau 650 mM, CH₃COOH 1%) para confirmar la correcta transferencia de las proteínas.

Posteriormente, la membrana transferida se incubó en solución de bloqueo (solución de leche en polvo al 5%, Tween 20 0,05% en buffer PBS 1X) durante toda la noche

a 4 °C, y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario en una dilución 1:3000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado (Buffer PBS 1X y Tween 20 0,05%). Luego se incubó con el anticuerpo secundario en una dilución 1:1000 durante 1 hora. Nuevamente se realizaron 3 lavados. Se reveló la membrana utilizando los sustratos ECL Western Blot (ThermoFisher Scientific).

7.14 Análisis bioinformático

7.14.1 Identificación *in silico* del cluster del SST6 en STEC

Para la identificación de los SST6 en EHEC O157:H7 EDL933 y O22:H8 154 se utilizó la base de datos Secret6 (<https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/SecReT6/index.php>). Una base de datos curada que alberga todos los SST6 y efectores de un gran número de patógenos Gram negativos.

7.14.2 Identificación de dominios catalíticos de potenciales efectores del SST6

La identificación de potenciales efectores del SST6 fue realizada con el software pfam (<http://pfam.xfam.org/>) y Batch Web CD Search-Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>). Además, se realizaron ensayos de modelado molecular con los software Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) y Phyre2 (<https://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) complementados con HHPRED (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>) para la predicción de la estructura. Las secuencias proteicas fueron analizadas con el servidor Bastion 6, una base de datos curada predictor de efectores del SST6 (<https://bastion6.erc.monash.edu/>). Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) fue usado para identificar proteínas homólogas.

7.14.3 Proksee

Proksee es una plataforma online que permita visualizar y analizar de manera integral genomas bacterianos (<https://proksee.ca/>).

7.14.4 Alien hunter

Alien_hunter es una aplicación para la predicción de posibles eventos de transferencia horizontal de genes (HGT) (https://www.sanger.ac.uk/tool/alien_hunter/).

7.14.5 MobileOG-db

MobileOG-db es una base de datos exhaustiva que contiene 6,140 familias de proteínas curadas manualmente, relacionadas con el ciclo de vida de los elementos genéticos móviles (MGEs) bacterianos. Estas familias de proteínas están vinculadas a procesos como integración, escisión, replicación/recombinación/replicación, transferencia y estabilidad/defensa de los MGEs. MobileOG-db está disponible en mobileogdb.flsi.cloud.vt.edu

7.14.6 Localización subcelular de proteínas

Para la predicción de la localización subcelular de proteínas se utilizó la base de datos PSORTb 3.0 (<https://www.psort.org/psortb/>). Además, se complementó el análisis con el programa TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) para predecir si está presente en la membrana plasmática o soluble en el citoplasma.

7.14.7 Predicción de factores de virulencia

Para predecir si un grupo de proteínas tiene potencial virulencia se utilizó la base de datos Virulent 2.0 (<https://bioinfo.icgeb.res.in/virulent2/>). Virulent 2.0 alberga información curada sobre factores de virulencia caracterizados de distintos patógenos.

7.14.8 Análisis bioinformático del RNA-seq

Los datos sin procesar obtenidos de la secuenciación del RNA se sometieron a un examen de calidad utilizando FastQC v0.11.9. Posteriormente se utilizaron Trim Galore v.0.6.10 (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>) y Cutadapt v.3.4 para generar lecturas limpias de alta calidad eliminando secuencias que contenían más del 5% de N base, adaptadores y lecturas con más del 10% de $Q < 20$ bases. Después del preprocesamiento, finalmente se obtuvo un total de 10.593.521 ~ 76.682.018 lecturas limpias para cada muestra. Para cuantificar la expresión génica, las lecturas limpias se asignaron al genoma de referencia (CP076230 y CP076231) mediante HISAT2 v2.2.1, y se empleó Stringtie v2.2.0 para el análisis cuantitativo. Luego, el análisis de expresión diferencial se realizó en el paquete R DEseq2, con un modelo basado en la distribución binomial negativa. Los genes expresados diferencialmente (DEG) se definieron según el criterio: $|\log_2 \text{Foldchange}| > 1$ y $\text{fdr} < 0,05$. El análisis de enriquecimiento de DEG contra Gene Ontology y la base de datos KEGG se realizó con el paquete R clusterProfiler v4.0.

8 . RESULTADOS

8.1 Capítulo 1: Identificación y caracterización del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933: Explorando su vínculo con la supervivencia en macrófagos

8.1.1 Introducción

Como se mencionó anteriormente en el tópico ([1.3.1 Organización genética y clasificación del SST6 en *E. coli*](#)) de la introducción, los SST6 en *E. coli* se clasifican en tres categorías: SST6-1, SST6-2 y SST6-3. Si bien no hay una determinación en cuanto al tipo de SST6 y su función, se sabe que en la mayoría de los casos detectados el SST6-2 se encuentra mayormente representado en cepas de *E. coli* patógenas con alta virulencia (112). En patógenos como *E. coli* K1 cepa RS218, serotipo O18:H7 se reportó un SST6-2 asociado con la invasión a células endoteliales de la microvasculatura cerebral humana (CEMCH) (113). En EHEC O157:H7 EDL933 se reportó la presencia de un SST6-2 asociado con la supervivencia en macrófagos y también se identificó al efector KatN con actividad catalasa que, al ser secretada por la bacteria al citoplasma del macrófago, facilita el crecimiento de ésta en ambientes con estrés oxidativo (115).

Para ampliar el conocimiento sobre el SST6-2, se decidió analizar bioinformáticamente los genes estructurales de este sistema de secreción, comparándolos con otros SST6-2 de distintos patógenos, con el objetivo de confirmar si realmente este sistema está asociado con la supervivencia en macrófagos. Este análisis llevó a la obtención de mutantes del SST6-2, lo que permitió la realización de ensayos experimentales para demostrar las predicciones bioinformáticas sobre el SST6-2 y su papel en la supervivencia en macrófagos. Además, es interesante observar que se haya identificado un solo efector, KatN, en la compleja interacción entre EHEC O157 y el macrófago (115). Por eso uno de los principales objetivos de este capítulo se enfoca en la identificación de nuevos efectores mediante análisis *in silico* y la recopilación de datos experimentales reportados en la bibliografía.

8.1.2 Resultados

8.1.2.1 Identificación y análisis bioinformático del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933

Mediante la utilización de la secuencia del genoma completo de EHEC O157:H7 EDL933 se realizó un análisis bioinformático con el objetivo de identificar el operón y los genes codificantes para el SST6-2. Para este fin se utilizó la base de datos Secret6 que contiene información genética de la gran mayoría de los SST6 ya caracterizados de distintos patógenos Gram negativos. Además, la base de datos Secret6 contiene información de efectores, proteínas de inmunidad, proteínas accesorias y reguladoras asociadas al SST6.

Esta plataforma también permite identificar grupos de genes del SST6 en una secuencia genómica anotada o no anotada mediante BLASTp 2.10.1+ o hmmsearch (HMMER v3.3.1).

Como resultado del análisis genómico de EHEC O157:H7 EDL933 en la base de datos Secret6, se identificó una región de copia única de aproximadamente 36 kb. Esta región alberga los componentes mínimos necesarios, compuestos por 13 genes que codifican un SST6-2 (*tssA*, *tssB*, *tssC*, *tssJ*, *tssL*, *tssM*, *tssK*, *tssE*, *tssF*, *tssG*, *tssH*, *hcp* y *vgrG*) (ver Tabla 7), los cuales están distribuidos en dos operones: operón estructural y operón VgrG (Figura 14).

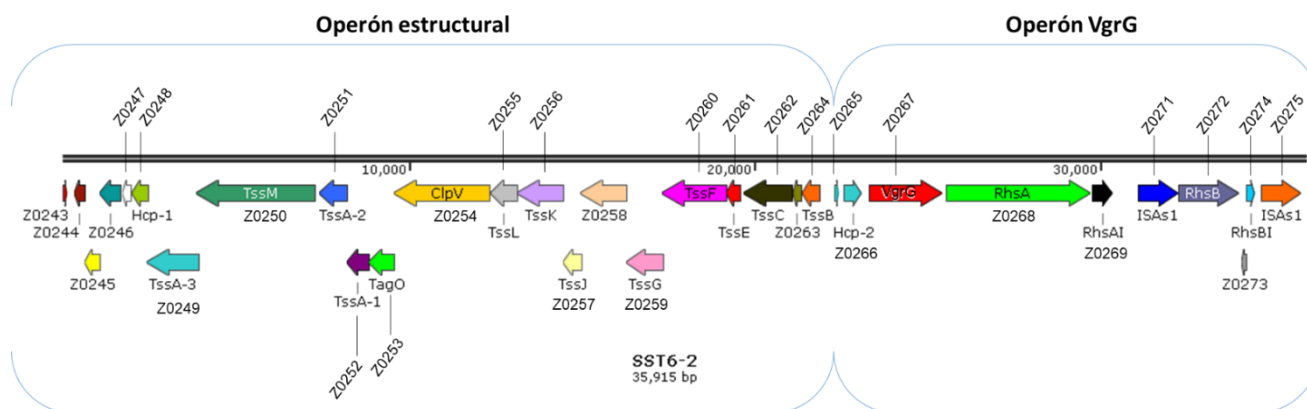


Figura 14. Esquema de la organización genética del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933.

El primer operón, llamado operón estructural, comprende los genes del núcleo estructural codificantes del complejo de base (*tssE*, *tssF*, *tssG*), del complejo de membrana (*tssI*, *tssK*, *tssL* y *tssM*) y del complejo de cola (*Hcp-1* y *tssA-3*, *tssb* y *tssC*) (Figura 14). Los genes del núcleo estructural contienen genes accesorios como *tagO* (Z2053), Z0243, Z0244, Z0245, Z0246, Z0247, Z0258 y Z0264 que codifican proteínas de función hipotética, las cuales se presume que podrían modular o facilitar el ensamblado del SST6-2, así como también complementar sus funciones de alguna manera (64).

Se destaca la presencia de tres genes *tssA*: *tssA-1*, *tssA-2* y *tssA-3*. Resulta notable que tanto *tssA-1* (621 pb) como *tssA-2* (795 pb) presentan la mitad de longitud en comparación con *tssA-3* (1500 pb). Esta observación sugiere la posibilidad de que *tssA-2* y *tssA-1* sean productos de una mutación que ha generado un codón de terminación prematuro en la secuencia original de *tssA-1* (111).

El segundo operón llamado operón VgrG contiene los componentes de la espiga VgrG y el componente del complejo de cola (Hcp-2). Río abajo de *vgrG* se encuentra una familia de proteínas Rhs (*RhsA* y *RhsB*), que podrían ser potenciales efectores. Interesantemente río abajo de los genes *rhs* se encuentran los genes que codifican las proteínas de inmunidad *RhsAI* y *RhsBI*, respectivamente (Figura 14). También se observaron genes

codificantes de transposasas ISAs1 (Z0271 y Z0275). Asimismo, se identificaron genes con función hipotética (Z0265 y Z0273).

Tabla 7. Componentes estructurales del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933

Proteína	Locus tag	Localización	Función
TssJ	z0257	ME	Complejo de membrana
TssL	Z0255	MI	Complejo de membrana
TssM	Z0250	MI	Complejo de membrana
TssK	Z0256	MI	Complejo de membrana
TssF	Z0260	MI	Complejo de base
TssG	Z0259	MI	Complejo de base
TssE	Z0261	CP	Complejo de base
TssA	Z0249	CP	Complejo de cola
TssB	Z0264	CP	Complejo de cola (vainas)
TssC	Z0262	CP	Complejo de cola (vainas)
ClpV	Z0254	CP	ATPase
Hcp-1	Z0248	CP/MI	Complejo de cola (Tubo Hcp)
Hcp-2	Z0266	CP/MI	Complejo de cola (Tubo Hcp)
VgrG	Z0267	MI	Espiga

ME, membrana externa; MI, membrana interna; CP, citoplasma

Con el propósito de determinar la prevalencia del SST6-2 en el serotipo O157:H7, se analizaron 349 genomas de EHEC O157:H7 depositados en NCBI. En cada uno de los

genomas se busco la presencia de los genes que codifican las proteínas estructurales del SST6 (ver tabla 7) para confirmar que contienen un SST6 completo y potencialmente funcional. Se detectó que 342 cepas poseen los genes estructurales del SST6-2 y solo 7 cepas que no. Esto representó una prevalencia del 92% del SST6-2 en los genomas de EHEC O157:H7.

El genoma de EHEC O157:H7 alberga en su genoma 177 islas genómicas, denominadas islas O que están ausentes en cepas no patogénicas como *E. coli* K-12 MG1655 (133). El análisis del genoma en la plataforma Proksee permitió la visualización completa del genoma, las islas O y el contenido de GC (Figura 15 A). En la isla O número 7 se encuentra codificado el SST6-2 (Figura 15 B). El análisis con Alien hunter permitió predecir posibles genes adquiridos por transferencia horizontal dentro del SST6-2 (Figura 15 B). Además, el análisis con mobile OG-db identificó características asociadas con elementos móviles asociados a islas genómicas, como la presencia de tRNA (aspV) flanqueante al SST6-2, transposasas (z0271 y z0275) dentro del SST6-2, así como también rastros de fagos (Figura 15 B).

Por otro lado, el análisis del contenido de GC del SST6-2 reveló un valor del 51,9%, ligeramente diferente del resto del genoma, que presenta un 50,38% (Figura 15 B). Además, la distribución de GC dado por el perfil GC skew revela que hay una distribución asimétrica, concentrándose mayor proporción de G en el operón VgrG.

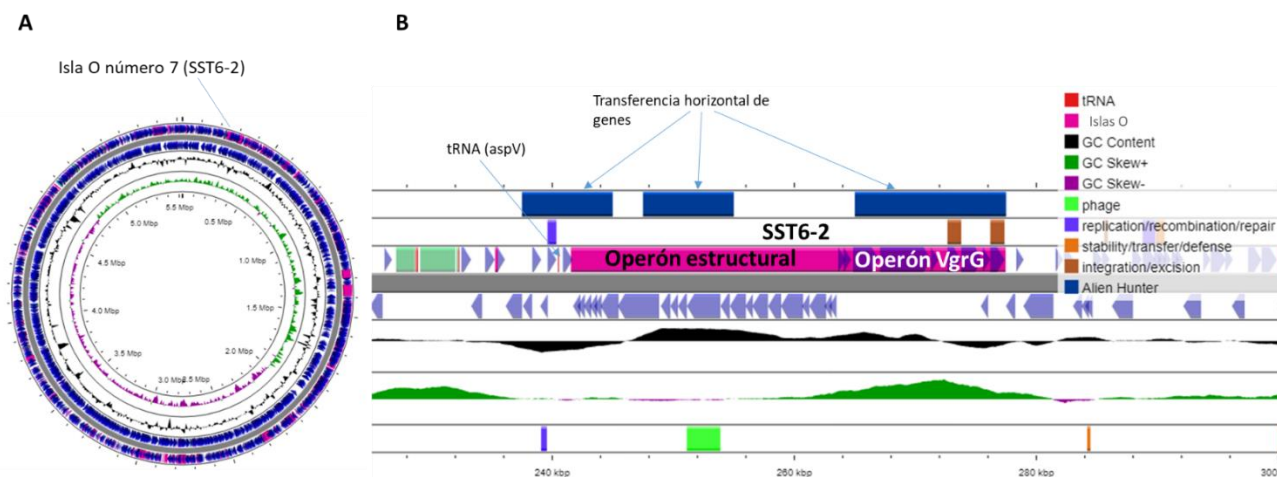


Figura 15. A) Visualización del genoma de EHEC O157:H7 EDL933. **B)** Se visualiza con mayor detalle la isla O número 7 que contiene los genes codificantes del SST6-2. En la plataforma Proksee se realizó un análisis integral con las herramientas Alien hunter y mobile OG-db para la búsqueda de genes que potencialmente pudieron haber sido adquiridos por transferencia horizontal, entre ellos: integrasas, fagos, sitios de recombinación e integración/excisión. A su vez se analizó el contenido de GC (GC plot) y la abundancia relativa de GC en una región específica (GC skew). La figura fue realizada con la plataforma Proksee (<https://proksee.ca/>).

8.1.2.2 Clasificación y predicción de la actividad del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933

Se llevó a cabo un análisis bioinformático de la secuencia que codifica para el SST6-2 con el fin de confirmar que EHEC O157:H7 posee un SST6-2, y posteriormente predecir su función a partir de búsqueda de homología de secuencias con otros patógenos que presenten SST6 ya caracterizados. Para esto se realizó un análisis integral con la base de datos Secret6.

El algoritmo de la base de datos utiliza la secuencia aminoacídica de la proteína TssB de EHEC O157:H7 EDL933 como entrada ya que se encuentra conservada y es utilizada para la construcción de árboles filogenéticos del SST6 (68). Este algoritmo lleva a cabo la predicción basándose en la homología de secuencia y posteriormente genera un

árbol filogenético. Este árbol incluye la secuencia de la proteína de interés y aquellas secuencias que han sido validadas experimentalmente almacenadas en la base de datos. A partir de este análisis, se observó que el SST6-2 de EHEC O157:H7 cepa EDL933 está vinculado filogenéticamente con otras cepas de *E. coli* (*E. coli* DE719 y *E. coli* RS218) y *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 287/91 (Figura 16).

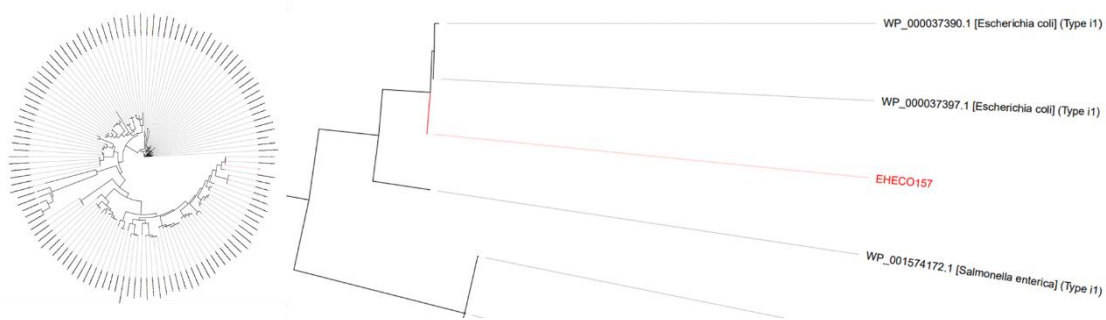


Figura 16. Análisis filogenético generado por la base de datos Secret6 utilizando como secuencia consulta a TssB de EHEC O157:H7 EDL933. Este algoritmo realiza predicciones basadas en la homología de secuencias y posteriormente genera un árbol filogenético utilizando MAFFT v7.475 y FastTree v2.1.11. La visualización del árbol se lleva a cabo utilizando ggtree.

Además, el alineamiento múltiple de la secuencia codificante del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933, *E. coli* DE719, *E. coli* RS218 y *Salmonella enterica* serovar Gallinarum mediante el software Mauve muestra el alto grado de similitud y sintenia entre los genes del operón estructural y del operón VgrG de las distintas cepas (Figura 17).

Es importante destacar que las cepas patógenas *E. coli* DE719 (patotipo APEC), *E. coli* RS218 (patotipo NMEC) y *S. enterica* serovar Gallinarum 287/91 albergan un SST6-2 que favorece la patogénesis (134,135). En el caso de la cepa *E. coli* DE719 el SST6-2 contribuye a la sobrevivencia en macrófagos (77), mientras que el SST6-2 de *E. coli*

ERS218 contribuye a la patogénesis al favorecer la adhesión e invasión a células endoteliales de la microvasculatura cerebral (113). Numerosos trabajos han reportado que el SST6-2 de *Salmonella enterica* es requerido para una eficiente colonización en pollos (134,136).

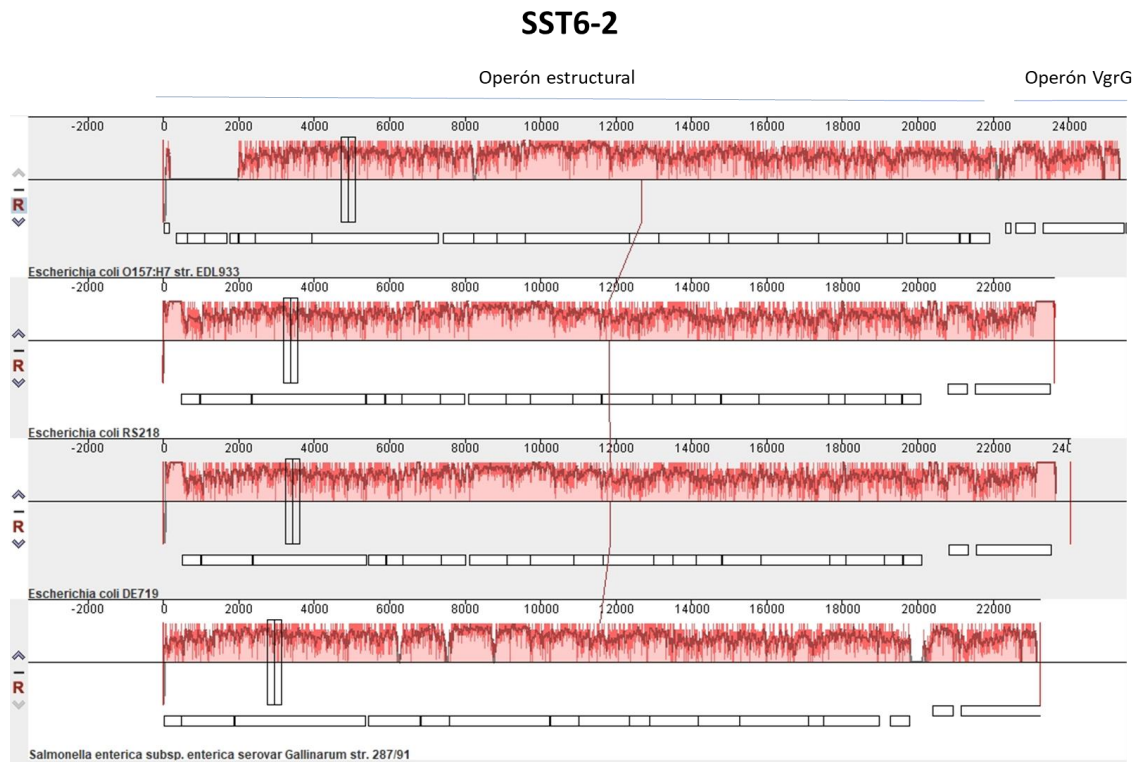


Figura 17. Alineamiento múltiple de secuencias correspondientes al SST6-2 de: EHEC O157:H7 EDL933, *E. coli* RS218, *E. coli* DE719 y *Salmonella enterica* subsp serovar Gallinarum str 287/91. Las regiones con similitud que están coloreadas con rojo se conservan entre los cuatro genomas. Las secuencias fueron alineadas usando la opción progressive Mauve de la versión Mauve 20150226.

En consecuencia, a partir del análisis realizado sobre la identificación del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933, se logró prever, mediante enfoques bioinformáticos y homología de secuencia, que esta cepa contiene un SST6-2 que podría otorgarle ventajas adaptativas en la supervivencia bacteriana frente al macrófago.

8.1.2.3 Identificación de potenciales efectores del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933

Para la búsqueda de efectores se utilizaron dos metodologías, la primera basada en predicciones mediante análisis bioinformático sobre el genoma de EHEC O157:H7 EDL933 utilizando la base de datos Secret6 (Figura 18). De esta manera pudimos obtener 26 potenciales efectores del SST6 predichos por bioinformática para EHEC O157:H7 EDL933 (ver tabla 8).

El segundo método para la identificación de efectores se realizó a partir de datos experimentales reportados en bibliografía provenientes de proteómica diferencial de sobrenadantes de cepas EHEC O157:H7 EDL933 salvaje y mutante del SST6 (Figura 18) (115). De esta manera, aquellas proteínas que fueron detectadas en el sobrenadante de la cepa salvaje, pero no en la mutante del SST6 fueron consideradas como potenciales efectores. Se predijeron 72 candidatos a efectores del SST6 ([ver tabla suplementaria 2](#) del capítulo 1).

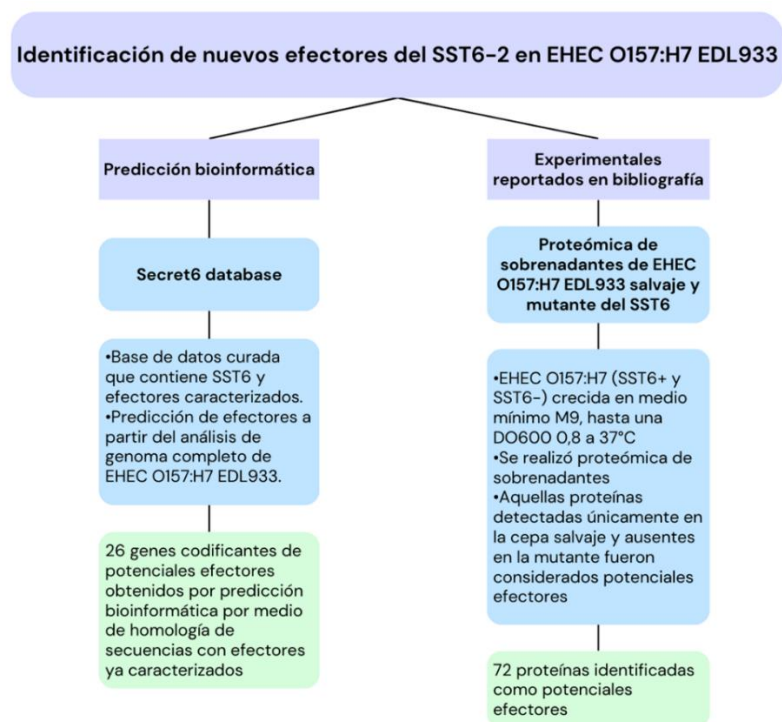


Figura 18. Diagrama que resume las dos estrategias empleadas para la identificación de efectores en EHEC O157:H7 EDL933. Por un lado, a partir de predicciones bioinformáticas y por otro a partir de datos experimentales provenientes de proteómicas de sobrenadantes de EHEC O157:H7 EDL933 salvaje y mutante para el SST6, según lo reportado por Wan y colaboradores (115).

Al comparar los efectores predichos mediante análisis bioinformático con los obtenidos a partir de datos experimentales, se observó que solo coinciden en KatN. Excepcionalmente esta coincidencia ambos métodos de identificación presentaron diferencias (Figura 19). Debido a estas diferencias, se analizaron por separado: por un lado, los efectores identificados por bioinformática y, por otro, aquellos identificados a partir de datos experimentales.

DIAGRAMA DE VENN

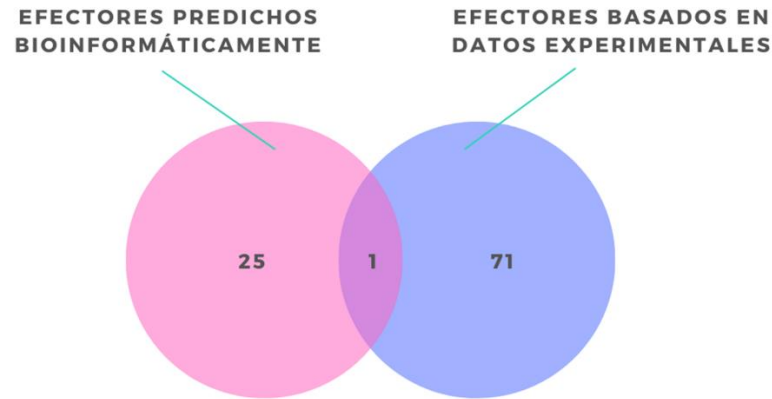


Figura 19. Diagrama de Venn que compara los candidatos a efectores predichos bioinformáticamente con los obtenidos a partir de datos experimentales a partir de la bibliografía para EHEC O157:H7 EDL933. El único efector compartido es KatN.

A continuación, se abordará al estudio de los efectores obtenidos por predicciones bioinformáticas y de aquellos obtenidos de datos experimentales

8.1.2.4 Identificación de efectores del SST6-2 basado en predicciones mediante un enfoque bioinformático

El algoritmo de la base de datos Secret6 permite predecir posibles efectores del SST6 en un genoma mediante homología de secuencias con otros efectores. A partir del análisis del genoma completo de EHEC O157:H7 EDL933 se logró predecir 26 posibles efectores según la base de datos (ver tabla 8). Entre los potenciales efectores reconocidos, se destacan genes que codifican proteínas Rhs, proteínas estructurales del SST6-2 como Hcp-1 y Hcp-2, cysS (cisteína tRNA ligasa), catalasa KatN (hasta el momento el único efector caracterizado en EHEC O157:H7 por Wan y colaboradores), YbjW (hiroxilamino reductasa), proteínas con función hipotética, así como diversas csp (*cold shock protein*).

Algunos de ellos se encuentran dentro de la región codificante del SST6-2 y la gran mayoría de los efectores predichos por bioinformática se encuentran por fuera del SST6-2 (Tabla 8).

Muchas de estas proteínas no fueron caracterizadas y algunas tienen función hipotética. Por lo tanto, la finalidad del estudio bioinformático adicional fue encontrar dominios catalíticos en los potenciales efectores para determinar su su posible función. Para ello se utilizaron las bases de datos Web CD-search tool (ver tabla 8), HHpred y Swiss-model ([ver tabla suplementaria 1 del capítulo 1](#)).

Tabla 8. Predicción bioinformática de potenciales efectores del SST6-2 en EHEC O157:H7 mediante la base de datos Secret6 e identificación de dominios catalíticos por medio de Web search CD tool

Secret6						Web search CD tool			
	Locus tag	Nombre	Identities (%)	E-value	Largo (aa)	Dominio/s	Desde	Hasta	E-value
Codificado dentro del SST6-2	Z0248	Hcp-1	67.9	8.51e-82	159	-	-	-	-
	Z0266	Hcp-2	100.0	5.52e-133	172	-	-	-	-
	Z0268	RhsA	75.7	0	1404	PAAR	1	29	3,22E-01
						DUF6531	47	123	4,44E-14
						RhsA superfamily	205	630	8,33E-08
						RhsA	545	1404	4,19E-147
Codificado fuera del SST6-2	Z0272	RhsB	84.2	0	586	-	-	-	-
	Z0651	RhsD	90.0	0	1398	PAAR_like superfamily	1	29	7,13E-03
						DUF6531	46	123	4,04E-13
						RhsA superfamily	206	681	4,49E-08
	Z0681	CysS	54.5	1.95e-172	461	Cys superfamily	1	461	0
	Z0702	RhsG	97.1	0	444	RhsA superfamily	10	444	3,79E-38
	Z0705	RhsF	89.8	0	1645	PAAR_RHS	252	305	3,74E-94
						DUF6531	393	455	4,82E-08
						YD_repeat_2x	553	593	6,41E+00
						YD_repeat_2x	670	711	1,17E-01
						RHS_repeat	609	644	2,30E-04
	Z0769	CspE	70.6	7.03e-34	69				
	Z0847	RhsC	99.3	0	1397	PAAR_like superfamily	1	29	7,99E-03
						DUF6531	46	123	8,68E-13
						RhsA superfamily	213	704	1,75E-09
	Z0851	Hipotética	98.3	3.77e-162	395	-	-	-	-
	Z1107	YbjW	92.0	0	552	PRK05290	3	552	
	Z1117	CspD	53.1	2.27e-22	74	S1_like superfamily	1	74	1,86E-47
	Z1405	CspH	50.7	2.26e-18	70	CspC	4	70	2,10E-23
	Z1406	CspG	79.7	2.93e-39	70	PRK09890	1	69	1,44E-41
	Z1921	KatN	100.0	0	296	CotJC	1	278	6,29E-137
	Z2257	RhsE	88.8	0	656	-			
	Z2259	Hipotética	92.5	0	572	-	-		
	Z2261	Hipotética	95.0	2.12e-102	174	RutF	1	145	2,30E-26
	Z2868	CspC	73.1	1.34e-33	69	PRK10943	1	69	1,69E-33
	Z4981	CspA	76.1	5.52e-37	70	PRK10354	1	70	4,36E-38
	Z5014	Rhs	100.0	0	1377	PAAR_like superfamily	1	29	7,89E-03
						DUF6531	46	123	9,46E-14

					RhsA superfamily	213	706	1,27E-07
					Ntox34 (RNase toxin)	1298	1372	2,03E-35
Z5017	RhsH	58.9	3.23e-102	312	RhsA superfamily	11	287	1,90E-43
Z5485	Hipotética	99.4	9.38e-103	189	PAAR_like superfamily	1	29	1,48E-01
					DUF6531	46	123	1,40E-15
Z5487	Hipotética	98.6	1.16e-142	233	-			
Z5488	RhsI	88.2	0	985	RHS_repeat	16	53	6,04E+00
					RHS_repeat	59	95	6,16E+00

8.1.2.4.1 Predicción bioinformática de potenciales efectores codificados adentro del cluster del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933

La exploración del genoma de EHEC O157:H7 EDL933 mediante análisis computacional, llevado a cabo por la base de datos Secret6, reveló la existencia de potenciales efectores dentro de la secuencia del SST6-2, entre ellos los genes *hcp-1* (Z0248) y *hcp-2* (Z0266) se encuentran en el operón estructural y VgrG respectivamente.

El análisis bioinformático de la secuencia proteica reveló que ninguna de las proteínas Hcp-1 (Z0248) y Hcp-2 (Z0266) identificadas como potenciales efectores presenta dominios catalíticos de tipo toxina (ADNasa, Colisin-ADNasa) (tabla 8) como reportó Ma y colaboradores (107).

Resulta interesante observar proteínas Rhs como resultado de la predicción de efectores del SST6, según la base de datos consultada Secret6, ya que este tipo de proteínas han sido descritas en UPEC y cepas STEC (137). Se ha reportado que las proteínas Rhs (*rearrangement hot spots*), presentan dominios polimórficos de tipo toxina en el extremo C-terminal, un dominio PAAR en el extremo N-terminal que favorece su interacción con el dominio C-terminal de VgrG para su secreción y repeticiones Y/D en la región

central de la estructura primaria de las Rhs (107). Normalmente, estas proteínas con actividad de tipo toxina están asociadas con proteínas de inmunidad antagonistas codificadas inmediatamente río abajo (137).

En el operón VgrG río abajo del gen *vgrG* (Z0267) se encontró a una familia de proteínas Rhs codificadas por *rhsA* (Z0268), *rhsB* (Z0272) y sus respectivas proteínas de inmunidad codificadas por *rhsAI* (Z0269) y *rhsBI* (Z0274) (Figura 20).

El análisis computacional en la base de datos Web CD-Search tool reveló que la proteína RhsA (Z0268) presentó un dominio PAAR en su extremo N-terminal (1-29 aa), pero no se detectaron dominios catalíticos en su extremo C-terminal (Figura 20) (Tabla 8). La estructura tridimensional de la proteína RhsA (Z0268), obtenida a través de la base de datos SWISS model, reveló que poseía una disposición similar a una cubierta formada por láminas β que encierran a la región C-terminal, similar al efector del SST6 Tse5 (Similitud: 0.38; identidad: 39 %) caracterizado en *P. aeruginosa* como una toxina formadora de poro de membrana ([Tabla suplementaria 1 del capítulo 1](#)) (138). Río abajo de RhsA (Z0268) se encuentra el gen RhsAI (Z0269) que codificaría una potencial proteína de inmunidad la cual presenta un dominio TPR (*Tetratrico Peptide Repeat*) encontrado en un amplio rango de proteínas que median las interacciones proteína-proteína y el ensamblaje de complejos proteicos (139,140).

Río abajo de RhsA (Z0268) se encuentra RhsB (Z0272). El análisis realizado en RhsB (Z0272) reveló que carecía de dominios PAAR en su extremo N-terminal y dominios tipo toxina en su extremo C-terminal (Figura 20) (Tabla 8). Sin embargo, la estructura tridimensional resultó similar a RhsE (similitud: 0,59; Identidad: 90,05%) y al efector Tse5 (similitud: 0,39; Identidad: 40,83%). Además, el análisis de la secuencia proteica en

la base de datos por HHpred predice que RhsB (Z0272) tiene similitud con RhsP (Probabilidad 100%; Similitud: 0,544, Identidad: 33%), un efector del SST6 asociado con actividad nucleasa descrito en *Vibrio cholerae* ([Tabla suplementaria 1 del capítulo 1](#)) (141). Río abajo de RhsB se encuentra RhsBI (Z0274) que codificaría potencialmente su proteína de inmunidad.

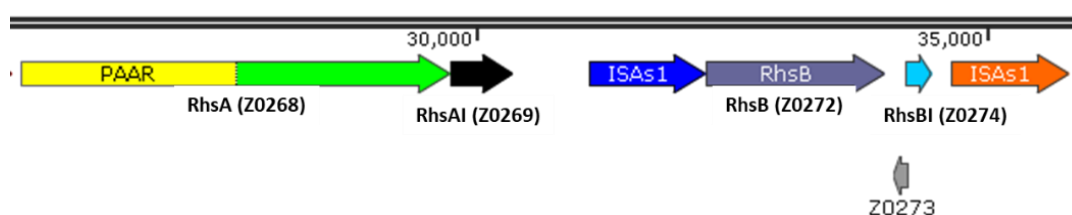


Figura 20. Diagrama que representa la organización de Rhs adentro del *cluster* del SST6-2. Se representa la presencia del potencial efector RhsA (Z0268) con dominio PAAR (en amarillo). Río abajo se encuentra RhsAI (Z0269) que codificaría su proteína de inmunidad. Río abajo se encuentra RhsB (Z0272) junto a su potencial proteína de inmunidad RhsBI (Z0274).

8.1.2.4.2 Predicción bioinformática de potenciales efectores codificados por fuera del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933

La predicción de efectores reveló un considerable número de potenciales efectores situados por fuera de la región codificante del SST6-2 (Tabla 8). Entre ellos se encuentran *cysS*, (*cystein Synthase*), *csp* (*cold shock protein*), *yibJ*, *yibW* y varias Rhs. Hasta el momento, el único efector predicho y caracterizado por Wan y colaboradores es la catalasa KatN (Z1921).

La proteína CysS (Z0681) (*cystein Synthase*) fue predicha como potencial efector, la cual posee un dominio perteneciente a la superfamilia Cys (Tabla 8). CysS pertenece a

la familia de ligasas, que en concreto forman enlaces carbono-oxígeno en aminoacil-tRNA y compuestos relacionados.

Varias proteínas Csps fueron predichas como potenciales efectores del SST6-2 en EHEC O157:H7 EDL933 (Tabla 8). Estas son pequeñas proteínas de unión a ácidos nucleicos con una longitud promedio de 70 aminoácidos (142). Las Csps en *E. coli* demostraron actividad incluso a temperaturas más bajas que la óptima de crecimiento. Además de su papel en el crecimiento a bajas temperaturas, estas proteínas están implicadas en diversos procesos celulares en respuesta a estrés, como el estrés osmótico, oxidativo, cambios de pH, escasez de nutrientes y la invasión de células hospedadoras (143). Estas proteínas conservan un dominio de unión a RNA perteneciente a la superfamilia s1, el cual ha sido detectado en CspD (Z1117) (144). Por otro lado, las proteínas CspG (Z1406), CspC (Z2868) y CspA (Z4981) poseen dominios PRK09890, PRK10943 y PRK10354, respectivamente, los cuales pertenecen a la superfamilia s1 (Tabla 8).

La predicción de efectores reveló un número de proteínas perteneciente a familia Rhs codificadas por fuera del locus del SST6-2.

El potencial efector RhsD (Z0651) posee un dominio de función desconocida DUF6531, que se encuentra típicamente en proteínas Rhs junto con el dominio de la superfamilia Rhs (Figura 21) (Tabla 8). A pesar de no registrar dominios catalíticos en su extremo C-terminal, se observó mediante el análisis de modelado molecular que posee similitud con la toxina Tse5 (Identidad: 34%; Similitud: 0,38), un efector caracterizado en *Pseudomonas aeruginosa* que tiene la capacidad de formar poros en la membrana bacteriana objetivo ([Tabla suplementaria 1 del capítulo 1](#)) (138).

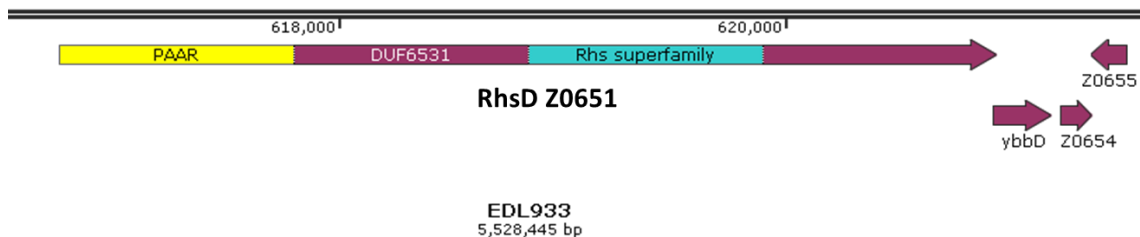


Figura 21. Diagrama que representa la organización de Rhs. Se representa la presencia del potencial efector RhsD (Z0651) con dominio PAAR (en amarillo), DUF6531 (rosa) y superfamilia de Rhs (celeste).

RhsF (Z0705) y Rhs (Z0702) se encuentran adyacentes río abajo de VgrG2 (Z0707) (Figura 22 A). Además, río abajo de VgrG2 se encuentra codificada una proteína EagR (Z0706) (Figura 22 A). Se ha reportado que EagR, una proteína accesoria con actividad chaperona, participa en la interacción entre Rhs y VgrG durante la translocación, según lo reportado por Cianfanelli y colaboradores (145). El análisis de RhsF (Z0705) reveló la presencia de un dominio PAAR, DUF6531, repeticiones Y/D (tirosina/aspartato) y RHS (Figura 22 B) (Tabla 8). Sin embargo, no se predijeron dominios catalíticos en el extremo C-terminal. El análisis estructural mediante la base de datos HHpred reveló que RhsF (Z0705) presentó similitud con una familia de proteínas Rhs con actividad de tipo toxina asociadas al SST6 en *Vibrio parahaemolyticus* serotipo O3:K6 (Probabilidad: 99,6%; E-value: 1.1e-98). El modelado molecular de RhsF (Z0705) también reveló su similitud con una Rhs con dominio tipo toxina Tre23 (Identidad: 43,87; Similitud: 0,43) en el extremo C-terminal que tiene la capacidad de inhibir la traducción de proteínas (Tabla suplementaria 1 del capítulo 1) (146). Río abajo de RhsF (Z0705) se encuentra RhsG (Z0702), en el cual se detectó un dominio de la familia Rhs (E-value 3,79e-38), pero no se fueron detectados dominios con actividad catalítica en el extremo C-terminal (Figura 22 A) (Tabla 8). Mientras que el modelado estructural reveló su similitud con una Rhs con dominio tipo toxina Tre23 (Identidad: 49,10 %; Similitud: 0,43) en el extremo C-terminal que tiene la capacidad de inhibir la traducción de proteínas ([Tabla suplementaria](#)

[1 del capítulo 1](#)) (146). Río abajo de RhsG (Z0702) se encuentra su par que codificaría una potencial proteína de inmunidad RhsGI (Z0701).

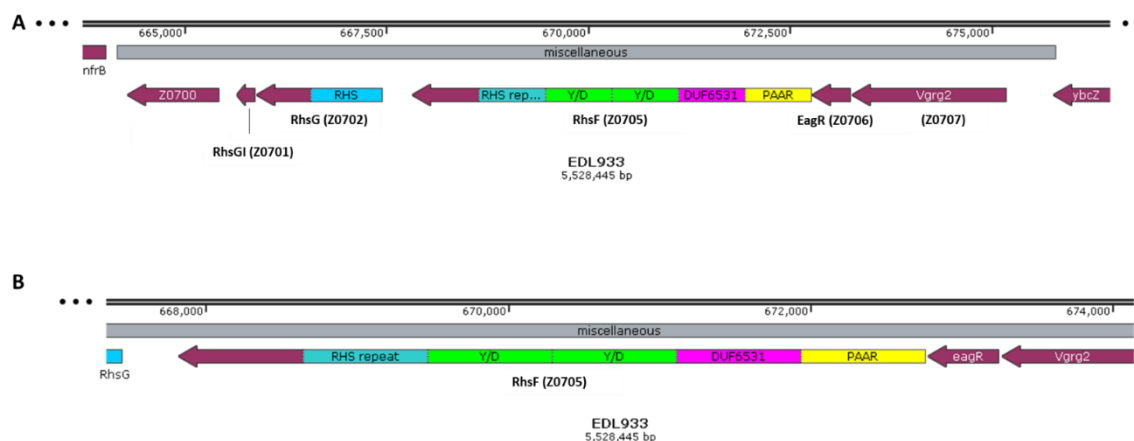


Figura 22. A) Esquema de los potenciales efectores RhsF (Z0705) y Rhs (Z0702), los cuales se encuentran río abajo de VgrG (Z0707) y la proteína accesoria EagR (Z0706). En amarillo se representa el dominio PAAR, en rosa se representa el dominio de función desconocida DUF6531, en verde las repeticiones Y/D y en celeste el dominio RHS. **B)** Es una ampliación de RhsF (Z0705).

El potencial efector RhsC (Z0847) presenta los dominios PAAR, DUF5631 y de la superfamilia RHS (Figura 23) (Tabla 8). La predicción de estructura mediante HHpred reveló su similitud con otra proteína Rhs tipo toxina de *Pseudomonas protegens* (Probabilidad: 100%; E-value: 2.6e-72). Sin embargo, el modelado estructural mostró su semejanza con la toxina Tse5 (Identidad: 34,9%; Similitud: 0,39) ([Tabla suplementaria 1 del capítulo 1](#)). No se detectaron genes codificantes de proteínas de inmunidad río abajo de RhsC (Z0847).

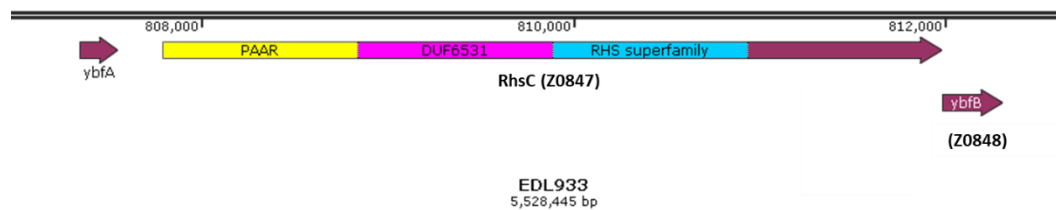


Figura 23. Esquema del potencial efector RhsC (Z0847). En amarillo se representa el dominio PAAR, en rosa se representa el dominio de función desconocida DUF6531, y en celeste el dominio RHS.

En Rhs (Z5014) se detectaron los dominios PAAR, DUF6531, RHS y Ntox34 (Figura 24) (Tabla 8). El dominio Ntox34 en su extremo C-terminal, caracterizado como dominio de tipo toxina con actividad RNase, está presente en sistemas de toxinas polimórficos en bacterias, las cuales pueden ser secretadas por el SST6 (118). La estructura tridimensional de RhsA (Z5014) refleja su similitud con el efector Tse5 (Identidad: 97,60%; Similitud: 0,62) ([Tabla suplementaria 1 del capítulo 1](#)). No obstante, río abajo de RhsA (Z5014) no se observaron genes codificantes de proteínas de inmunidad.

Río abajo de Rsh (Z5014) se encuentra RhsH (Z5017) (Figura 24) el cual no presentó dominios catalíticos (Tabla 8), pero se pudo observar mediante el análisis en HHpred que posee identidad estructural con RHS2 (Probabilidad: 99,72 %; E-value: 2.2e-17), una toxina ABC de *Yersinia entomophaga* con actividad insecticida y su estructura tridimensional posee similitud con otra proteína Rhs del SST6 (Identidad: 98,08%; Similitud: 0,62) ([Tabla suplementaria 1 del capítulo 1](#)) (147).

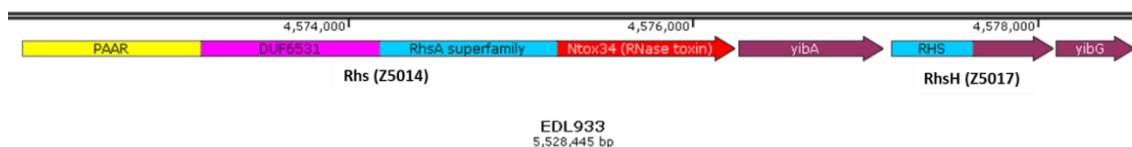


Figura 24. Esquema del potencial efector Rhs (Z5014). En amarillo se representa el dominio PAAR, en rosa se representa el dominio de función desconocida DUF6531, y en celeste el dominio RHS. Río abajo se encuentra RhsH (Z5017) con dominio RHS.

Tras el análisis bioinformático, se identificaron proteínas con función hipotética, Z5485 y Z5487 (Figura 25 A y B). Sin embargo, el estudio reveló que Z5485 reveló posee los dominios PAAR y DUF5631 característicos de las proteínas Rhs, mientras que Z5487 no presenta dichos dominios (Tabla 8). Se observó que tanto para Z5485 como Z5487 comparten similitud estructural con proteínas Rhs tipo toxina de *Vibrio parahaemolyticus* serotipo O3:K6 (Probabilidad: 99,36 %; E-value: 2.3e-10) y (Probabilidad: 99,41 %; E-value: 2.9e-11) respectivamente. Es importante destacar que la estructura tridimensional de Z5485 coincide con la estructura típica de RhsB (Identidad: 89,25%; Similitud: 0,57) ([Tabla suplementaria 1 del capítulo 1](#)).

Río abajo de Z5487 se encuentra RhsI (Z5488) (Figura 25 A), el cual posee los dominios RHS, pero no se detectó el dominio PAAR y tampoco un dominio catalítico en el extremo C-terminal (Tabla 8). La predicción estructural reveló que tiene similitud con Rhs tipo toxina de *Pseudomonas protegens* y su estructura tridimensional con identidad a RhsB de *E. coli* K-12 (Identidad: 89,37%; Similitud: 0,59) ([Tabla suplementaria 1 del capítulo 1](#)). No se detectaron genes codificantes de proteínas de inmunidad río abajo.

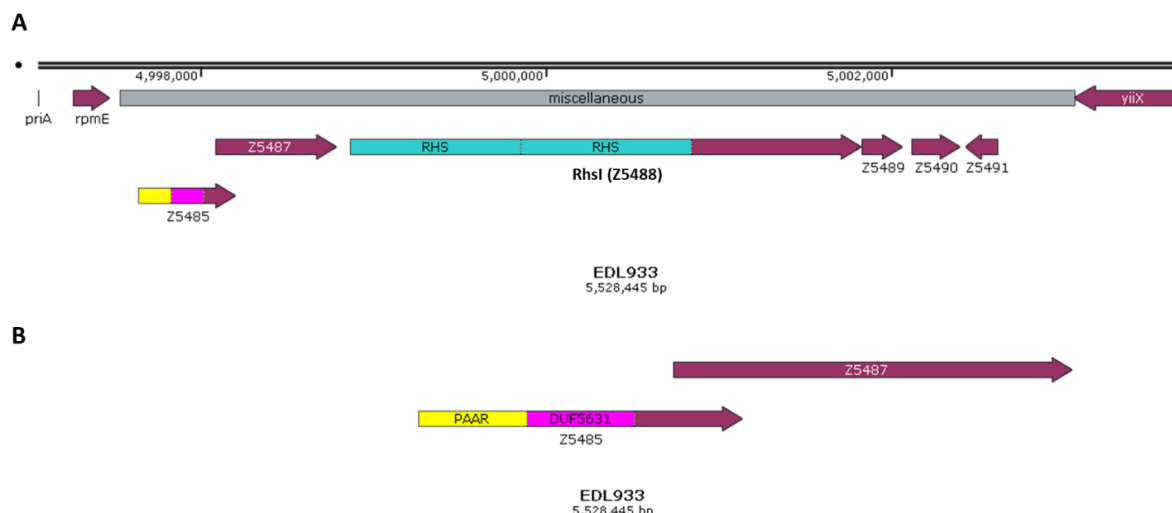


Figura 25. A) Esquema de distribución de Z5485, Z5487 y RhsI (Z5488). En amarillo se representa el dominio PAAR, en rosa se representa el dominio de función desconocida DUF6531, y en celeste el dominio RHS. B) es una ampliación de Z5485.

RhsE (Z2257) fue predicho como efector del SST6, aunque no se encontraron dominios característicos de las proteínas Rhs (Figura 26). Sin embargo, el análisis de estructura con HHpred reveló su similitud con proteínas Rhs de tipo toxina (Probabilidad: 100%; E-value: 1.1×10^{-35}). Además, el modelado estructural corroboró esta similitud con Rhs (Identidad: 83,20%; Similitud: 0,56) ([Tabla suplementaria 1 del capítulo 1](#)).

Río arriba de RhsE (Z2257) se encuentran Z2259 y Z2261 (Figura 26), ambos predichos como efectores, aunque no se encontraron dominios típicos de Rhs en ellos. Tanto Z2259 como Z2261 exhibieron similitud estructural con Rhs que contienen un dominio Tre23 (Probabilidad: 100%; E-value: 1.1×10^{-35}) y (Probabilidad: 98,36 %; E-value: 0.0000057), respectivamente (Tabla 8). Además, el modelado estructural de Z2259 reveló su similitud con la toxina Tse5 (Identidad: 30,33%; Similitud: 0,34), mientras que la estructura de Z2261 presentó similitud con una proteína de función desconocida A0A3T4KHM5 de *E. coli* (Identidad: 95,15%; Similitud: 0,60) ([Tabla suplementaria 1](#)

[del capítulo 1](#)). Es interesante observar que RhsE (Z2257), Z2259 y Z2261 se encuentran río abajo de VgrG3 (Z2262).

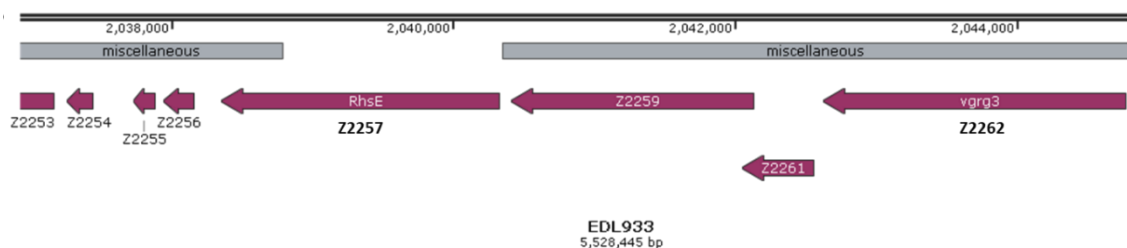


Figura 26. Esquema de la organización de candidatos a efectores RhsE (Z2257), Z2259 y Z2261. Se encuentran río abajo de VgrG3 (Z2262).

Se observó que YbjW (Z1107) contiene un dominio PRK05290 perteneciente a la superfamilia HCP (*hybrid cluster proteins*) (Tabla 8). Esta proteína se caracteriza como una enzima hidroxilamina reductasa, responsable por la reducción de hidroxilamina a NH_3 y H_2O y su estructura tridimensional coincide este tipo de proteínas (Probabilidad: 100%; E-value: 6.6e-119) ([Tabla suplementaria 1 del capítulo 1](#)) (148).

8.1.2.5 Identificación de nuevos efectores del SST6-2 a partir de datos experimentales

Para abordar la identificación de potenciales efectores del SST6-2 se utilizaron datos publicados derivados de un análisis de proteómica diferencial en sobrenadantes de cepas EHEC O157:H7 EDL933, tanto en su fenotipo salvajes como en mutantes del SST6-2 (115). Los sobrenadantes fueron sometidos a cromatografía líquida seguido por espectroscopía de masas (LC-MS/MS) y aquellas proteínas detectadas únicamente en el

sobrenadante de la cepa salvaje, pero ausentes en la cepa mutante SST6-2 fueron considerados como posibles efectores del SST6 en EHEC O157:H7 (115). De esta manera, Wan y colaboradores informaron sobre 72 nuevos potenciales efectores de SST6 ([Tabla suplementaria 2 del capítulo 1](#)).

La gran mayoría de los candidatos a efectores identificados por Wan y colaboradores participan en vías metabólicas (Figura 27).

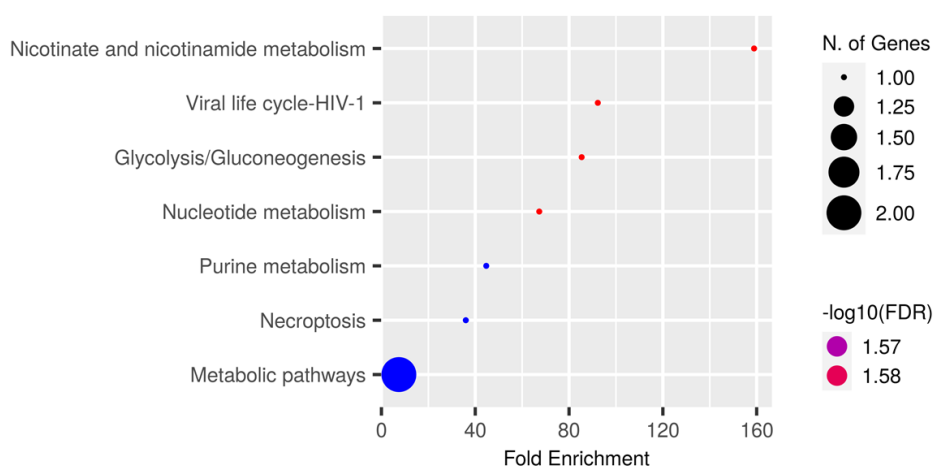


Figura 27. Gráfico de enriquecimiento de genes identificados como candidatos a efectores por Wan y colaboradores. Se representan las vías metabólicas en función del número de genes que participan en ellas. El valor de $-\log_{10}(\text{FDR})$ indica que cuánto más grande es su valor más probable es la ruta en la que participan. El gráfico fue realizado con el software ShinyGO 0.80.

Las vías metabólicas están interconectadas entre sí, metabolismo de purina, nucleótidos, necroptosis, ciclo viral HIV-1, glicolisis/gluconeogénesis y nicotinato y nicotinamida (Figura 28).

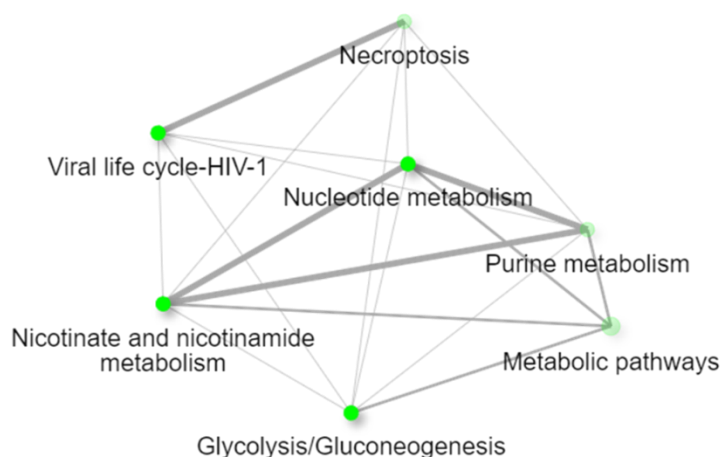


Figura 28. Representación de las interconexiones que se dan entre las vías en las cuales participan las proteínas candidatas a efectores reportadas por Wan y colaboradores. La red de interacción fue realizada con ShinyGO 0.80.

8.1.2.6 Análisis de localización subcelular y péptido señal de candidatos a efectores

Con la finalidad de predecir la localización subcelular (membrana, periplasma y citoplasma) de los candidatos a efectores (bioinformáticos y experimentales) se realizó un análisis utilizando la base de datos PSORTb 3.0.

Esta base de datos considera varios criterios, como la presencia de péptido señal, hélices transmembrana, homología con proteínas de localización conocida, composición de aminoácidos y motivos que influyen en la localización subcelular. Se observó que la gran mayoría de estos candidatos a efectores fueron predichos como proteínas citoplasmáticas, con excepción de algunas que fueron predichas con localización periplásmica y otras extracelular como Hcp-1, Hcp-2, RhsB, RhsI y FliD ([Tabla suplementaria 3 capítulo 1](#)).

Además, la predicción de la base de datos IP signal reveló que un gran número de candidatos a efectores no presenta péptido señal, salvo excepciones ([Tabla suplementaria 3 capítulo 1](#)).

La identificación de la presencia de α hélices transmembrana se realizó con el programa TMHMM 2.0. El mismo, predijo la topología de las proteínas de membrana, permitiendo discriminar entre proteínas solubles y de membrana ([Tabla suplementaria 3 capítulo 1](#)). La gran mayoría de los candidatos no presentaron dominios transmembrana, indicando que podrían encontrarse solubles en el citoplasma.

Estos resultados revelan que un número reducido de efectores fueron predichos como extracelulares, mientras que la gran mayoría fueron identificados como proteínas citoplasmáticas sin dominio transmembrana, lo que aumentaría su probabilidad de translocación a través del SST6-2.

8.1.2.7 Obtención de cepas EHEC O157:H7 EDL933 mutantes para genes involucrados en la funcionalidad del SST6

Con la finalidad de evaluar la funcionalidad del SST6-2 en EHEC O157:H7 EDL933 se generaron mutantes de genes estructurales del SST6-2 utilizando la metodología de edición génica CRISPR/Cas9.

Con el propósito de obtener una cepa EHEC O157:H7 EDL933 deficiente en la funcionalidad del SST6-2 se procedió a mutar dos genes estructurales, *tssB* y *clpV*. La proteína TssB es un componente esencial del SST6 involucrada en el ensamblado del complejo de cola en *V. cholerae*, y estudios previos han informado que mutaciones en este gen resultan en un SST6 truncado (149). Por otro lado, la proteína ClpV actúa como la ATPasa del SST6 y depolimeriza, con gasto de energía, el complejo de cola retráctil. Este proceso favorece el desmontaje de la vaina estructural, permitiendo su reutilización para generar un nuevo evento de contracción y la eventual secreción de efectores (150).

A través de la metodología de edición génica CRISPR/Cas9, se generaron cepas mutantes de EHEC O157:H7 EDL933 para los genes *tssB* y *clpV* del SST6-2, como muestra la Figura 29 A y B respectivamente. Estas mutaciones incluyeron una delección de 30 pb y la inserción de un codón stop prematuro en el extremo 5' del gen de interés. El método de detección se basó en *colony* PCR, para lo cual se diseñaron primers específicos flanqueantes a la región de inserción de la mutación. Los amplicones de los clones mutantes, analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, migraron más que los de los clones salvajes, evidenciando una diferencia de aproximadamente 30 pares de bases (Figura 29).

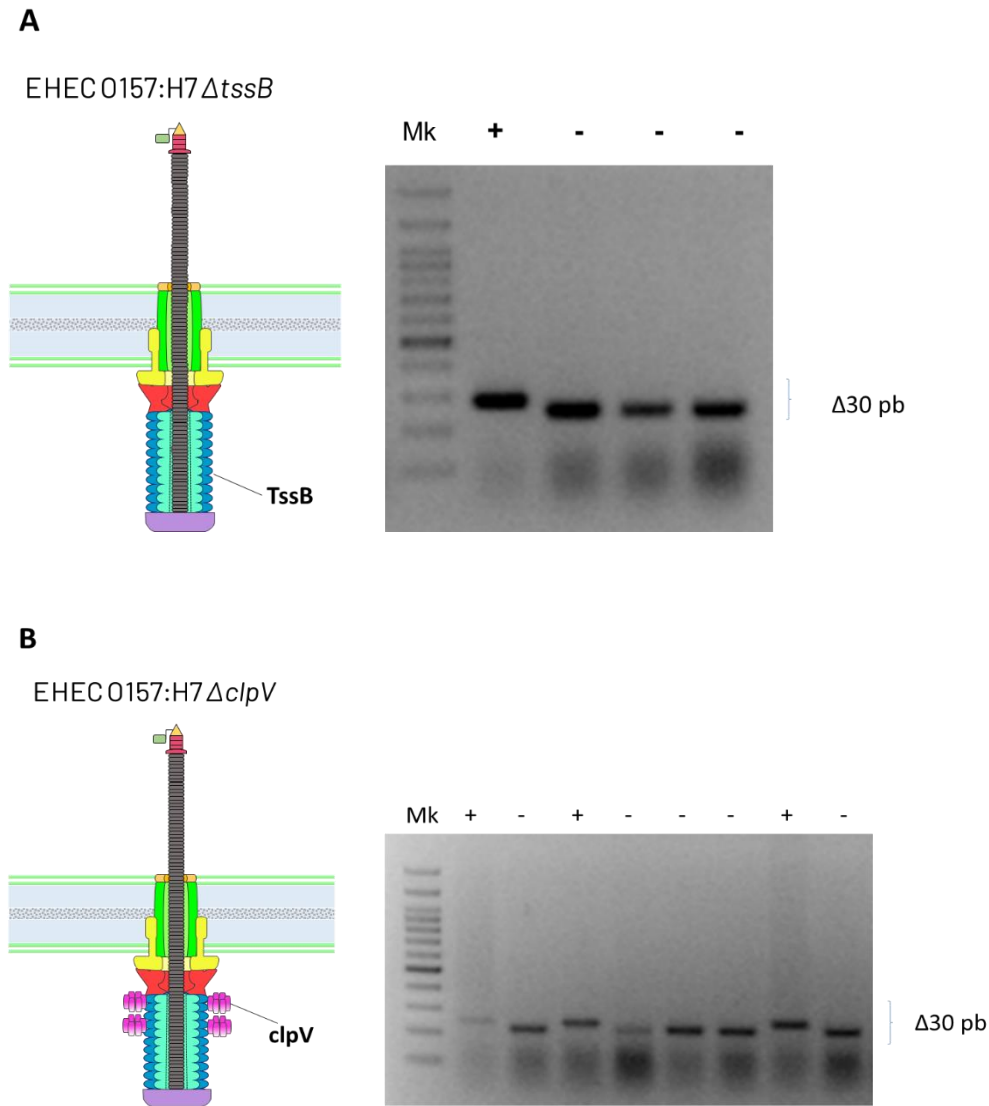


Figura 29. Corrida electroforética en gel de agarosa 2% de productos de *colony* PCR de los clones EHEC O157:H7 mutantes del SST6-2 obtenidos por CRISPR/Cas9. Gel de agarosa 2% en el que se una diferencia de 30 pb en los amplicones que permite distinguir a los clones mutantes (-) respecto a los salvajes (+) junto con un esquema representativo del SST6-2 para visualizar el componente estructural mutado. En **A** se representa para EHEC O157:H7 $\Delta tssB$, gen codificante de la proteína estructural que forma parte del complejo de cola retráctil y en **B** para EHEC O157:H7 $\Delta clpV$, enzima ATPasa responsable de la depolimerización de la vaina retráctil.

8.1.2.8 Determinación de la actividad del SST6-2: de la predicción a la confirmación. ¿El SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 tiene actividad antibacterial ó está asociado con la sobrevida en macrófagos?

Previamente se demostró mediante análisis bioinformáticos que EHEC O157:H7 EDL933 posee un SST6-2 y que está relacionado filogenéticamente con *S. enterica* y otras cepas de *E. coli*, las cuales tienen SST6-2. Estas cepas muestran actividad que va desde adhesión a células endoteliales a sobrevida en macrófagos. Si bien las predicciones bioinformáticas no arrojaron potencial actividad bactericida por parte del SST6-2 se decidió someterlo a evaluación.

8.1.2.9 Evaluación de la actividad bactericida del SST6-2 en EHEC O157:H7 EDL933 a través de ensayos de competencia interbacteriana

Estudios recientes, revelaron que el SST6 puede tener actividad antibacteriana hacia especies bacterianas heterólogas (73,151). La actividad bactericida del SST6 provee una fuerte ventaja competitiva frente a otras bacterias en la competencia por el nicho. Como un patógeno intestinal, EHEC puede colonizar el intestino de mamíferos donde existe una abundante microbiota (152).

Se ha reportado que las cepas que codifican para el SST6 pueden eliminar a una cepa SST6 negativo (73). Por este motivo nos preguntamos si EHEC O157:H7 EDL933 (SST6-2⁺) podría eliminar a una bacteria no patógena como *E. coli* DH5 α (SST6-2⁻).

Para responder a esta cuestión se llevó a cabo un ensayo de competencia donde el predador fue incubado con la presa en una relación 3:1. Mediante este ensayo de competencia se demostró que ninguna de las cepas EHEC O157:H7 WT, EHEC O157:H7 $\Delta tssB$ y EHEC O157:H7 $\Delta clpV$ (predadores) pudieron eliminar a *E. coli* DH5 α (presa) ya que no se observaron diferencias significativas en el recuento de la cepa presa (Figura 30 A y

B). Estos resultados sugieren que el SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 no posee actividad bactericida detectable *in vitro*.

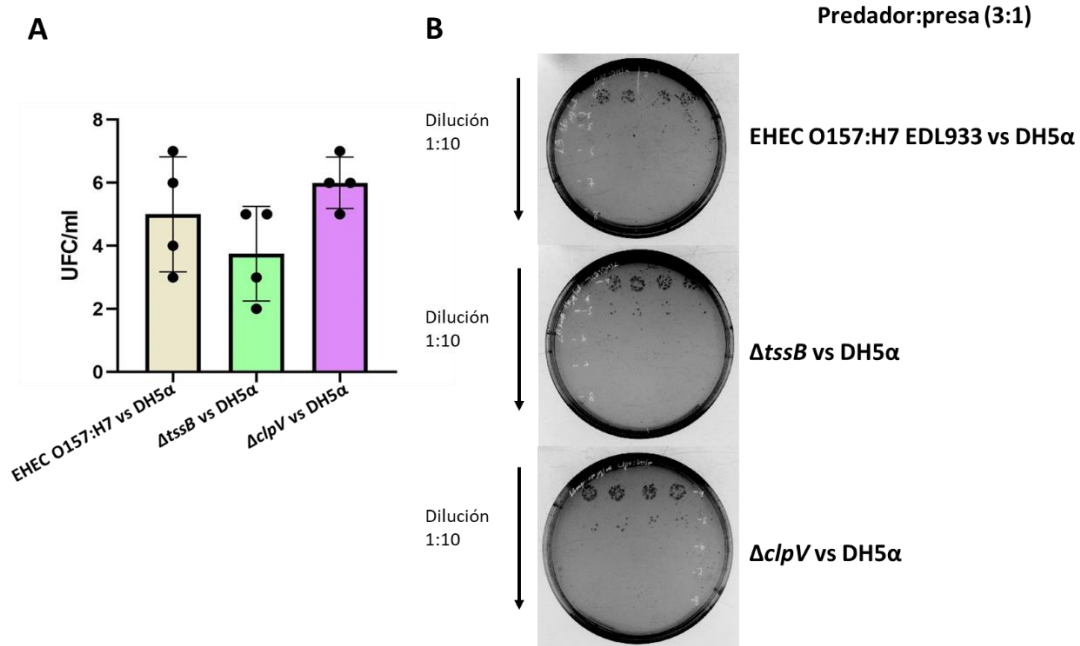


Figura 30. Ensayo de competencia bacteriana entre predador:presa a una relación 3:1. EHEC O157:H7 EDL933 (SST6-2⁺) (predador) fue incubada con *E. coli* DH5α (SST6-2⁻) (presa). En la interacción la cepa presa es seleccionada por sus resistencia a antibiótico. Como control negativo se utilizaron las cepas mutantes del SST6-2 obtenidas EHEC O157:H7 EDL933 ΔtssB y ΔclpV. En **A**) se cuantificó el recuento de UFC de la presa y en **B**) se visualizan las placas de LB agar con medio selectivo y los puntos de siembra de las combinaciones predador:presa.

En función de estos resultados, se ha corroborado que la presencia del SST6-2 en EHEC O157:H7 EDL933 no manifestaría actividad antibacteriana al menos para *E. coli* DH5α. Esto respalda la predicción inicial sobre el potencial rol del SST6-2 en la sobrevida bacteriana frente al macrófago. Para validar esta predicción, se optó por llevar a cabo un ensayo de sobrevida en macrófagos murinos RAW 264.7.

8.1.2.10 Evaluación de la sobrevivencia de EHEC O157:H7 EDL933 en macrófagos murinos RAW 264.7

La identificación del SST6-2 en el genoma de EHEC O157:H7 EDL933 y la predicción bioinformática da sustento a su posible rol en la supervivencia bacteriana frente a macrófagos. En este contexto, el objetivo es determinar si la cepa de estudio EHEC O157:H7 EDL933 con un SST6-2 tiene la capacidad de sobrevivir en el entorno intracelular del macrófago.

Los macrófagos fueron identificados mediante la marca de LAMP3 (*lysosome-associated membrane glycoprotein 3*), lo que indicaría la presencia de cuerpos acídicos correspondientes a lisosomas. Previo a la infección las bacterias fueron marcadas con CFSE (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*) una molécula que emite fluorescencia cuando las esterasas intracelulares en células vivas clivan el grupo acetato, generando una molécula verde fluorescente de *carboxyfluoresceina*, la cual se torna impermeable.

A través de microscopía confocal de fluorescencia, se logró visualizar la presencia de EHEC O157:H7 EDL933 dentro de los macrófagos, lo que señala la capacidad del patógeno de persistir en este entorno celular 24 hs post incubación (Figura 31). En este contexto puede verse una colocalización entre cuerpos acídicos (puntos azules) y EHEC O157:H7 EDL933 (verde) (Figura 31). Cabe destacar que no se observan cambios morfológicos en los macrófagos y tampoco signos de citotoxicidad.

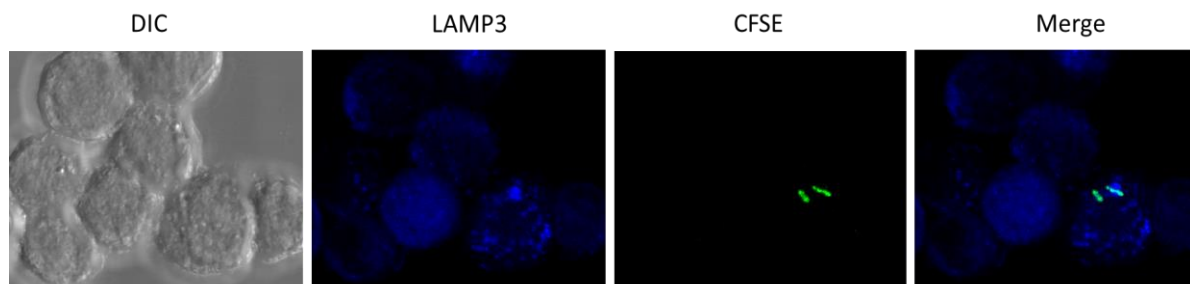


Figura 31. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de macrófagos murinos RAW 264.7 incubados con EHEC O157:H7 EDL933 a un MOI=100 durante 24 hs. Los macrófagos fueron visualizados por contraste de interferencia diferencial (DIC); los fagosomas tardíos (cuerpos ácidos) fueron marcados con LAMP3 (*Lysosome-associated membrane glycoprotein 3*) (azul); EHEC O157:H7 EDL933 fue marcada con CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) (verde).

8.1.2.11 Determinación del porcentaje de supervivencia de EHEC O157:H7 EDL933 en macrófagos murinos RAW 264.7

Con el objetivo de determinar la función del SST6-2 se evaluó el porcentaje de supervivencia en macrófagos murinos de cepas EHEC O157:H7 salvajes y mutantes del SST6-2.

Inicialmente, se realizaron recuentos de UFC a las 2hs post incubación con los macrófagos y se observó que todas las cepas presentaban un número similar de bacterias fagocitadas (Figura 32 A). Este hallazgo es significativo porque demuestra que las mutaciones del SST6-2 en EHEC O157:H7 no afectaron la capacidad de ingreso al macrófago. Luego, en paralelo se realizaron recuentos de UFC a las 24 hs y se calculó un porcentaje de sobrevivencia relativo al recuento obtenido a las 2 hs (el cual fue considerado como el 100%).

Se evidenció una diferencia significativa al cuantificar una menor cantidad de EHEC O157:H7 EDL933 $\Delta tssB$ después de 24 horas de incubación en comparación con

la cepa salvaje (Figura 32 B). En contraste, no se observaron diferencias significativas entre la cepa EHEC O157:H7 $\Delta clpV$ y la cepa salvaje (Figura 32 B).

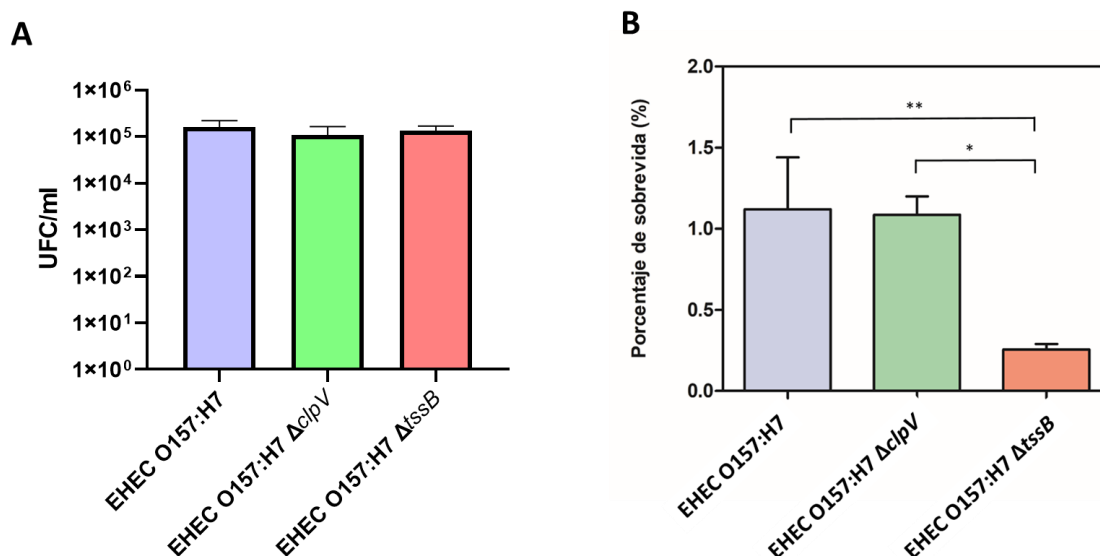


Figura 32. **A)** Recuento de UFC de EHEC O157:H7 salvaje y mutantes del SST6-2 a las 2 hs de incubación con macrófagos murinos RAW 264.7. **B)** Porcentaje de sobrevivencia de EHEC O157:H7 salvaje y mutantes del SST6-2 luego de 24 hs de incubación con los macrófagos. Prueba estadística *unpaired t test* $p < 0.05$; $n = 3$.

Los resultados obtenidos indican que la cepa EHEC O157:H7 EDL933 posee la capacidad de persistir en el macrófago incluso después de 24 horas de ser fagocitada. Se observa que la funcionalidad del SST6-2 desempeña un papel crucial en esta supervivencia, ya que se registró una disminución significativa en el porcentaje de sobrevivencia de la cepa mutante EHEC O157:H7 $\Delta tssB$ en comparación con la cepa salvaje. Sin embargo, esta diferencia no se observa de la misma manera en la cepa EHEC O157:H7 $\Delta clpV$, que presenta un fenotipo similar al de la cepa salvaje. Este resultado será abordado con más detalle en la sección de discusión.

8.1.3 Discusión

En este trabajo se determinó una distribución y organización genética del SST6-2 en EHEC O157:H7 EDL933. En este trabajo se demostró que la cepa de EHEC O157:H7 EDL933 estudiada posee una región de aproximadamente 35 Kb que contiene 14 genes estructurales que codifican un SST6-2 completo. El análisis bioinformático permitió revelar que el SST6-2 se encuentra en una isla genómica O, en la cual el contenido de GC en esta región es (51,9%), lo cual es significativamente diferente del resto del genoma (50,38%), a su vez se detectaron genes y elementos móviles (tRNA *-aspV*, transposasas e integrasas), lo que sugiere que este sistema pudo haber sido adquirido por un evento de transferencia horizontal. Además, es interesante destacar que el SST6-2 tiene una alta prevalencia, como lo demuestra el análisis de más de 300 genomas de EHEC O157:H7, donde se encontró presente en el 92% de los casos. Estos hallazgos dan un indicio acerca de la funcionalidad y la ventaja adaptativa que podría conferir el SST6-2 a la bacteria, favoreciendo así su selección y evitando su pérdida en la población bacteriana.

De acuerdo con la organización y la homología de secuencia de los genes, los SST6 se clasifican en tres grupos diferentes SST6 (1-3). Entre los tres grupos filogenéticos, los SST6-1 y SST6-2 son los más frecuentes en los genomas de *E. coli*. Es de destacar que el SST6-2 presenta alta prevalencia en cepas patógenas con alta virulencia como EAEC y EHEC O157:H7 (68).

Luego, mediante un análisis bioinformático se confirmó que el SST62 de EHEC O157:H7 EDL933 posee homología y una organización genética similar a otros SST6-2 ya reportados en cepas como *E. coli* DE719, *E. coli* RS218 y *S. enterica* serovar Gallinarum 287/91 (77,113,135). En estos patógenos se reportó que el SST6-2 está asociado con la sobrevivencia en macrófagos, adhesión e invasión celular. Sin embargo, es importante tener

precaución al interpretar esta información sobre la prevalencia y virulencia, ya que su presencia no necesariamente implica una participación directa del SST6 en la patogénesis.

Con el objetivo de determinar la actividad del SST6-2 en relación con la sobrevivencia en macrófagos y descartar una posible función antibacteriana, se llevó a cabo un ensayo de competencia interbacteriana. En este ensayo, la cepa EHEC O157:H7 (SST6⁺) fue enfrentada a la cepa de referencia *E. coli* K-12 (SST6⁻) como predador y presa, respectivamente. No se observó actividad antibacteriana durante este proceso. Además, se evaluó la actividad bactericida de las cepas mutantes del SST6 EHEC O157:H7 $\Delta clpV$ y $\Delta tssB$, las cuales tampoco mostraron dicha actividad. Estos hallazgos condujeron a la conclusión de que el SST6-2 no posee actividad antibacteriana en la cepa EHEC O157:H7 EDL933.

Se ha reportado que la actividad antibacteriana es inducida cuando dos bacterias heterólogas con SST6⁺ se enfrentan, la actividad del SST6 de una induce la actividad del SST6 de la otra (122). Por ejemplo, Basler y colaboradores demostraron que la actividad bactericida del SST6 de *Pseudomonas aeruginosa* es activada por una señal correspondiente al ataque del SST6 de la cepa presa *Vibrio cholerae*. Sin embargo, Wan y colaboradores demostraron que en una interacción heteróloga el SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 no presentó actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa*. Por lo tanto, la ausencia de actividad bacteriana observada frente a *E. coli* K-12 no es por la ausencia de una especie heteróloga, sino por una propiedad intrínseca del SST6-2.

Por otro lado, se realizó en la base de datos Secret6 un análisis de riesgo para determinar si EHEC O157:H7 podría eliminar a *E. coli* K-12 en función de las proteínas de inmunidad del SST6. Los resultados demostraron que *E. coli* K-12 sería susceptible de ser eliminada por EHEC O157:H7. Sin embargo, empíricamente se demostró que en

las condiciones de cultivo *in vitro* EHEC O157:H7 no manifiesta un fenotipo de competencia.

En base a estos resultados, la predicción bioinformática del SST6-2 sobre la relación con la sobrevida en macrófagos cobró fuerza luego de demostrar que el SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 no presentó actividad antibacteriana. Dada la homología de secuencia con otros SST6-2 como el de *E. coli* DE719, *E. coli* RS218 y *S. enterica* serovar Gallinarum 287/91, se postuló que el SST6-2 de EHEC O157:H7 podría estar involucrado con la sobrevida en macrófagos.

Patógenos extracelulares como UPEC, *A. Streptococcus*, *S. aureus* y *Enterococcus faecalis* tienen la capacidad de sobrevivir dentro de fagocitos (153–156). En ese sentido, Poirier y colaboradores demostraron que EHEC O157:H7 EDL933 pudo sobrevivir durante 24 hs en macrófagos humanos THP-1 (130). Más recientemente Wan y colaboradores reportaron la sobrevida de EHEC O157:H7 en macrófagos murinos RAW 264.7. En esta tesis se observó que EHEC puede persistir en el interior del fagosoma de macrófagos murinos hasta 24 hs post infección y que co-localiza con estructuras lisosomales tardías según la marcación con LAMP3, lo que confirma aún más lo reportado por trabajos previos (130,157). Esto es interesante porque hay dos poblaciones bacterianas: una que resiste al ataque del macrófago y otra que es eliminada. Esta hipótesis de doble población ha sido propuesta para otros patógenos tales como *E. faecalis*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* (156,158,159). La prolongada sobrevida de EHEC O157:H7 puede ser importante en el curso de la infección, por este motivo se decidió evaluar la implicancia del SST6-2 en la sobrevida observada.

La obtención de cepas mutantes del SST6-2 EHEC O157:H7 $\Delta clpV$ y $\Delta tssB$ facilitó la evaluación de la relación de este sistema de secreción en la supervivencia de la

bacteria dentro del macrófago. Se observó que la mutación del gen *tssB* que codifica para la proteína del complejo de cola, resultó en una disminución significativa en el porcentaje de sobrevivencia de la bacteria en comparación con la cepa salvaje. En cambio, la mutación del gen *clpV* que codifica para la ATPasa del SST6-2, no afectó significativamente el porcentaje de supervivencia en comparación con la cepa salvaje. Este es un resultado interesante ya que la proteína TssB es clave para la polimerización y contracción del complejo de cola (67), lo que permite la expulsión del tubo central formado por Hcp y, por consiguiente, la translocación de los efectores (67). Por lo tanto, la mutación del gen *tssB* impediría la polimerización y contracción del complejo de cola del SST6-2, lo que interferiría con la translocación de efectores, contribuyendo a la disminución de la supervivencia bacteriana dentro de los macrófagos.

Por otro lado, la mutación en el gen *clpV* no conlleva cambios significativos en el porcentaje de sobrevivencia en el macrófago en comparación con la cepa salvaje. ClpV es una proteína citoplasmática perteneciente a la familia de Hsp100 AAA+ proteínas, las cuales son requeridas para desplegar sustratos al actuar como ATPasa (67). Se postula que ClpV podría desempeñar un papel durante el ensamblaje del SST6 al promover la despolimerización del complejo de cola formado por TssB-TssC, lo que permitiría su liberación al citoplasma y, eventualmente, su posterior polimerización para facilitar la translocación de los efectores.

Según los resultados observados, la mutación en el gen *clpV* no impediría la realización de un único evento de translocación de efectores, dado que TssB podría polimerizar el complejo de cola. Sin embargo, ClpV no sería capaz de despolimerizarlo y liberar las proteínas TssB-TssC al citoplasma, lo que las dejaría inaccesibles para un nuevo ciclo de polimerización, contracción y secreción de efectores. Este hallazgo sugiere que este

único evento podría ser suficiente para asegurar la supervivencia de la bacteria en el interior del macrófago, tal como se observa en la cepa salvaje.

El SST6 inicialmente fue identificado como un factor de virulencia en *E. tarda* en 2004 (160), ya que se ha asociado con fenotipos bacterianos virulentos, incluyendo adhesión, invasión, alteración del citoesqueleto, sobrevivencia intracelular, citotoxicidad y respuesta al hospedador, sugiriendo al SST6 como crucial para la patogénesis. Como una maquinaria proteica de secreción, el SST6 supone que secreta un arsenal de proteínas efectoras que median la interacción con el macrófago. La implicancia del SST6-2 en la sobrevivencia de EHEC O157:H7 en el macrófago fue demostrada en este trabajo. Sin embargo, los efectores identificados y caracterizados dependientes del SST6-2 en EHEC O157:H7 son escasos y ese es el objetivo de esta investigación.

Hay pocos efectores identificados en la última década, excepto los efectores canónicos de las familias Hcp y VgrG (161). En este trabajo se realizaron dos enfoques para la identificación de efectores: a partir de análisis bioinformático basado en homología de secuencia con efectores ya caracterizados y por otro lado a través de la recopilación de datos experimentales reportados en bibliografía. Es interesante observar que ambas metodologías fueron tuvieron en común la identificación de KatN. Esto deja en evidencia que la predicción bioinformática no valida completamente los efectores que fueron identificados por datos experimentales, esto puede deberse a que aún es escasa la información sobre efectores. Sin embargo, el análisis *in silico* y el uso de predictores permiten iniciar estudios de identificación y caracterización de efectores asociados al SST6 (162).

En este sentido, la predicción bioinformática permitió identificar a KatN, *cold shock protein*, Rhs, Hcp-1, Hcp-2 e YbjW. De los efectores predichos mediante herramientas bioinformáticas KatN, fue previamente caracterizado por Wan y colaboradores (115).

La mayoría de los candidatos a efectores del SST6 fueron proteínas Rhs. Se ha reportado en bibliografía que muchas de ellas tienen dominios catalíticos en su extremo C-terminal de tipo toxina con actividad antibacterial (107). El análisis bioinformático reveló que la mayoría presentaba dominios PAAR en el extremo N-terminal, que facilitaría su asociación con VgrG y su translocación por el SST6-2. Por este motivo, se tornaron interesantes candidatos a efectores del SST6. No obstante, la gran mayoría de ellos no revelaron dominios catalíticos en su extremo C-terminal, solo RhsA (Z5014) el cual presentó un dominio Ntox34, caracterizado con actividad RNase (118). Además, tanto RhsA (z5014), RhsB (z0272), RhsI (z5488) fueron predichas como extracelulares por lo que es un atributo a tener en cuenta ya que podrían ser secretados por el SST6-2.

Entre ellos también se identificaron *cold shock protein*, aunque no presentan ninguna característica que pueda estar asociada con la translocación de efectores y tampoco se han reportado efectores con estas características resultan interesantes porque podrían cumplir funciones en condiciones de estrés (143).

La predicción bioinformática también reveló que Hcp-1 y Hcp-2, dos componentes estructurales del SST6-2, podrían ser potenciales efectores. Analizando en profundidad a cada uno de ellos, ninguno presentó dominios catalíticos en su extremos C-terminal tal como lo reportó Ma y colaboradores en STEC004 (163). Sin embargo, el análisis predictivo de localización subcelular reveló que tanto Hcp-1 como Hcp-2 son extracelulares, esto podría indicar que ambos podrían ser secretados.

Por otro lado, se identificó a YbjW una hidroxilamina reductasa asociada a la detoxificación de productos metabólicos del nitrógeno (148). Los macrófagos tienen capacidades antibacterianas ampliamente fortalecidas, incluida la generación de intermediarios reactivos del nitrógeno como el óxido nítrico a través de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS2) (164). Usando arginina y oxígeno, el homodímero NOS2 genera NO el cual puede difundir a través de la membrana del fagosoma ya que NOS2 se encuentra localizada en su membrana (165). La resistencia al estrés nitrosativo generado por NO involucra la expresión de YbjW (148). Por lo tanto, el candidato YbjW despierta interés como potencial efector del SST6-2 de EHEC O157:H7.

Además, se realizó la búsqueda de nuevos efectores a partir de datos experimentales publicados por Wan y colaboradores. Esto ha dado un total de 72 candidatos. Aunque las condiciones experimentales utilizadas para obtener los sobrenadantes e identificar las proteínas candidatas a efectores del SST6 no coinciden con las condiciones de este trabajo de tesis doctoral, seleccionamos estos candidatos debido a nuestro interés en identificar proteínas translocadas exclusivamente por este sistema de secreción.

La mayoría de los efectores identificados a partir de datos experimentales participan en diferentes rutas metabólicas. En este sentido, en otros patógenos como *Burkholderia* se ha reportado la identificación de un efector del SST6-2, llamado TecA que es secretado en el fagocito del hospedador. TecA es una deamidasa que inactiva múltiples GTPasas incluyendo RhoA. La inactivación de RhoA dispara la respuesta inflamatoria, lo que lleva a la piroptosis del macrófago (166).

Ha cobrado interés en los últimos años el concepto de proteínas “moonlight” ya que son proteínas que han sido detectadas en diferentes especies bacterianas y que pueden tener funciones diferentes de acuerdo al contexto en el que se encuentran (167). Se está

descubriendo que un número creciente de especies bacterianas tienen proteínas “moonlight” y las actividades de dichas proteínas pueden contribuir al comportamiento de virulencia bacteriana. Las enzimas glicolíticas, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD) y enolasa, y las proteínas del estrés celular: chaperonina 60, Hsp70 y peptidil prolil isomerasa, se encuentran entre las proteínas bacterianas “moonlight” más comunes que desempeñan un papel en la virulencia bacteriana (168). Las actividades de estas proteínas “moonlight” incluyen la adhesión y la modulación de los procesos de señalización celular. Es probable que sólo se haya visto la punta del iceberg de estas proteínas “moonlight” bacterianas y que la próxima década traiga consigo muchos nuevos descubrimientos al respecto (167).

8.1.4 Conclusión

En este capítulo se logró realizar una caracterización completa de los genes estructurales del SST6-2 de EHEC O157:H7 donde además se demostró la relevancia que este sistema posee con la sobrevida en macrófagos, reforzando lo observado en la bibliografía. Además, se profundizó en el conocimiento de nuevos potenciales efectores aplicando metodologías basadas en bioinformática y datos experimentales. Estos hallazgos despiertan nuevos interrogantes acerca cómo estos podrían translocarse, probablemente sean efectores de translocación tipo cargo donde interactúen con proteínas estructurales del SST6-2 facilitando su secreción. Por otro lado, si estos efectores son translocados qué función ejercerían y cómo aportarían a la sobrevida bacteriana.

**8.2 Capítulo 2. Transcriptómica de
EHEC O157:H7: estudio de la in-
teracción hospedador-patógeno con
enfoque en el SST6-2 y efectores
asociados**

8.2.1 Introducción

En el capítulo 1 se demostró que EHEC O157:H7 EDL933 contiene una copia del SST6-2 y que este le otorga ventajas adaptativas frente al macrófago. Además, se identificaron potenciales efectores que podrían participar en la sobrevida observada.

El estudio de la interacción hospedador-patógeno por medio de la secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) es un hecho que ha cobrado importancia ya que permite comprender los mecanismos de virulencia de diferentes patógenos (169). Se ha reportado en otros patógenos como *S. Typhimurium* el uso de enfoques basados en RNA-seq para estudiar mecanismos adaptativos frente a macrófagos, obteniendo resultados interesantes que explican la sobrevida bacteriana en ese contexto hostil (129). El único estudio de esta índole en EHEC fue realizado por Poirier y colaboradores en el año 2008 por medio de la metodología de microarray (130). Aunque esta tecnología todavía se utiliza para el estudio de transcritomas, con el advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación, los microarrays han sido desplazados por RNA-seq debido a su mayor fidelidad en los resultados y la ventaja de usar menor cantidad de RNA.

Por este motivo se decidió hacer en este trabajo un análisis de RNA-seq de EHEC O157:H7 fagocitada para profundizar en el conocimiento sobre su mecanismo de sobrevida en el macrófago principalmente en el SST6-2 y los efectores que fueron identificados en el capítulo 1. Además, de manera complementaria se estudio el perfil transcripcional SST6-2 bajo condiciones de estrés *in vitro* que mimetizan las propiedades bioquímicas de lo que ocurre en un fagosoma tardío (pH ácido, estrés oxidativo, carencia de nutrientes). Este enfoque permitió identificar y caracterizar las respuestas específicas de la bacteria durante la infección y bajo condiciones de estrés, proporcionando una comprensión

más detallada de cómo EHEC O157:H7 utiliza el SST6-2 y los efectores identificados en su adaptación en un entorno estresante.

8.2.2 Resultados

8.2.2.1 RNA-seq de EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada por macrófagos murinos RAW 264.7 y expuesta a condiciones de estrés extremas *in vitro*

Se realizó una secuenciación masiva utilizando la metodología de RNA-seq con el objetivo de revelar el perfil transcriptómico de EHEC O157:H7 en respuesta a la fagocitosis temprana con relación al SST6-2 y a los potenciales efectores asociados. La obtención de RNA de alta calidad, representativa de la expresión génica de la bacteria fagocitada, se presentó como un desafío significativo. Con el fin de poder estudiar mecanismos de activación asociados al SST6-2 e identificar potenciales efectores asociados con estadios tempranos de la fagocitosis, se seleccionó un periodo de incubación de 2 hs con los macrófagos.

Diversos factores incidieron en el procedimiento de extracción, entre ellos, el bajo nivel de fagocitosis de la bacteria, la capacidad de la bacteria para mantener su estabilidad frente a condiciones hostiles del entorno, la presencia predominante de RNA del hospedador (constituyendo aproximadamente menos del 1% del total de RNA en la muestra), la brevedad en la vida del RNA, la posible contaminación con RNA ribosomal y pequeños RNA. Ante estas condiciones se tomó la decisión estratégica de estudiar el transcriptoma de la bacteria en condiciones extremas, que en adelante se denominará como estrés.

Para el caso de la cepa EHEC O157:H7 EDL933 expuesta a condiciones de estrés, se cultivó en medio mínimo M9 suplementado con agentes estresantes con el fin de simular un fagosoma tardío, esto incluye estrés oxidativo (H₂O₂), quelante de cationes divalentes, ausencia de nutrientes y pH 4,5 (43). Bajo estas condiciones de estrés se incubó

a la cepa bacteriana a 37 °C durante un periodo de 2 hs y posteriormente, se extrajo el RNA sin necesidad de realizar pasos adicionales de purificación.

La obtención de muestras de RNA para RNA-seq es un proceso crucial que requirió estrictos controles de calidad para asegurar la integridad y la pureza del RNA, factores fundamentales para la generación de una biblioteca confiable ([ver material suplementario capítulo 2](#)).

8.2.2.2 Perfil transcripcional de EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada por macrófagos murinos RAW 264.7 y expuesta a estrés

Los datos de RNA-seq obtenidos de EHEC O157:H7 EDL933 durante la fagocitosis revelaron que de los 5646 genes totales el 85% de los genes estaban presentes bajo estas condiciones. Este alto porcentaje de genes identificados proporciona una visión integral de la actividad génica de la cepa durante su interacción con los macrófagos.

El análisis de RNA-seq comparativo entre EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada por macrófagos murinos RAW 264.7 y de la cepa cultivada en medio DMEM (control) reveló que 1758 genes (31 %) fueron diferencialmente expresados estadísticamente (se consideraron diferencialmente expresados los genes con un \log_2 Fold Change (FC) > 1 para aquellos sobreexpresados y un \log_2 FC < -1 para los subexpresados, siempre y cuando sus valores de p-valor fueran < 0,05). Del total de genes diferencialmente expresados, 860 genes (15%) de fueron identificados como sobreexpresados, es decir, su expresión aumentó, mientras que 898 genes (15 %) fueron subexpresados, indicando una disminución en su expresión (Figura 33 A).

Además, se observó que 213 genes (3,8%) sobreexpresados y 243 (4,3%) genes subexpresados poseen funciones desconocidas (Figura 33 A). Esto resalta la importancia

de investigaciones adicionales para comprender mejor el papel de estos genes en la respuesta de la bacteria a la fagocitosis y su interacción con el hospedador.

En la cepa EHEC O157:H7 EDL933 expuesta a estrés, se detectaron aproximadamente el 89% de los genes, de los cuales 1998 (36%) estaban diferencialmente expresados. Entre ellos 1046 (19%) sobreexpresados y 952 (15%) subexpresados en relación a la condición control (Figura 33 A). Se observó que 225 genes (4%) sobreexpresados y 356 (7%) subexpresados tienen función desconocida (Figura 33 A).

Con el propósito de comparar el perfil de expresión diferencial entre EHEC O157:H7 fagocitada y expuesta a estrés, se elaboró un diagrama de Venn para observar cuántos genes comparten dicho perfil. Pudo observarse que 673 genes fueron exclusivamente sobreexpresados en EHEC O157:H7 fagocitada y 859 en la bacteria expuesta a estrés, mientras que un total de 187 genes estaban sobreexpresados en ambas condiciones (Figura 33 B). Por otro lado, se observaron números similares en ambas condiciones para los genes subexpresados, 730 genes exclusivos para la bacteria fagocitada, 784 bajo condiciones de estrés y 168 subexpresados tanto en la bacteria fagocitada como expuesta a estrés (Figura 33 C).

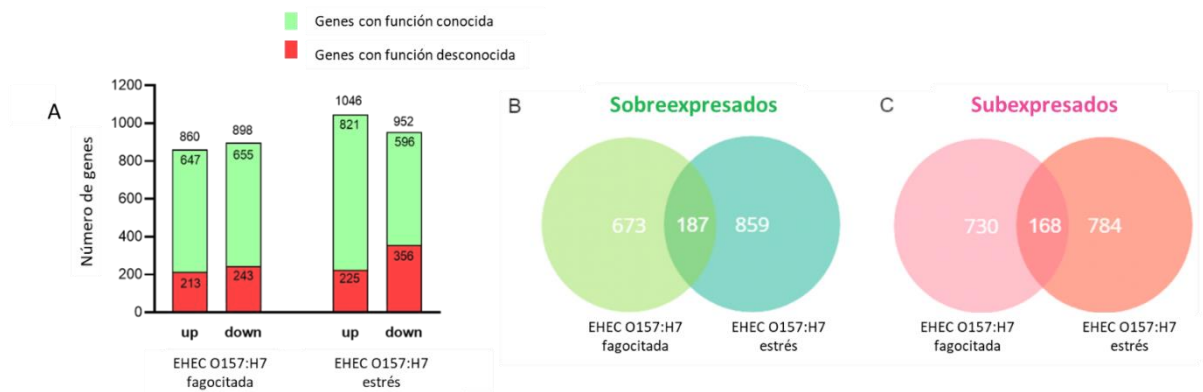


Figura 33. Análisis global de genes diferencialmente expresados. **A)** Números de genes sobreexpresados y subexpresados en EHEC O157:H7 fagocitada y expuesta a estrés luego de 2 hs de incubación. Diagrama de Venn en el que se muestra el número de genes sobreexpresados **B)** y subexpresados **C)** para EHEC O157:H7 fagocitada y expuesta a estrés.

Estos resultados nos indican que EHEC O157:H7 EDL933 está adaptándose al entorno en el que se encuentra, ya que se observa un patrón de expresión diferencial en la bacteria fagocitada y expuesta a estrés.

8.2.2.3 Caracterización del perfil transcripcional de genes estructurales del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada y expuesta a estrés

Con el propósito de evaluar la respuesta del SST6-2 frente a la fagocitosis de EHEC O157:H7 EDL933, se analizó el nivel transcripcional de los genes estructurales del SST6-2.

Se observó que, cuando la cepa EHEC O157:H7 EDL933 es fagocitada por macrófagos murinos RAW 264.7 algunos como genes *tssB* (\log_2FC 1,69; p value: $1,9 \cdot 10^{-2}$) y *tssC* (\log_2FC 1,72; p value: $9,4 \cdot 10^{-4}$) se vieron sobreexpresados (Figura 34). Los genes

clpV, *hcp*, *vgrG* y *tssL* no fueron detectados en el resultado del RNA -seq, mientras que los genes estructurales restantes no fueron estadísticamente significativos para ser considerados diferencialmente expresados o sin cambios.

En EHEC O157:H7 expuesta a condiciones de estrés *in vitro* se observó que los genes *tssK* (\log_2FC 1,06; p value: $4 \cdot 10^{-3}$) y *tssC* (\log_2FC 1,11; p value: $1 \cdot 10^{-3}$) mostraron una ligera sobre expresión (Figura 34). Por el contrario, se observó una subexpresión de *tssE* (\log_2FC -1,61; p value: $2,00 \cdot 10^{-2}$). Además, se vió que el gen *tssM* no cumple con la condición de estar diferencialmente expresado (\log_2FC -0,96; p-value: 0,006). Los genes *clpV*, *hcp*, *vgrG* y *tssL* no fueron detectados en el resultado del RNA-seq, mientras que los genes estructurales restantes no fueron estadísticamente significativos para ser considerados diferencialmente expresados o sin cambios.

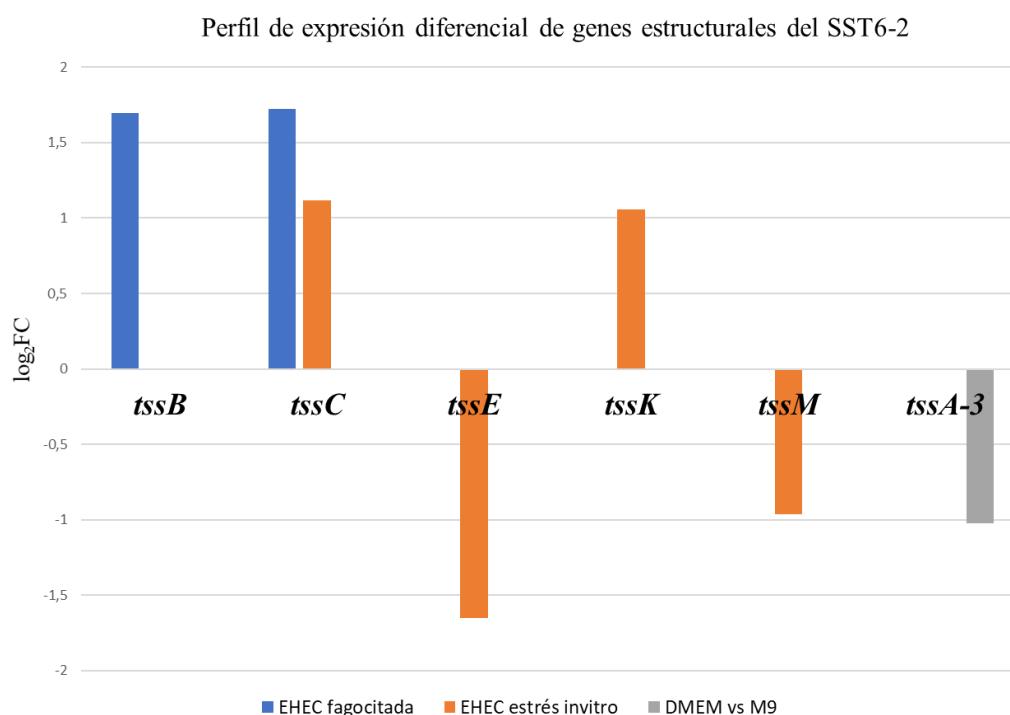


Figura 34. Perfil de expresión diferencial de los genes estructurales del SST6-2 en EHEC O157:H7 en función del \log_2FC para las diferentes condiciones experimentales: fagocitada, expuesta a estrés y la comparación de EHEC crecida en medio DMEM y EHEC crecida en medio mínimo M9.

Se ha reportado que otros sistemas de secreción como el SST6-3 de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) muestra inducción en medios sintéticos de cultivos diseñados para macrófagos (170). Dado que no se detectaron variaciones significativas en la expresión diferencial de la mayoría de los genes del SST6-2 en EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada, surge el interrogante sobre si el medio de cultivo DMEM podría funcionar como un inductor de la expresión de estos genes.

Por este motivo, se llevó a cabo un análisis de expresión génica diferencial comparando el transcriptoma de EHEC O157:H7 EDL933 cultivada en medio DMEM con el obtenido en medio mínimo M9 utilizado como control (Figura 34). Al examinar específicamente los genes del SST6-2 en esta comparación, se observó que el gen *tssA-3* (Z2049) se encontraba ligeramente subexpresado (\log_2FC -1,02; p-value: 0,01) (Figura 34). En cambio, en los restantes genes estructurales no se evidenciaron cambios significativos en la expresión diferencial. En consecuencia, podemos concluir que el medio DMEM no induce la expresión de los genes estructurales del SST6-2.

Dado que el represor global tipo histona, H-NS, ha sido reportado como represor del SST6 en *V. cholerae*, *Edwardsiella tarda* y *S. Typhimurium*, hemos especulado que también podría ejercer su función represora sobre el SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 (171–173). Sin embargo, al examinar el perfil de expresión diferencial de H-NS en la bacteria fagocitada, se observó subexpresado (\log_2FC -2,69; p value: $2,32 \cdot 10^{-46}$).

8.2.2.4 Perfil de expresión diferencial de potenciales efectores del SST6-2 en EHEC O157:H7 fagocitada y expuesta a estrés

En el capítulo 1, tópico [1 5.1.2.3 Identificación de potenciales efectores del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933](#), predijimos 98 posibles efectores (26 por la metodología

bioinformática y 72 experimentales basados en el trabajo de Wan y col (115). La predicción de estos efectores genera reflexiones sobre su función en el comportamiento observado en relación con la supervivencia de la bacteria fagocitada y su respuesta ante condiciones de estrés. Para abordar esta cuestión, se contrastaron estos candidatos con los resultados de RNA-seq con el fin de determinar el perfil de expresión diferencial de estos posibles efectores de SST6-2.

De los 26 efectores que fueron predichos por bioinformática, se observaron 4 de ellos diferencialmente expresados en EHEC fagocitada (1 sobreexpresado y 3 subexpresado) (Figura 35). En cambio, frente a la condición de estrés *in vitro* se vieron 2 genes que fueron diferencialmente expresados (1 sobre y 1 subexpresados), mientras que otros 2 permanecieron sin cambios (Figura 35) (Tabla 9).

En el caso de los 72 potenciales efectores que fueron identificados a partir datos experimentales 15 de ellos se vieron sobreexpresados, 16 sin cambios y 13 subexpresados en EHEC fagocitada (Figura 35). En EHEC expuesta a estrés 29 se vieron sobreexpresados, 5 sin cambios y 10 subexpresados (Figura 35) ([ver tabla 2 material suplementario capítulo 2](#)).

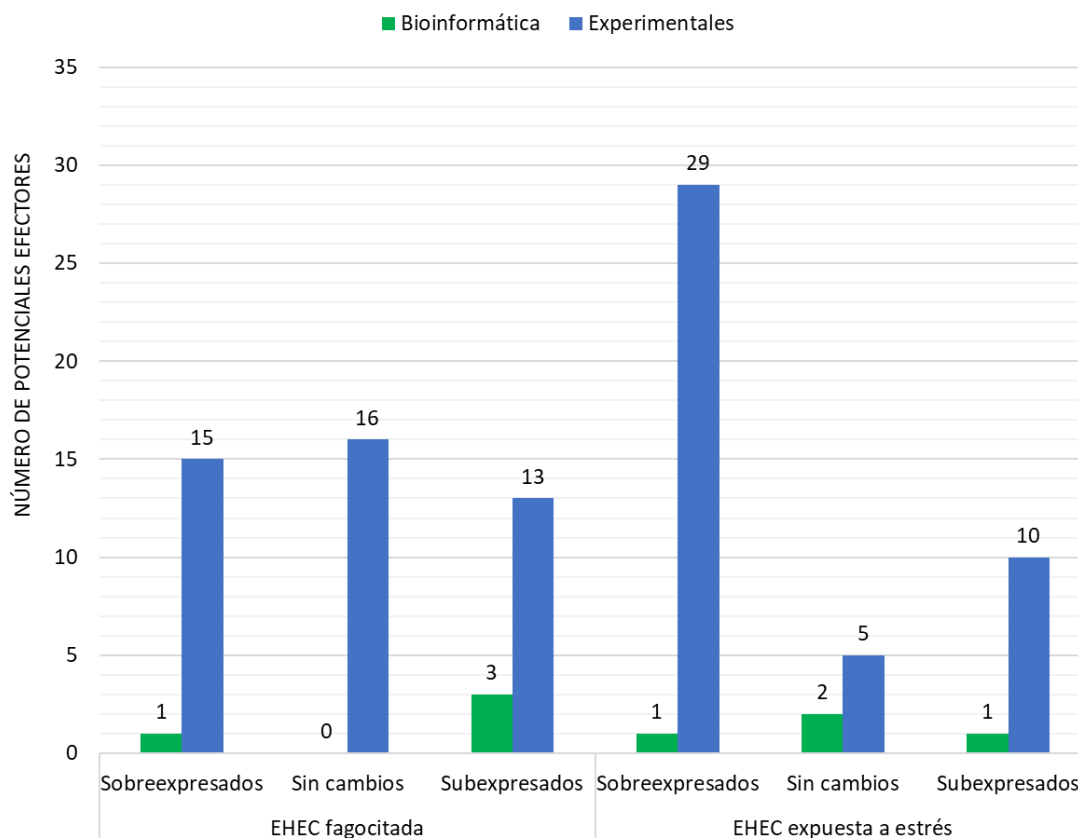


Figura 35. Comparación del número de potenciales efectores diferencialmente expresados (sobreexpresados, sin cambios y subexpresados) identificados mediante métodos bioinformáticos (verde) y experimentales (azul) en diferentes condiciones (EHEC fagocitada y EHEC expuesta a estrés)

8.2.2.4.1 Expresión diferencial de efectores indentificados por bioinformática

En EHEC fagocitada los genes *cspD*, *rshG* y *cspE* se vieron subexpresados, mientras que el gen *ybjW* se vio sobreexpresado (Tabla 9).

En EHEC expuesta a estrés los genes *cspD* y *cspE* se vieron sin cambios de expresión diferencial ya que sus valores de \log_2FC son significativamente cercanos a cero. En cambio, el gen *rshG* se vio subexpresado e *ybjW* sobreexpresado (Tabla 9).

Es decir que el gen *YbjW* se vio sobreexpresados en EHEC fagocitada y expuesta a estrés.

Tabla 9. Expresión diferencial de potenciales efectores del SST6-2 identificados mediante predicciones bioinformáticas en EHEC O157:H7 EDL933 expuesta diferentes condiciones (fagocitada y expuesta a estrés)

Locus tag	Gen	Fagocitada		Estrés		Función
		log ₂ FC	p-valor	log ₂ FC	p-valor	
Z1117	<i>cspD</i> *	-3,30	2,53E-31	0,73	1,02E-12	Tyrosine-protein kinase
Z1107	<i>ybjW</i>	1,56	0,024	2,49	5,87E-19	Hidroxilamina reductasa
Z0702	<i>rhsG</i>	-1,09	0,019	-1,19	1,11E-08	Rhs
Z0769	<i>cspE</i> *	-3,47	9,96E-93	0,095	0,041	Cold Shock protein

*fueron diferencialmente expresados exclusivamente la bacteria fagocitada

8.2.2.4.2 Perfil de expresión diferencial de potenciales efectores del SST6-2 provenientes de datos experimentales

De los 72 genes de potenciales efectores identificados por Wan y colaboradores hemos detectado un patrón de expresión diferencial heterogéneo entre las dos condiciones evaluadas (EHEC fagocitada y expuesta a estrés) (Figura 36).

Potenciales efectores del SST6-2

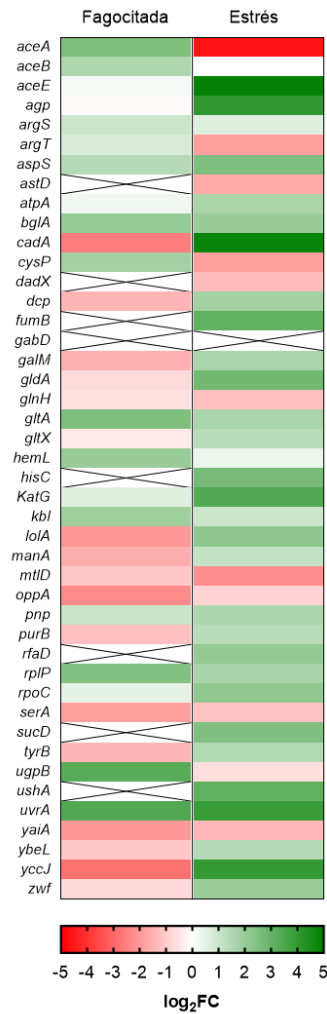


Figura 36. Potenciales efectores del SST6-2 identificados a partir de datos experimentales reportados por Wan y colaboradores y su perfil de expresión diferencial en EHEC O157:H7 fagocitada y expuesta a estrés. Los valores están representados por el log₂FC, en la escala del color verde para aquellos genes que están sobre expresados y en la escala del color rojo para aquellos sub expresados, las tonalidades cercanas a cero indican que no presentaron cambios. Los genes marcados con una cruz representan aquellos que no fueron estadísticamente significativos para ser considerados diferencialmente expresados o con el valor de $p > 0,05$.

De los genes 72 candidatos a efectores del SST6-2 obtenidos de datos experimentales se encontró que 7 de ellos se sobreexpresaron en ambas condiciones (fagocitada y

expuesta a estrés), 8 exclusivamente en la bacteria fagocitada y 22 en EHEC expuesta a estrés (Figura 37 A).

Al observar los genes candidatos a efectores subexpresados, se observó que 3 de ellos estaban subexpresados en ambas condiciones (fagocitada y expuesta a estrés), 10 exclusivamente en la bacteria fagocitada y 7 en EHEC expuesta a estrés (Figura 37 B).

Para el caso de los genes que no fueron diferencialmente expresados ($\log_2FC < 1$ y $\log_2FC > -1$ con $p\text{-valor} < 0,05$) 3 se observaron en ambas condiciones, 13 exclusivamente en la bacteria fagocitada y 2 bajo la condición de estrés *in vitro* (Figura 37 C).

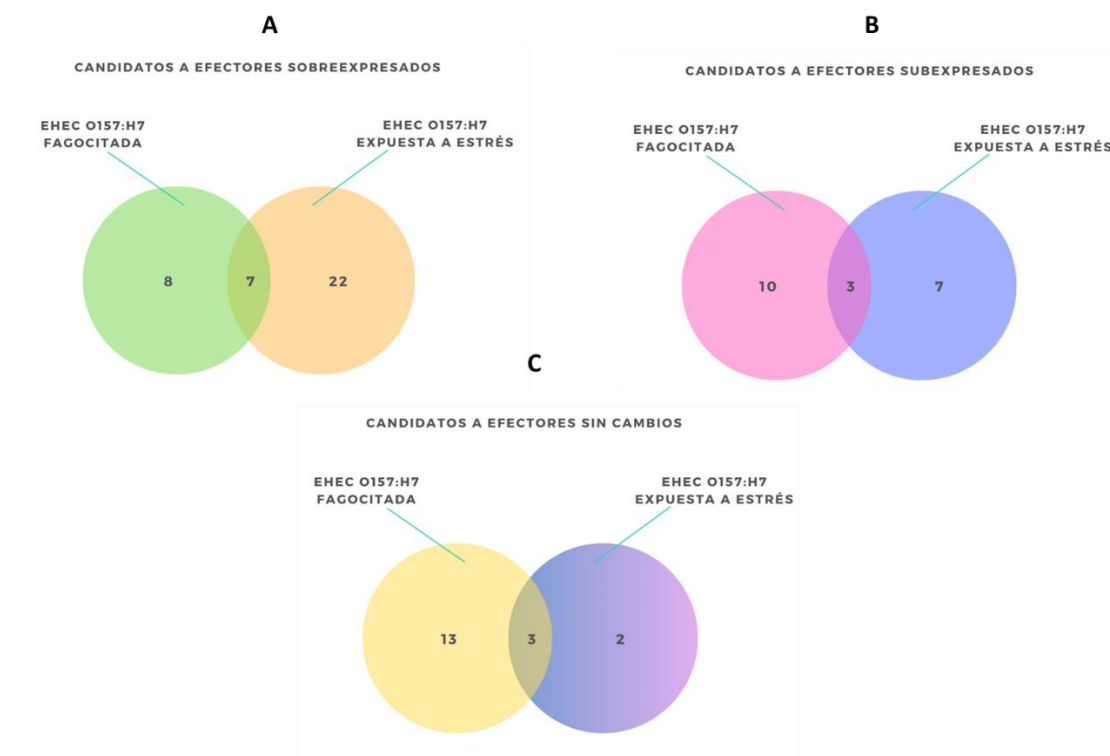


Figura 37. Diagrama de Venn para genes codificantes de potenciales efectores del SST6-2 provenientes de datos experimentales que se vieron diferencialmente expresados en EHEC O157:H7 fagocitada y expuesta a estrés. En **A)** para los candidatos a efectores sobreexpresados, en **B)** para aquellos que se vieron subexpresados y en **C)** para los que se vieron sin cambios.

Con el fin de evaluar a los posibles efectores, se puso especial atención en aquellos que se encontraron sobreexpresados tanto en la cepa de EHEC O157:H7 fagocitada como en la bacteria expuesta a estrés. Este enfoque se basa en la premisa que la sobreexpresión de estos genes bajo condiciones de estrés y fagocitosis sugeriría un papel crucial en la respuesta adaptativa de la bacteria. La mayoría de ellos están asociados con rutas metabólicas (Figura 38). Sin embargo, se observó un mayor enriquecimiento de procesos relacionados con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el metabolismo del glioxilato en la bacteria fagocitada (Figura 38 A). Por otro lado, en la bacteria expuesta a estrés, se evidenció un enriquecimiento de genes candidatos a efectores involucrados en el metabolismo de pequeñas moléculas, procesos de metabolismo de compuestos aromáticos, unión de metales y metabolismo de hexosas (Figura 38 B).

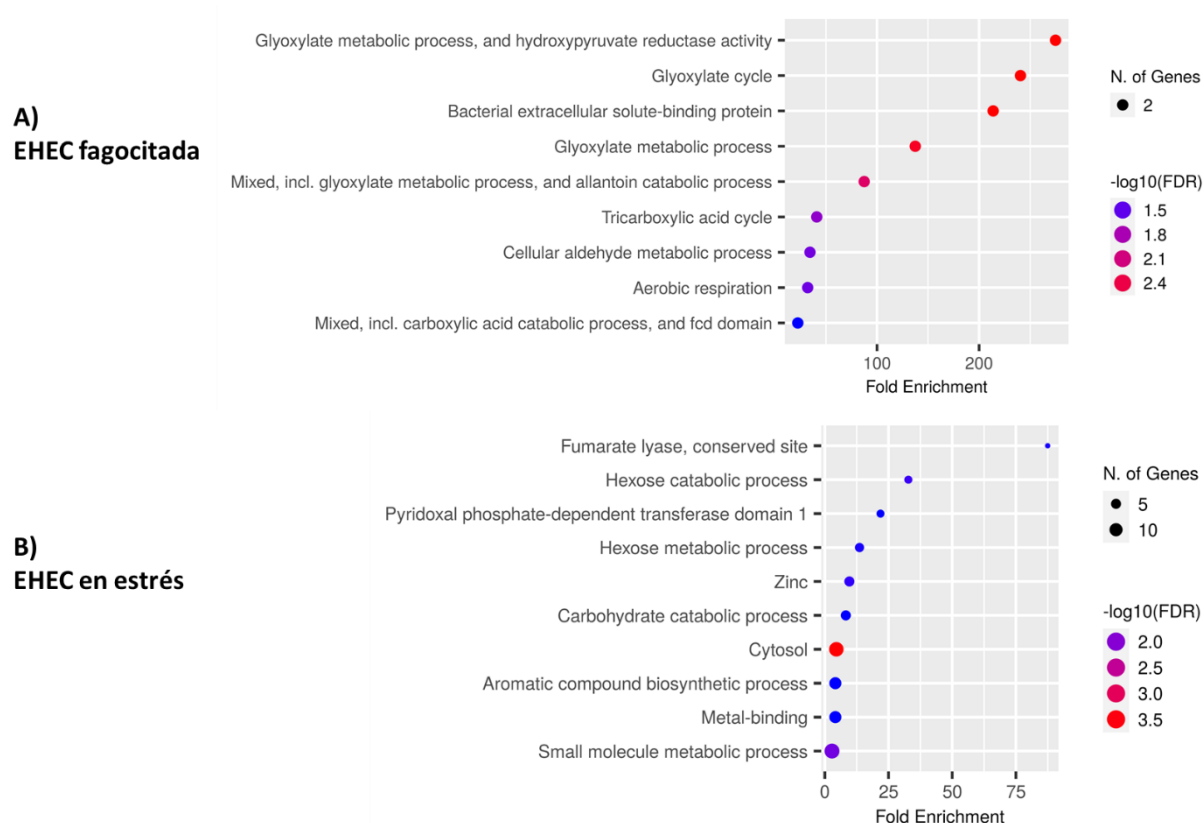


Figura 38. Gráfico de enriquecimiento de genes identificados como candidatos a efectores obtenidos de datos experimentales que se vieron up regulados en EHEC fagocitada **A)** y expuesta a estrés **B)**. Se representan las vías metabólicas

en función del número de genes que participan en ellas. El valor de $-\log_{10}(\text{FDR})$ indica que cuánto más grande es su valor más probable es la ruta en la que participan.

8.2.3 Identificación de candidatos a efectores del SST6-2 sobreexpresados en EHEC fagocitada y bajo condiciones de estrés *in vitro*

La predicción bioinformática mediante el análisis del genoma de EHEC O157:H7 y la recopilación de datos experimentales reportados ha brindado un número interesante de candidatos a efectores. Los resultados del análisis de RNA-seq han permitido evaluar el perfil transcripcional de los efectores identificados en el capítulo 1 y ver que muchos de ellos se encontraron sobreexpresados en EHEC fagocitada y expuesta a estrés.

En base a su sobreexpresión en las condiciones experimentales (EHEC fagocitada y expuesta a estrés) y a las predicciones bioinformáticas que consideran la presencia de péptido señal u otras vías de secreción (ver tabla suplementaria 3), así como la identificación de proteínas citoplasmáticas sin dominios transmembrana que podrían facilitar su translocación a través del SST6-2, y considerando además sus funciones se ha realizado una selección de 38 potenciales efectores del SST6-2 que podrían ser translocados bajo condiciones hostiles (ver tabla 10). Algunos de ellos se vieron sobreexpresados en EHEC fagocitada y expuesta a estrés, un grupo exclusivamente en EHEC fagocitada y otros únicamente en EHEC expuesta a estrés (ver tabla 10).

Tabla 10. Selección de candidatos identificados por bioinformática y reportados por Wan y colaboradores que se vieron sobreexpresados en EHEC fagocitada y expuesta a estrés

Predicción de efectores	Gen	Locus tag	Proteína	EHEC fagocitada		EHEC vs estrés	
				log ₂ FC	p-value	log ₂ FC	p-value
Bioinformática	<i>ybjW</i>	z1107	Hidroxilamino reductase	1,56	0,024	2,49	5,87E-19
Efectores reportados por Wan y colaboradores (115)	<i>aspS</i>	z2919	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase	1,43	6,09E-19	2,53	3,24E-87
	<i>bglA</i>	z4239	6-phospho-beta-glucosidase BglA	2,05	3,84E-24	1,97	6,96E-24
	<i>gltA</i>	z0873	Glutamate synthase [NADPH] large chain	2,52	1,66E-66	1,65	1,66E-84
	<i>kbl</i>	z5044	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	1,88	1,35E-16	1,02	4,74E-87
	<i>pnp</i>	z4525	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	1,05	8,00E-30	1,59	7,99E-25
	<i>rplP</i>	z4684	Large ribosomal subunit protein uL16	2,43	1,73E-66	1,69	1,39E-36
	<i>uvrA</i>	z5657	Excinuclease ABC subunit A	3,39	9,98E-179	3,90	1,05E-48
	<i>aceA</i>	z5601	Isocitrate lyase	2,51	4,35E-15		
	<i>aceB</i>	z5600	Malate synthase A	1,57	5,19E-08		
	<i>argS</i>	z2929	Arginine--tRNA ligase	1,02	3,70E-06		
	<i>astD</i>	z2778	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	1,26	2,70E-01		
	<i>cysP</i>	z3690	Thiosulfate-binding protein	1,78	1,64E-02		
	<i>gabD</i>	z3959	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)] GabD	1,01	5,70E-01		
	<i>hemL</i>	z0165	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	1,97	3,15E-29		
	<i>ugpB</i>	z4822	sn-glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein UgpB	3,26	3,14E-15		
	<i>aceE</i>	z0124	Pyruvate dehydrogenase E1 component			4,96	1,56E-282
	<i>agp</i>	z1421	Glucose-1-phosphatase			4,04	1,06E-08
	<i>atpA</i>	z5232	ATP synthase subunit alpha			1,69	1,81E-27
	<i>cadA</i>	z5734	Inducible lysine decarboxylase			4,83	2,53E-35
	<i>dcp</i>	z2160	Dipeptidyl carboxypeptidase			1,78	8,13E-08
	<i>fumB</i>	z5724	Fumarate hydratase class I, anaerobic			3,07	2,20E-232
	<i>galM</i>	z0926	Aldose 1-epimerase			1,66	3,33E-232

	gldA	z5500	Glycerol dehydrogenase			2,77	5,97E-57
	gltX	z3665	Glutamate--tRNA ligase			1,38	4,47E-18
	hisC	z3183	Histidinol-phosphate aminotransferase			2,64	1,56E-23
	KatG	z5497	Catalase-peroxidase			3,37	6,27E-143
	lolA	z1237	Outer-membrane lipoprotein carrier protein			2,18	2,62E-18
	manA	z2616	Mannose-6-phosphate isomerase			1,17	0,00E+00
	purB	z1860	Adenylosuccinate lyase			1,38	1,84E-22
	rfaD	z5046	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase			2,09	1,83E-52
	rpoC	z5561	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'			2,14	3,20E-42
	sucD	z0883	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha			2,49	1,08E-77
	tyrB	z5652	Aromatic-amino-acid aminotransferase			1,48	6,58E-16
	ushA	z0599	Protein UshA			3,10	1,67E-127
	ybeL	z0790	Uncharacterized protein YbeL			1,45	0,00E+00
	yccJ	z1422	Uncharacterized protein YccJ			3,97	7,04E-96
	zwf	z2904	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase			1,94	1,60E-15

8.2.3.1 ¿Los efectores predichos podrían considerarse factores de virulencia?

Dada la participación mayoritaria de las proteínas predichas como efectores del SST6-2 en complejas vías metabólicas, surgió la pregunta sobre su rol en la virulencia y su relación con la respuesta al macrófago y al estrés. Para abordar este aspecto se analizaron los 38 potenciales efectores obtenidos por predicciones bioinformáticas y por datos experimentales que mostraron sobreexpresión en EHEC fagocitada y expuesta a estrés en la base de datos VirulentPred 2.0, la cual ofrece información curada sobre factores de virulencia de diversos patógenos, incluyendo su capacidad de supervivencia frente a distintos tipos de estrés, adhesión, invasión celular, colonización, efectores, inmunomodulación, entre otros.

Como resultado de este análisis se determinaron 5 candidatos a efectores, provenientes de EHEC O157:H7 expuesta a estrés, como posibles factores de virulencia: FumB (Z5724), YbeL (Z0790), PurB (Z1860), SucD (Z0883), YceJ (Z1422) (Tabla 8). Aún más interesante, es que YbeL (Z0790) e YccJ (Z1422) son proteínas hipotéticas en las que no se registran dominios asociados que puedan inferir una potencial función. Además, todas ellas fueron predichas como citoplasmáticas y no presentan péptido señal, por lo que esto incrementaría aún más su probabilidad de ser translocadas por el SST6-2 de EHEC O157:H7.

- FumB (z5724) capaz de catalizar la hidratación de fumarato a (S)-malato, la cual es requerida para el crecimiento en condiciones anaeróbicas (174).
- YbeL (Z0790) no se encuentra caracterizada.
- PurB (Z1860) es una proteína con actividad adenilosuccinato liasa, la cual cataliza dos reacciones en la biosíntesis de novo de nucleótidos de purina.

Adenilosuccinato liasa; proteína involucrada en el proceso biosintético de nucleótidos de purina; pertenece a la familia de liasas 1, subfamilia de adenilosuccinato liasas (175).

- SucD (Z0883) succinil-CoA sintetasa funciona en el ciclo del ácido cítrico (TCA), acoplando la hidrólisis de la succinil-CoA a la síntesis de ATP o GTP y, por lo tanto, representa el único paso de la fosforilación a nivel de sustrato en el TCA. La subunidad alfa de la enzima se une a los sustratos coenzima A y fosfato, mientras que la subunidad beta proporciona la unión al succinato y la especificidad de nucleótidos. Puede utilizar ATP o GTP, pero prefiere ATP. También puede funcionar en la otra dirección con fines anabólicos, y esto puede ser particularmente importante para proporcionar succinil-CoA durante el crecimiento anaeróbico cuando la ruta oxidativa del 2-oxoglutarato está severamente reprimida (176).
- YccJ (Z1422) es una proteína no caracterizada, hipotética.

La obtención de un sistema eficiente de expresión de proteínas impidió el estudio de estos potenciales efectores para confirmar su translocación por medio del SST6-2 y consecuentemente el estudio de su accionar (ver material suplementario del capítulo 2)

Los resultados obtenidos en este capítulo revelaron que hubo una parcial activación de algunos de los genes del SST6-2 bajo las condiciones evaluadas (EHEC fagocitada y expuesta a estrés). No obstante, se vieron sobreexpresados un gran número de potenciales efectores. En base a su sobreexpresión y localización subcelular, predicha en el capítulo 1 ([tabla suplementaria 3 del capítulo 1](#)), se seleccionaron 43 potenciales efectores. El análisis posterior permitió predecir 5 de ellos como posibles factores de virulencia.

A continuación, se discutirán algunos de los puntos más controversiales e importantes relacionados con la hipótesis planteada, lo que nos lleva a formular nuevas preguntas que seguramente guiarán futuras investigaciones.

8.2.4 Discusión

Para profundizar en el conocimiento sobre el SST6-2 de EHEC O157:H7 y su relación con la supervivencia en macrófagos, se llevó a cabo un estudio del perfil transcripcional de la bacteria fagocitada. Por otro lado, se decidió evaluar al SST6-2 bajo condiciones de estrés parecidas a lo que la bibliografía reporta para fagosomas tardíos (estrés ácido, limitación de nutrientes, captura de cationes divalentes y estrés oxidativo) (43). Este enfoque permitió analizar la expresión diferencial de cientos de genes, incluidos los genes estructurales del SST6-2 y los potenciales efectores.

Se observó una activación parcial de algunos de los genes estructurales del SST6-2 en la bacteria fagocitada y expuesta a estrés. Los genes *tssB* y *tssC* se vieron sobreexpresados en EHEC O157:H7 fagocitada. Por otro lado, bajo condiciones de estrés se observó sobreexpresión de *tssC* y *tssK*. Diversos trabajos han reportado que los SST6 en diversos patógenos son regulados por factores abióticos como la temperatura, osmolaridad, pH, oxígeno y concentración de iones metálicos (177). Aunque no reportado para EHEC O157:H7, se documentó en *V. cholerae* que el SST6-2 es sobreexpresado en ambientes con pH ácido (178). La concentración de oxígeno y las especies reactivas de oxígeno (ROS) son señales ambientales importantes en el control de los SST6 (177). OxyR (sensor de peróxido de hidrógeno y activador de la transcripción) es un regulador de respuesta que, en presencia de H₂O₂, se oxida y se une a regiones promotoras para inducir la

activación de la expresión génica y se demostró que regula positivamente el SST6 de *Burkholderia. thailandensis* (179).

Dado que los genes del SST6-2 se organizan en operones, se habría esperado que los genes dentro del mismo presentaran un patrón de expresión similar. Sin embargo, recientemente se descubrió que los genes del SST6-2 tienen una expresión segmentada, lo que sugiere la presencia de múltiples promotores internos dentro del *cluster* del SST6-2 lo que podría explicar el heterogéneo perfil transcripcional de los genes del SST6-2 (180). No obstante, ante la ausencia de expresión diferencial en la mayoría de los genes del *cluster* del SST6-2 se planteó la posibilidad de que el medio de cultivo celular utilizado, DMEM, pudiera estar influyendo su expresión, dado que se ha reportado en otros sistemas, como el SST6-3 de EAEC, que es activado en medios sintéticos de cultivo de macrófagos (170). Para descartar esta posibilidad, se realizaron controles de EHEC crecida en DMEM y M9 y posteriormente un análisis de expresión diferencial entre ambas condiciones. Los resultados revelaron que el medio DMEM no produjo cambios significativos en la expresión de los genes del SST6-2.

Por otro lado, se analizó la expresión del gen *hns* el cual ha sido reportado como un regulador transcripcional negativo del SST6 en *V. cholerae*, *Edwardsiella tarda* y *S. Typhimurium* *E. coli* (171–173). Aunque esta regulación negativa de H-NS sobre el SST6-2 podría explicar la ausencia de actividad transcripcional, se observó que el gen *hns* estaba subexpresado. Sin embargo, esto no significa que el regulador H-NS no esté unido a la región promotora ejerciendo su control negativo en la transcripción de los genes estructurales del SST6-2 (180). Por este motivo, se ha intentado obtener una cepa EHEC O157:H7 EDL933 Δhns a través de la metodología de edición génica CRISPR/Cas9, pero no se ha podido mutar el gen, en principio porque no crecían colonias. Esto puede deberse

a que H-NS está implicado como un regulador transcripcional de múltiples genes, particularmente aquellos involucrados en la adaptación ambiental o la virulencia (181). No obstante, se ha reportado la mutación en el gen *hns* que ha permitido estudiar la expresión del SST6-2, lo cual también es cuestionable porque no refleja el fenotipo salvaje de la virulencia del patógeno.

Es importante señalar que solo se analizó el perfil transcripcional del SST6-2 después de 2 horas de incubación con los macrófagos, por lo que podrían ser necesarios tiempos más prolongados para evaluar completamente su expresión.

Los efectores que fueron identificados en el capítulo 1 fueron contrastados con los datos del RNA seq de EHEC fagocitada y expuesta a estrés. Se observó que de los efectores identificados a partir de datos bioinformáticos solo YbjW se vio sobreexpresado en ambas condiciones experimentales (macrófagos y estrés *in vitro*). El resto de los efectores identificados por bioinformática no fueron estadísticamente significativos para ser considerados diferencialmente expresados.

Este resultado es interesante porque YbjW es una hidroxilamina reductasa asociada a la detoxificación de productos metabólicos del nitrógeno (143). La sobreexpresión del potencial efector YbjW (Z1107) del SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada indicaría que la bacteria se encontraría expuesta a estrés nitrosativo inducido por el macrófago. Este indicio se ve respaldado al analizar la expresión diferencial de genes asociados al estrés nitrosativo, donde se observó una sobreexpresión significativa de genes como *norV* (log2FC 3,81; p-value: 3,36E-10), que codifica una flavorubredoxina asociada a la detoxificación de óxido nítrico (163). Además, se registró una sobreexpresión del gen *norR* (log2FC 1,69; p-value: 1,52E-05), un regulador transcripcional activador de *norVW*, el cual es requerido para la expresión de reductasas anaeróbicas de óxido nítrico

(163). Esto se debe a que los macrófagos tienen capacidades antibacterianas ampliamente fortalecidas, incluida la generación de intermediarios reactivos del nitrógeno como el óxido nítrico a través de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS2) (169). Usando arginina y oxígeno, el homodímero NOS2 genera NO el cual puede difundir a través de la membrana del fagosoma ya que NOS2 se encuentra localizada en su membrana (170). La resistencia al estrés nitrosativo generado por NO involucra la expresión de YbjW (143). Por lo tanto, el candidato YbjW despierta interés como potencial efector del SST6-2 de EHEC O157:H7.

En la cepa EHEC O157:H7 sometida a una situación controlada de estrés *in vitro*, se evidenció una sobreexpresión del gen *ybjW*, incluso en ausencia de la adición deliberada de una fuente de estrés nitrosativo a esa condición. Este hallazgo sugiere la posible intervención de diversas vías en la activación de dicho gen como respuesta al estrés.

Además, se realizó la búsqueda de nuevos efectores a partir de datos experimentales publicados por Wan y colaboradores dando un total de 72 candidatos. Aunque las condiciones experimentales que utilizaron para obtener los sobrenadantes e identificar las proteínas candidatas a efectores del SST6 no coinciden con las condiciones de este trabajo de tesis doctoral, seleccionamos estos candidatos debido a nuestro interés en identificar proteínas translocadas exclusivamente por este sistema de secreción.

Al contrastar estos candidatos a efectores con nuestros datos de RNA-seq, se observó que 52 de 72 candidatos estaban diferencialmente expresados en la bacteria fagocitada y expuesta a estrés. En este sentido nos enfocamos en aquellos que se vieron sobreexpresados en ambas condiciones experimentales (EHEC fagocitada y expuesta a estrés) porque indicaría que su expresión podría estar asociada con una potencial secreción y su accionar permitiría un proceso adaptativo de la bacteria frente a esas condiciones. En base

a su sobreexpresión y localización subcelular citoplasmática, ya que al no estar ancladas a estructuras subcelulares favorecería su translocación a través del SST6-2, fueron seleccionados 38 candidatos a efectores. Se observó que la mayoría de estos candidatos experimentales sobreexpresados participaban en procesos metabólicos. Por lo tanto, la caracterización como participantes en la virulencia de la bacteria deja un interrogante sobre su funcionalidad en la patogénesis (171).

Dado que muchos de los potenciales efectores tenían funciones asociadas al metabolismo se realizó un análisis bioinformático para predecir factores la virulencia en la base de datos Virulent 2.0. Este análisis redujo el número de potenciales efectores a un total de 5 proteínas con potencial actividad virulenta: FumB (Fumarato hidratasa clase I, anaeróbica), YbeL (proteína no caracterizada YbeL), PurB (Adenilosuccinato liasa), SucD (Succinato-CoA ligasa [formadora de ADP] subunidad alfa) e YccJ (Proteína no caracterizada YccJ). Los genes que las codifican fueron sobreexpresados en EHEC O157:H7 bajo condiciones de estrés que replica un fagosoma tardío. No obstante, no se vieron sobreexpresadas en la bacteria fagocitada. Probablemente, al tiempo que analizamos el transcriptoma de la bacteria fagocitada, no fue el suficiente para la maduración del fagosoma y probablemente no se hayan alcanzado las condiciones de estrés extremas.

La identificación de potenciales efectores con funciones metabólicas y posibles roles en la virulencia es un hecho que genera controversia y discusión. No obstante, es muy interesante este punto porque en los últimos años empezó a cobrar interés el concepto de proteínas “moonlight” las cuales son proteínas que han sido detectadas en diferentes especies bacterianas y que pueden tener funciones diferentes de acuerdo con el contexto en el que se encuentran (167). Se está descubriendo que un número creciente de especies bacterianas tienen proteínas “moonlight” y las actividades de dichas proteínas pueden

contribuir al comportamiento de la virulencia bacteriana. Las enzimas glicolíticas, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD) y enolasa, y las proteínas del estrés celular: chaperonina 60, Hsp70 y peptidil prolil isomerasa, se encuentran entre las proteínas bacterianas “moonlight” más comunes que desempeñan un papel en la virulencia bacteriana (168). Las actividades de estas proteínas “moonlight” incluyen la adhesión y la modulación de los procesos de señalización celular. Por este motivo, la identificación de efectores asociados al SST6-2 es un hecho que podría contribuir de manera significativa a comprender aún más la patogénesis de la bacteria.

La hipótesis de este trabajo de investigación sostiene que la sobrevivencia de EHEC O157:H7 EDL933 en el macrófago depende de la activación del SST6-2 y de los efectores asociados. Al demostrar que el SST6-2 juega un papel en la supervivencia bacteriana frente a los macrófagos, y al observar una sobreexpresión parcial de sus genes estructurales bajo condiciones de fagocitosis y estrés *in vitro*, además de identificar efectores sobreexpresados que podrían contribuir a la virulencia bacteriana, reforzando la hipótesis propuesta surge la posibilidad de proponer un mecanismo de acción hipotético para este SST6-2. Estos hallazgos sugieren que el SST6-2 podría estar parcialmente preensamblado en la bacteria, listo para translocar los efectores cuya sobreexpresión ocurre en situaciones hostiles. Esto podría deberse a la necesidad de una adaptación rápida, considerando el alto costo asociado con la síntesis de una maquinaria de secreción tan compleja en un entorno de recursos limitados

Siguiendo este razonamiento, podríamos hipotetizar que ciertos efectores se expresan tempranamente durante la fagocitosis cuando las condiciones no alcanzan a ser extremas ya que no se observó activación de genes asociados a la respuesta frente al estrés ácido y oxidativo. Sin embargo, al analizar a EHEC expuesta a condiciones de estrés *in*

vitro, más relacionadas con lo descrito en la literatura para fagosomas tardíos (43), muchos genes de respuesta al estrés ácido, oxidativo y a la respuesta SOS mostraron sobreexpresión.

En este escenario, podríamos plantear dos situaciones hipotéticas en las que los efectores podrían activarse: por un lado, en la situación de EHEC O157:H7 fagocitada en la cual no se observó una respuesta de genes asociados con estrés ácido y oxidativo, pero sí asociados al estrés nitrosativo y ahí se involucra al potencial efector YbjW por su actividad hidroxilamina reductasa asociada con la detoxificación de especies reactivas de nitrógeno (Figura 39). Por otro lado, bajo condiciones de estrés *in vitro*, que podría mimetizar las condiciones de un fagosoma tardío, y en donde sí se vió un aumento de expresión de genes asociados con el estrés oxidativo y ácido. En esa situación un grupo de efectores como FumB, PurB, SucD, YbeL e YccJ podrían activarse y eventualmente translocarse (Figura 39).

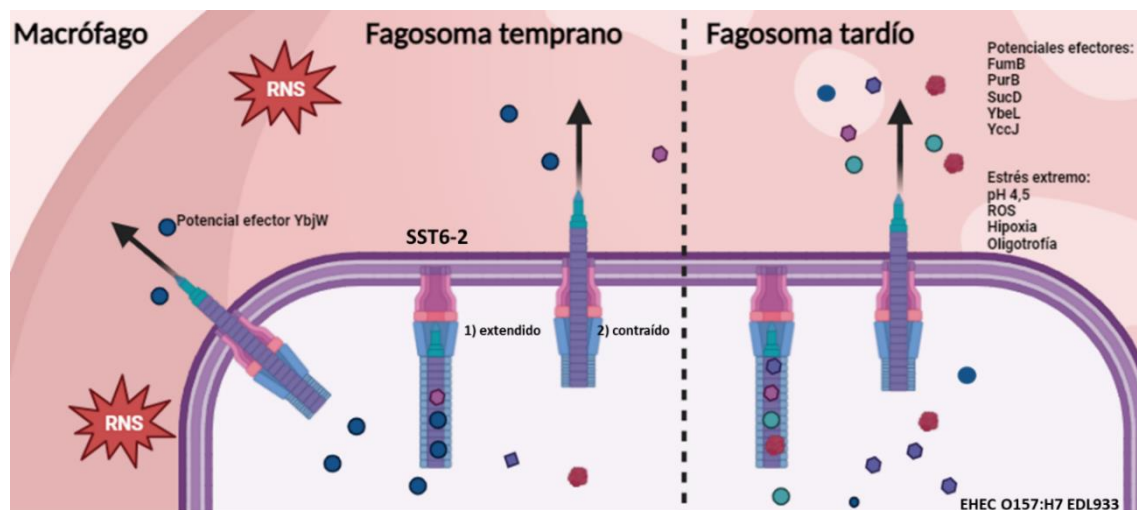


Figura 39. Esquema que representa una hipótesis sobre el accionar del SST6-2 en EHEC O157:H7 fagocitada en diferentes estadios. A la izquierda, EHEC O157:H7 en un fagosoma temprano expuesta a estrés nitrosativo dada por la presencia de especies reactivas de nitrógeno (RNS). En este contexto se observó la sobreexpresión del gen *ybjW*, el

cual fue predicho como potencial efector del SST6-2 que codifica una hidroxilamina reductasa que podría tener relevancia en la detoxificación de especies reactivas de nitrógeno. A la derecha EHEC O157:H7 expuesta a diferentes agentes estresantes *in vitro* que simulan un fagosoma tadio (pH 4,5, estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno (ROS), baja tensión de oxígeno y ausencia de nutrientes). En este contexto se observó un gran número de efectores sobreexpresados, entre ellos Fum, PurB, SucD, YbeL e YccJ. En ambas situaciones, el análisis de expresión diferencial reveló que la mayoría de los genes estructurales del SST6-2 no estaban transcripcionalmente activos. No obstante, se demostró que el SST6-2 está implicado en la sobrevivencia de la bacteria frente al macrófago. Ante esta situación se hipotetiza que el SST6 se encontraría ensamblado (extendido en el citoplasma) y que, en respuesta a una señal específica, los efectores se expresan, se unen a proteínas estructurales y se secretan (contracción del SST6) ejerciendo su acción.

Estos datos obtenidos abren nuevas puertas en el estudio de este sistema de secreción tan complejo y aporta conocimientos valiosos sobre la identificación de nuevos efectores. Se requerirán futuros experimentos para confirmar estos hallazgos.

8.2.5 Conclusión

En función de los resultados obtenidos, se puede concluir que la metodología de RNA-seq permitió estudiar el perfil transcripcional de la bacteria fagocitada y expuesta a estrés *in vitro* con foco en el SST6-2 y los efectores asociados previamente identificados. Pudo verse que se activan parcialmente genes estructurales del SST6-2 bajo condiciones adversas. Respecto a los efectores, considerando su sobreexpresión, su localización subcelular y su función se han seleccionado 43 potenciales efectores. Entre ellos se encuentra YbjW, una hidroxilamina reductasa que se encuentra asociada con la detoxificación de especies reactivas del nitrógeno, cuya función podría otorgarle ventajas adaptativas a la bacteria frente al macrófago. No obstante, la gran mayoría de los efectores tienen funciones metabólicas, por eso nos preguntamos si alguno podría tener un rol como factor de

virulencia. La predicción de la virulencia redujo el número a 5 candidatos. Algunos de estos efectores, como FumB, PurB y SucD tienen funciones metabólicas específicas, mientras que otros, como YbeL e YccJ, tienen funciones hipotéticas aún no caracterizadas. Todos ellos se vieron sobreexpresados en la bacteria expuesta a condiciones de estrés extrema. El potencial rol de estos candidatos a efectores en la virulencia representa un área de investigación interesante y quedará abierta para futuras investigaciones.

9 **Capítulo 3: Identificación y caracterización bioinformática de un SST6-1 antibacteriano y potenciales efectores asociados en STEC O22:H8 cepa 154**

9.1 Introducción

Los SST6 en *E. coli* se clasifican en tres grupos filogenéticos: SST6-1, SST6-2 y SST6-3 (70). La mayoría de las cepas pueden contener una o varias copias del SST6, esta multiplicidad podría corresponder con el estilo de vida y el nicho que ocupa, lo que podría reflejar la funcionalidad del cluster SST6 (71). En función de la información disponible respecto a los SST6 en *E. coli*, los SST6-1 y SST6-3 están relacionados con actividad antibacteriana y el SST6-2 con la patogénesis (67).

La actividad antibacteriana del SST6 involucra un mecanismo de ataque y defensa cuando dos especies bacterianas con SST6 entran en conflicto. Estas interacciones llamadas “duelos SST6”, ocurren en un contexto de competencia, donde una inyecta sus toxinas en la otra. Si las bacterias son de la misma especie, la presencia de proteínas de inmunidad impide efectos antibacterianos, pero si son de especies diferentes y no presentan estas proteínas, la bacteria receptora puede ser eliminada. Esto se debe a que las proteínas con actividad tóxica suelen estar asociadas con proteínas de inmunidad que neutralizan su actividad, protegiendo así a la bacteria. Además, estas proteínas (efector-inmunidad) suelen estar codificadas en tándem en unidades bicistrónicas (119).

Se ha reportado que bovinos naturalmente colonizados con STEC O22:H8 cepa 154, evitan la colonización por parte de EHEC O157:H7 (11). Este fenómeno sugiere una competencia entre O22:H8 y EHEC O157:H7 por el mismo nicho. Esta observación nos impulsa a plantear la hipótesis de que el serotipo O22:H8 podría estar equipado con un SST6-1 y con potenciales efectores con dominios catalíticos, que podrían otorgarle actividad antibacteriana. Estas características le conferirían la capacidad de competir eficazmente con otras bacterias, entre ellas con EHEC O157:H7. A continuación, se estudiarán

las bases moleculares de la competencia bacteriana reportada por parte de STEC O22:H8 frente a O157:H7.

9.2 Resultados

9.2.1 Identificación de un SST6-1 en STEC O22:H8 cepa 154

El análisis del genoma de STEC O22:H8 por medio de la base de datos secret6 reveló la presencia dos SST6 completos, un SST6-1 y un SST6-2. El análisis individual de cada uno de ellos confirmó que STEC O22:H8 contiene un SST6-1 (Figura 40), el cual contiene las proteínas estructurales básicas para completar un SST6 funcional (Tabla 11).

Una característica importante, que confirma que STEC O22:H8 contiene un SST6-1 es que las cepas de *E. coli* que contienen este tipo de sistemas de secreción codifican fosfolipasas (Tle1) río abajo de VgrG (Figura 40) (68). En este sentido se ha reportado que los SST6-1 de AIEC LF82 o UPEC CFT073 portan fosfolipasas de la familia Tle3, mientras que los presentes en los genomas de EAEC 042 y APEC TW-XM están estrechamente relacionados con fosfolipasas de las familias Tle1 y Tle4, respectivamente (68).



Figura 40. Esquema que representa las secuencias del SST6-1 y SST6-2 en la cepa STEC O22:H8 cepa 154. Se visualiza la anotación de los genes y sintenia en los grupos SST6-1 y SST6-2 de la cepa STEC O22:H8 cepa 154. Ambos SST6 presentan todos los componentes esenciales (proteínas estructurales) necesarios para desarrollar su actividad.

Tabla 11. Componentes estructurales del SST6-1 de STEC O22:H8 cepa 154

Proteína	Locus tag	Localización	Función
TssJ	Ec154_00129	ME	Complejo de membrana
TssL	Ec154_00114	MI	Complejo de membrana
TssM	Ec154_00125	MI	Complejo de membrana
TssK	Ec154_00113	MI	Complejo de membrana
TssF	Ec154_00127	MI	Complejo de base
TssG	Ec154_00128	MI	Complejo de base
TssE	Ec154_00130	CP	Complejo de base
TssA	Ec154_00126	CP	Complejo de cola
TssB	Ec154_00111	CP	Complejo de cola (vainas)
TssC	Ec154_00112	CP	Complejo de cola (vainas)
ClpV	Ec154_00117	CP	ATPase
Hcp-1	Ec15400116	CP/MI	Complejo de cola (Tubo Hcp)
VgrG	Ec134_00120	MI	Espiga

ME (Membrana externa); MI (Membrana interna); CP (Citoplasma)

Además, mediante análisis bioinformático a través de la base de datos secret6, se observó que el SST6-1 de STEC O22:H8 se encuentra filogenéticamente relacionado con el SST6-1 de EAEC 042 (Figura 41).

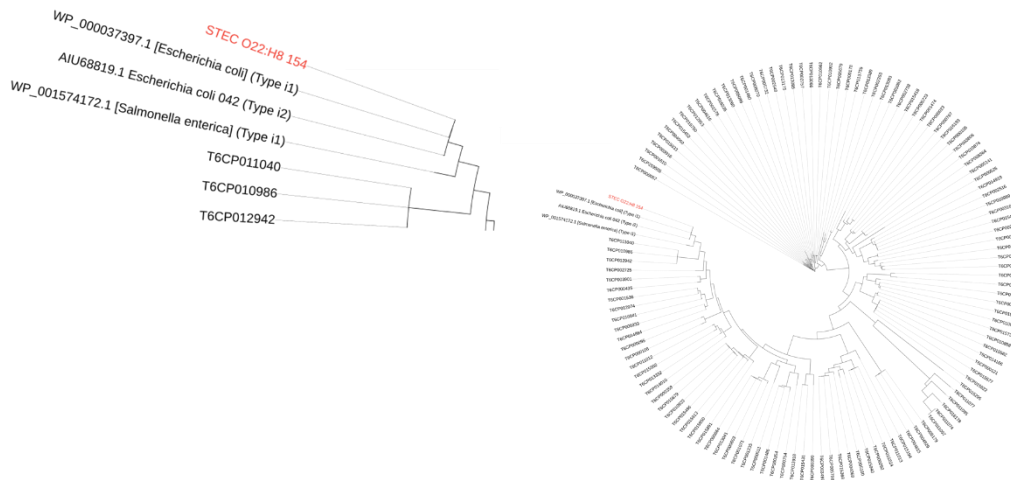


Figura 41. Análisis filogenético generado por la base de datos Secret6 utilizando como secuencia consulta a TssB de STEC O22:H8. Este algoritmo realiza predicciones basadas en la homología de secuencias y posteriormente genera un árbol filogenético utilizando MAFFT v7.475 y FastTree v2.1.11. La visualización del árbol se lleva a cabo utilizando ggtree.

Por otro lado, el alineamiento entre el SST6-1 de O22:H8 y EAEC 042 reveló la homología de secuencia y la sintenia que estos comparten (Figura 42). En la Figura puede verse que ambas secuencias codificantes del SST6-1 en STEC O22:H8 cepa 154 y EAEC 042 están conservadas ya que se observan bloques de coloración (rojo) en común. Se observan regiones blancas compartidas y otras que no se alinean, esto puede representar deleciones o inserciones (Figura 42).

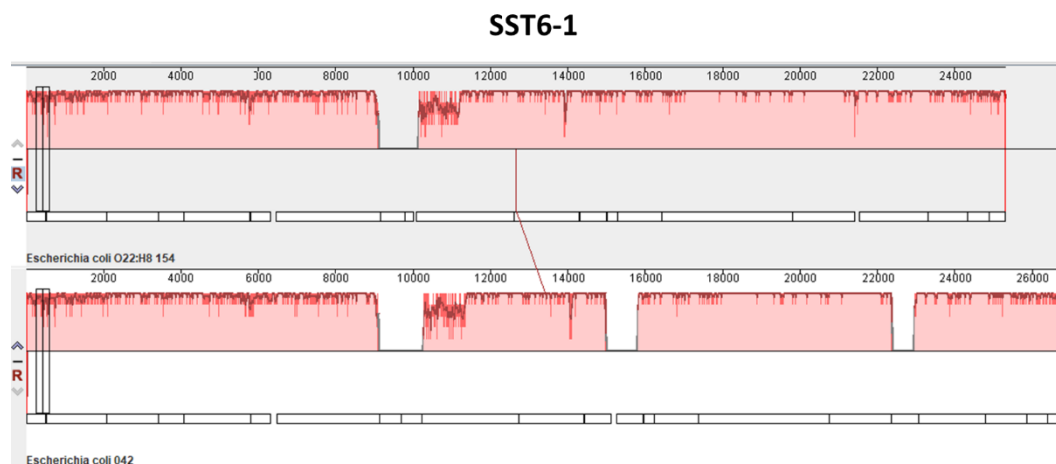


Figura 42. Alineamiento múltiple de secuencias correspondientes al SST6-1 de STEC O22:H8 y EAEC 042. Las regiones con similitud que están coloreadas con rojo se conservan entre los cuatro genomas. Las secuencias fueron alineadas usando la opción progressive Mauve de la versión Mauve 20150226.

Flaugnatti y colaboradores reportaron que el SST6-1 es necesario para la actividad antibacteriana en EAEC y que Tle1 posee actividades de fosfolipasa, responsable de la actividad antibacteriana de este SST6 (74). Esto sugiere que la presencia de un SST6-1 en STEC O22:H8 le conferiría una potencial actividad antibacteriana.

9.2.2 Caracterización de efectores adentro del SST6-1 de STEC O22:H8 154

El análisis *in silico* del SST6-1 de STEC O22:H8 154 reveló la presencia de tres genes asociados con la translocación de efectores. Los genes están codificados en tándem desde Ec154_00120 a 22 como se muestra en la Figura 43. Su caracterización se llevó a cabo utilizando bases de datos para la predicción de efectores, identificación de dominios y modelado molecular tridimensional (Tabla suplementaria [1](#) y [2](#), Capítulo 3).

El gen Ec154_00120 codifica a la proteína estructural del SST6-1 que conforma la espiga VgrG1. El análisis en la base de datos Pfam, reveló que VgrG1 presenta un dominio Phage_domain (evalue 5.1e-60), con homología a las proteínas gp27-gp5, proteínas de punción del fago T4 (85). El análisis también reveló la presencia de dominios

T6S_Vgr (evalue $1.9\text{e-}34$), DUF2345 (evalue $4.5\text{e-}48$) y TTR (transthyretin-like domain) en la región C-terminal (confidence: 69,9%; i.d: 98%). Además, un dominio efector Tle1 presente en la región C-terminal de VgrG1 (confidence: 100%; i.d: 98%) (Figura 44).

Río abajo de VgrG1, está codificado Ec154_00121 (Figura 43), el cual presenta un dominio DUF2235 (evalue $1.5\text{e-}15$) asociado con dominios hidroalazas α/β . Por otro lado, el análisis en la base de datos HHPred predice que Ec154_00121 corresponde a posible efector del SST6 con potencial actividad lipasa (evalue $4\text{e-}101$). Acorde al análisis de comparación de secuencias, Ec154_00121 muestra un 95,9% de identidad con un efector del SST6 con actividad fosfolipasa Tle1 de EAEC 042. Se ha reportado que Tle1 (Ec154_00121) también presenta el motivo GxSxG, el cual es encontrado en fosfolipasas de la familia Tle1-4 en la posición 195-199 (182). Además, Tle1 de STEC O22:H8 preserva la triada catalítica compuesta de los aminoácidos Ser-197, Asp-245 y His-310, característicos de Tle1 (74). Tle1 representa un efector con translocación tipo cargo, ya que interactúa con VgrG1 para su translocación. La interacción ocurre a través del dominio TTR de VgrG1 con la región N-terminal de Tle1 a una relación 3:1 (Tle1:VgrG1) (74). De esta manera en un evento de translocación, se secretan 3 Tle1 al periplasma de la célula blanco, donde esta proteína ejerce su actividad fosfolipasa y degrada la membrana celular.

Usualmente, los complejos efector-inmunidad se encuentran codificados en tandem. La auto protección de Tle1 es una lipoproteína de membrana Tli1 que inhibe la actividad fosfolipasa de Tle1 (183). Ec154_00122 codificado río debajo de Tle1 (Ec154_00121) posee en la región N-terminal dos dominios característicos de la proteína de inmunidad Tli1: DUF2931 (evalue $2.1\text{e-}42$) y un dominio de unión a lipoproteínas LPAM_1 (evalue $4.1\text{e-}2$). Flaugnatti y colaboradores demostraron que la actividad Tle1

fue completamente anulada en presencia de Tli1 y que ambas proteínas interactúan de forma estable en relación 1:1 (toxina:inmunidad) (184).

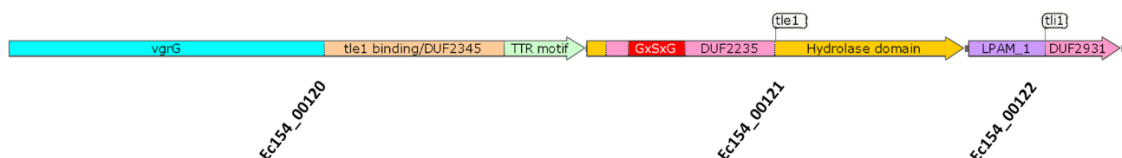


Figura 43. Efectores adentro del SST6-1. El SST6-1 alberga a VgrG1 (Ec154_00120) con un dominio Tle1/DUF2345 y TTR en la región C-terminal.

El SST6-1 ocupa la región central de la isla genética en la que se encuentra (Figura 44). Río arriba (lado izquierdo) del SST6-1 se encontraron proteínas de unión vinculadas a ARN y ADN, incluyendo reguladores transcripcionales, inhibidores de mRNA y proteínas cisteína deaminasas. Además, se identificaron tres posibles proteínas de inmunidad del SST6, pero no los efectores de tipo toxina: *imm5* (EC154_00090), *tsi1* (EC154_00097) y *tsi3* (EC154_00103). Respecto a la ausencia de toxinas, la proteína de inmunidad podría antagonizar la actividad catalítica de toxinas como Tox-CdiAC (RNA toxin) o Tox-Deaminasa (DNA toxin), mientras que *tsi1* y *tsi3* podría evitar la degradación de péptidoglicanos vía actividad amidasa y muramidasa de las toxinas Tsi1- Tsi3 durante un eventual ataque por otra bacteria SST6⁺ (185).

Río abajo (lado derecho) del SST6-1 (Figura 44), se encontraron 8 transposasas de las familias IS3, IS66, IS600 e IS110. Otra proteína detectada fue una recombinasa/integrasa de tipo tirosina (EC154_00146) con alta homología a integrasas de fagos.

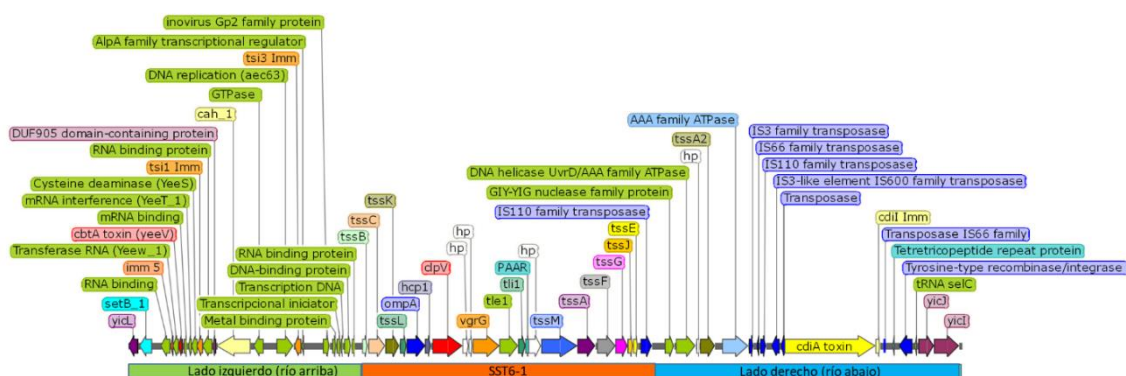


Figura 44. Isla de patogenicidad del SST6-1. La región central de la isla se encuentra ocupada por el SST6-1 con los componentes estructurales completos (naranja). Río arriba del SST6-1 se encuentran proteínas de unión a ARN y ADN (verde). Estas proteínas se encuentran vinculadas a reguladores transcripcionales, inhibidores de ARN y proteínas cisteína deaminasas. Secuencias codificantes para potenciales proteínas de inmunidad también fueron encontradas: *imm5*, *tsi1* y *tsi3* (marcadas con etiquetas naranjas). Río abajo del SST6-1 (azul) se encuentran codificadas 8 transposasas de las familias: IS3, IS66, IS600, IS110 e integrasa/recombinasa de tipo tirosina.

9.3 Identificación de un SST6-2 en STEC O22:H8

En función del análisis bioinformático, STEC O22:H8 cepa 154 también contiene una región codificante del SST6-2, dividida en dos operones (Figura 45). El operón estructural y genes adaptadores o accesorios. Por otro lado, el operón VgrG que alberga los componentes de la espiga del SST6-2 y proteínas Rhs con proteínas de inmunidad.

9.3.1 Operón estructural del SST6-2 de STEC O22:H8

Los componentes estructurales del SST6-2 de STEC O22:H8 154 y EHEC O157:H7 EDL933 mostraron alta identidad. En particular, el gen *tssA* se encuentra duplicado (Ec154_04267 y Ec154_04269) flanqueando al gen *tssM* (Figura 45). Aunque esta duplicación ocurre en la mayoría de EHEC O157:H7, como en la cepa EDL933, uno de estos genes duplicados se encuentra interrumpido por una mutación que incorpora un codón stop, produciendo una proteína TssA trunca. TssA juega un rol durante la biogénesis del complejo de membrana del SST6, reclutando proteínas del complejo de base y del complejo de cola (83).

9.3.2 Operón VgrG y efectores dentro del SST6-2

Dentro del operón VgrG, *hcp* (Ec154_04254) y *vgrG* (Ec154_04253) presenta 100 % y 98,9 % de identidad con *hcp* (z0266) y *vgrG* (z0267) de EHEC O157:H7 EDL933, respectivamente. Río abajo de *vgrG* (Ec154_04253), dos familias de proteínas Rhs (Ec154_04252 y Ec154_04245) están codificadas con sus respectivas proteínas de inmunidad (Ec154_04251 y Ec154_04244) (Figura 47 A). Además, se observa que Ec154_04252 y Ec154_04245 son una familia de proteínas Rhs (Figura 47 B y C) (Tabla suplementaria 1, capítulo 3).

El análisis de la estructura tridimensional de Rhs (Ec154_04252) reveló la presencia de del núcleo estructural característico del complejo toxina ABC formado por TcdA/TcdB/TccC3 (confidence: 100%; i.d.: 17%) y un dominio C-terminal de tipo toxina TcdA (confidence: 100%; evalue: 2.1e-47) de *Photorhabdus luminescens*. Los dominios TcdA1/TcdA2 están asociados con actividad formadora de poros de membrana vinculada

a actividad antibacterial de ciertas Rhs tal como VPR01S_08_01700 de *Vibrio proteolyticus* NBRC 13287 e YPK_0403 de *Yersinia pseudotuberculosis*; interesantemente VPR01S_08_01700 de *V. proteolyticus* NBRC 13287 es también codificado cercano al operón del SST6-2 (186). Hasta el momento, no hay reportes de este tipo de actividad catalítica en proteínas efectores Rhs de *E. coli* patogénica. Sin embargo, el complejo formado por toxinas ABC tienen actividad insecticida en *Photorhabdus luminescens*, reflejando su actividad antieucariota (187).

De manera similar a RhsT de *Pseudomonas aeruginosa*, Rhs (Ec154_04252), también muestra homología con el complejo de toxinas ABC. Kung y colaboradores han demostrado que RhsT es translocado a células fagocíticas, donde induce la muerte celular mediada por inflammasoma (188).

Río debajo de Rhs (Ec154_04252), se encuentra otra Rhs (Ec154_04245) que también presenta homología con la toxina TcdB2/TccC3 de *Photorhabdus luminescens* (Confidence: 100%; evalue: 7.7e-50) por el software Phyre2 y HHpred. Además, Rhs (Ec154_04245) presenta un dominio en la región C-terminal homóloga con la toxina b de *Clostridium difficile* (Confidence: 78.8%; i.d.: 14%). Tanto Rhs Ec154_04251 y Ec154_04244 presentan río abajo sus respectivas proteínas de inmunidad, las cuales presentan el motivo Sell repeat protein (SRP) (Confidence: 16.7%; i.d.: 32%) y tetratricopeptide repeat (TPR), respectivamente, los cuales están vinculados a la actividad de ciertas proteínas de inmunidad (189).

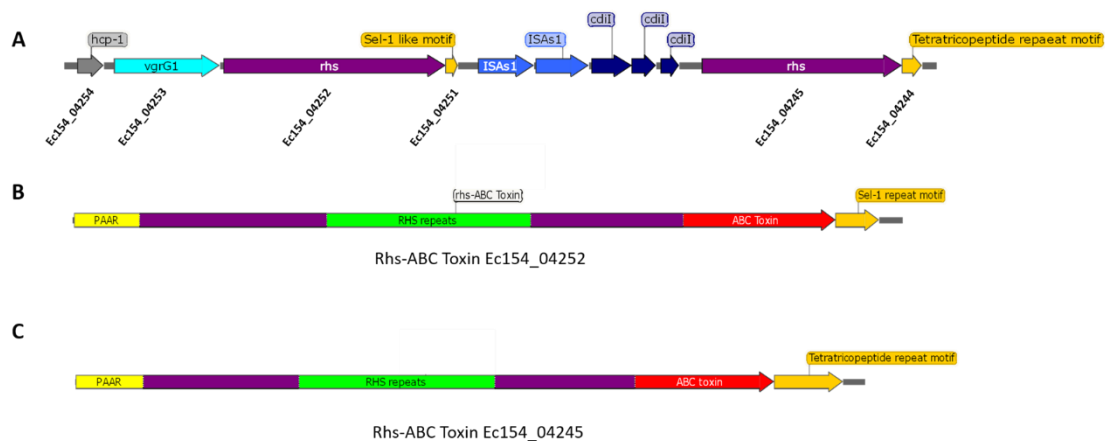


Figura 47. Diagrama del operón VgrG y efectores asociados. A) Esta isla de patogenicidad presenta una proteína Hcp (gris), VgrG (celeste) y dos proteínas Rhs (violeta) con sus respectivas proteínas de inmunidad río abajo (naranja). B) y C) representan la caracterización de las proteínas Rhs (Ec154_04252 y Ec154_04245) con la presencia de dominios RHS (en verde), PAAR en la región N-terminal (amarillo) y el dominio catalítico ABC en el extremo C-terminal (rojo). Río debajo de cada Rhs, se encuentran codificadas sus respectivas de inmunidad con dominios (naranja) Sel-1 y tetratricopeptido.

Como se demostró en el capítulo 1 de esta tesis doctoral, el SST6-2 de EHEC O157 EDL933 proporciona una ventaja adaptativa en términos de supervivencia dentro de los macrófagos. Al observar que STEC O22 también posee un SST6-2 con una alta homología de secuencia al SST6-2 de EHEC, no se puede descartar que este también esté asociado con la supervivencia en macrófagos.

9.4 Caracterización de efectores en islas de patogenicidad en el genoma de STEC O22:H8 154

El análisis *in silico* reveló seis islas de patogenicidad con proteínas vinculadas al SST6.

9.4.1 Isla de patogenicidad 1

Esta isla de patogenicidad presenta un operón compuesto de VgrG1 (Ec154_03857), *eagR* (Ec154_03858) y tres genes *rhs* con sus respectivas proteínas de inmunidad codificadas en tándem (Ec154_03859/60, Ec154_03862/3 y Ec154_03866/7) (Figura 48 A). Todas estas proteínas fueron analizadas por modelado molecular y predicción de dominios (Tabla suplementaria [1](#) y [2](#), capítulo 3). A partir de este análisis, se observó que Ec154_03857 posee las características de VgrG1 (Confidence: 100%, Coverage: 95%) al presentar los dominios gp5 y gp27 en la región N-terminal (Confidence: 100%, Coverage: 25%), lo cual lleva a la estructura trimérica de VgrG (190).

El gen *eagR* (*effector-associated gene with Rhs*) se encuentra codificado río abajo de *vgrG*, posee un dominio DUF1795 (Confidence: 98.4%, Coverage: 18%) y DcrB (value: 5.7e-24) (Figura 48 A) que pertenecen a la familia de proteínas accesorias. EagR tiene un rol clave en la translocación de efectores Rhs con actividad tipo toxina dependiente del SST6, al actuar como una chaperona, la cual es típicamente codificada entre los genes *vgrG* y *rhs* (110). Este tipo de chaperonas se encuentran normalmente asociadas con efectores relacionados con actividad antibacteriana.

Ec154_03859 se encuentra codificado río debajo de *vgrG* y *eagR* (Figura 48 A), sugiriendo que podría ser un potencial efector del SST6-1. Ec154_03859 posee las carac-

terísticas típicas de RhsA (evalue: $1.79\text{e-}97$), como se evidencia por la presencia del motivo PAAR (evalue: $3.66\text{e-}23$) y repeticiones RHS (evalue: from $1.9\text{e-}05$ to $2.2\text{e-}07$). En la región C-terminal presenta un dominio deaminasa nucleotídico -mafB19 (evalue: $2.47\text{e-}12$) y el motivo HxT relacionado proteínas de tipo toxina involucradas en la competencia interbacteriana (Figura 48 B) (107). Este dominio posee 100% de identidad con el dominio deaminasa nucleotídico -mafB19 del efector caracterizado HMPREF9348_01319 de *E. coli* MS 145-7 y EFO59306 de *E. coli* (107). Este dominio está relacionado con edición de ácidos nucleicos, modificaciones que conllevan a mutaciones en el ADN en la célula target (107). Río abajo de Rhs-mafB19 (Ec154_03859), se encuentra una potencial proteína de inmunidad (Ec154_03860), la cual presenta 100% de identidad con HMPREF9348_01318 mafB19, otra proteína de inmunidad presente en *E. coli* MS 145-7.

Siguiendo el análisis, río abajo se encuentra RhsA (Ec154_03862) (evalue: $6.02\text{e-}82$) (Figura 48 A y C) con motivo PAAR (evalue: $8.56\text{e-}25$), repeticiones RHS (evalue from $4.4\text{e-}05$ a $4.5\text{e-}07$) y una región C-terminal conteniendo un motivo AHH (alanina-histidina-histidina) encontrado en nucleasas (evalue: $9.19\text{e-}14$). El motivo AHH muestra un 98% de identidad con el efector Rhs-AHH del SST6-1, tal como KIH17755 de *E. coli* CVM N33653PS y ECDEC10E_0684 de *E. coli* O26:H11 DEC10E. En el motivo AHH, la primera histidina forma parte del sitio catalítico como quelante de metales, mientras que la segunda histidina contribuye al sitio activo dirigiendo la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster (191). AHH deriva del dominio HNH que contiene cuatro cisteínas quelantes de Zn (191). Los residuos quelantes de metales son típicamente histidinas, aspartato y asparagina, pero la configuración de ellos puede variar entre diferentes miembros. Sin embargo, todas las toxinas presentan actividad DNasa en las células objetivo (192).

Los efectores Rhs-AHH son las nucleasas más dominantes en 66 especies bacteriana con SST6 asociado (107). Muchos otros efectores han sido predichos con actividad nucleasa Rhs-AHH como en *V. parahaemolyticus* VP1415, *Acinetobacter bayly* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. brasiliense cepa PBR 1692 (193). Además, se ha reportado que muchas Rhs-AHH se encuentran en cepas de *E. coli* con SST6-1 antibacteriano (194). Una posible proteína de inmunidad codificada por Ec154_03863 podría neutralizar la actividad de Rhs-AHH ya que posee 100% de identidad con Rhs-AHH-inmunidad EC-DEC10E_0683 de *E. coli* O26:H11 DEC10E. Río arriba a Ec154_03863, se identificó una proteína RhsA (Ec154_03866) con un dominio metalpeptidasa-4 (Tox-MPTasa 4) en la región C-terminal (Figura 48 D). Este dominio muestra 92% de identidad con el efector Rhs-MPTasa4 del SST6-1, tal como AAF13_16115 de *E. coli* O104:H4 C227-12 y AOM81335 de STEC004. El dominio MPTasa4 exhibe actividad contra la membrana celular en las células blanco (107). Sin embargo, la secuencia de *rhsA* Ec154_03866 carece de dominio PAAR en extremo N-terminal. La ausencia de PAAR evitaría su asociación con la proteína VgrG (Ec154_03867) en la espiga del SST6-1 y, consecuentemente la proteína no podría ser translocada vía cargo. Muchos otros efectores Rhs tipo toxina, no albergan un dominio PAAR en su extremo N-terminal, particularmente WP_000127240 (*E. coli*), BAG76153 (*E. coli* SE11) y NP_308630 (Sakai) que poseen alta identidad (97.1%) a Ec154_03863 Rhs- MPTase4. Así como otras proteínas Rhs, la proteína de inmunidad Tox- MPTase4-inmunidad (Ec154_03867) se encuentra codificado río abajo de (Ec154_03866).

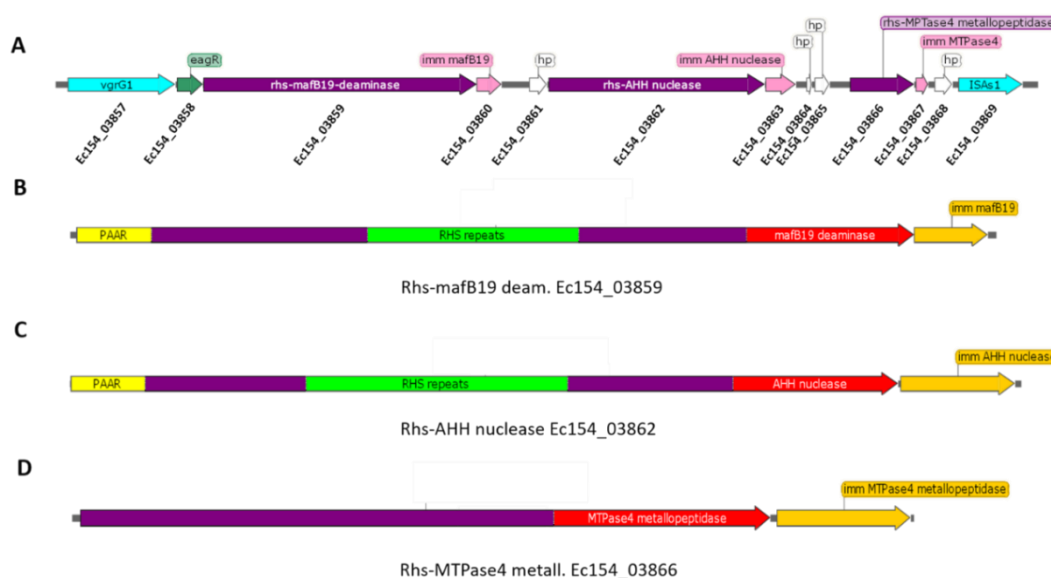


Figura 48. Diagrama de isla de patogenicidad desde los genes Ec154_03857 a 69. A) esta isla de patogenicidad presenta VgrG1 (celeste), chaperona EagR (verde) y tres proteínas Rhs (violeta) con sus respectivas proteínas de inmunidad (naranja). B, C y D) representa la caracterización de las Rhs Ec154_03859, Ec154_03862 y Ec154_03866 respectivamente, conteniendo repeticiones RHS (verde), motivo PAAR (amarillo) y dominios catalíticos en el extremo C-terminal, mafB19 deaminasa, AHH nucleasa y Rhs-MTPase4 metalopeptidasa. Río debajo de cada Rhs se encuentran sus respectivas proteínas de inmunidad (naranja).

9.4.2 Isla de patogenicidad 2

El análisis bioinformático sobre el genoma de STEC O22:H8 (154) también reveló otras islas de patogenicidad que codifican genes VgrG (Ec154_02831), dos potenciales efectores Rhs (Ec154_02830 y Ec154_02824) y sus respectivas proteínas de inmunidad (Ec154_02829 y Ec154_02823) asociadas con el SST6 (Figura 49 A) dentro del operón. Ec154_02831 fue identificado como una proteína VgrG1 con los dominios gp5 y gp27 en la región N-terminal. Ec154_02830, el cual se encuentra codificado río abajo de VgrG1, fue predicho como una proteína Rhs, con motivo PAAR en la región N-terminal y repeticiones RHS en la región central (Figura 49 B). Análisis estructural por Phyre2 de Ec154_02830 reveló que posee bajo nivel confianza con el dominio de la familia ADP-ribosiltransferasa (Tabla suplementaria [1](#) y [2](#), capítulo 3).

Recientemente, Ting y colaboradores han caracterizado un efector Rhs denominado Tre1 con actividad antibacteriana ADP-ribosiltransferasa translocado por el SST6-1 en *Serratia proteamaculans* (195). En su estudio, Ting y colaboradores reportaron por primera vez, la función antibacteriana de Tre1, la cual modifica proteínas de tipo tubulina (FtsZ) en la bacteria adyacente, bloqueando su capacidad de polimerización. Por lo tanto Ec154_02830 podría tener una actividad ADP-ribosiltransferasa contra proteínas de tipo tubulina.

Cercano *rhs* (Ec154_02830) se encuentra codificado Ec154_02824, codificante de una RhsA (evalue: 2.83e-143) con dominio RHS repeats (evalue: desde 2.7e-05 to 1.0e-08) en la región central y un dominio metalopeptidasa M91 en la región terminal (evalue: 4e-2) asociado con el SST6-1 (Figura 49 C). El dominio de unión a metal consiste de un motivo consenso HExxH en la región C-terminal (1293-97 aa) de Ec154_02824. Los dos ligandos del residuo histidina, el Zn^{2+} catalítico y el residuo de ácido glutámico, están involucrados en la actividad peptidasa (196). Berni y colaboradores demostraron que los residuos de histidina y de ácido glutámico del motivo metalopeptidasa en la región C-terminal de VgrG2b son esenciales para su actividad antibacteriana proteasa en el periplasma (196). RhsA Ec154_02824 no posee motivo PAAR, porque hay un codón stop prematuro que divide a los genes en Ec154_02824 y Ec154_02825. Esto sugiere que esta proteína no podría ser secretada por VgrG vía cargo, es decir unida no covalentemente a proteínas estructurales del SST6.

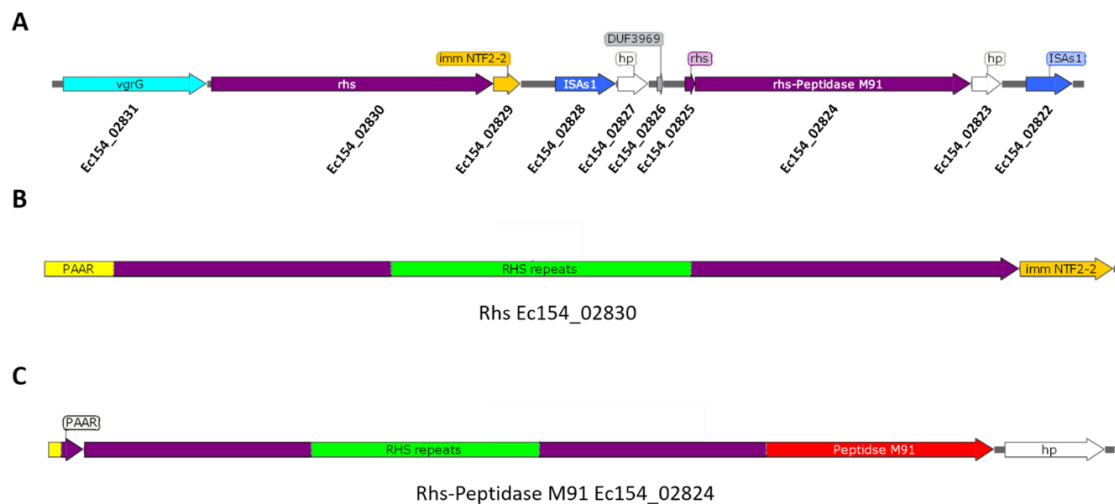


Figura 49. Diagrama de isla de patogenicidad desde los genes Ec154_02831 a 22. A) esta isla de patogenicidad presenta VgrG (celeste), dos proteínas Rhs (violeta) y una proteína de inmunidad (naranja). B y C) representa la caracterización de las Rhs Ec154_02830 y Ec154_02824, conteniendo repeticiones RHS (verde), motivo PAAR (amarillo) y dominios catalíticos en el extremo C-terminal peptidasa M91 para Ec154_02824. Río debajo de Rhs Ec154_02830 se encuentran su respectiva proteína de inmunidad NTF2-2 (naranja).

9.4.3 Isla de patogenicidad 3,4 y 5

El análisis bioinformático reveló la presencia de otras tres islas de patogenicidad compuestas por proteínas Rhs y sus proteínas de inmunidad. Cada isla codifica tres potenciales efectores Ec154_00215, Ec154_05172 y Ec154_03912, las cuales fueron predichas como proteínas Rhs por la presencia de un motivo PAAR en su extremo N-terminal y repeticiones RHS en la región central (Figura 50 A, B y C). Además, cada una de estas proteínas posee un dominio DUF4329 en la región terminal con homología a Rhs-Tox-JAB y actividad RNasa (107). Sin embargo, se desconoce la acción y el sustrato de este dominio catalítico. Por lo tanto, no se puede hacer ninguna asociación con respecto a su actividad contra procariotas o eucariotas vinculados al SST6.

Las proteínas de inmunidad de la familia NTF2 (evalue: $1.5e-24$), Ec154_00214 y Ec154_03911 (evalue: $5.2e-26$) se encuentran codificadas río abajo de Rhs-Tox-JAB-2 Ec154_00215 y Ec154_03912, respectivamente. La isla que contiene Rhs-Tox-JAB-2 Ec154_05172 no codifica para la proteína de inmunidad NTF2. Sin embargo, la actividad RNasa de Rhs-Tox-JAB-2 Ec154_05172 podría ser neutralizada por las proteínas NTF2-2 Ec154_00214 ó Ec154_03911.

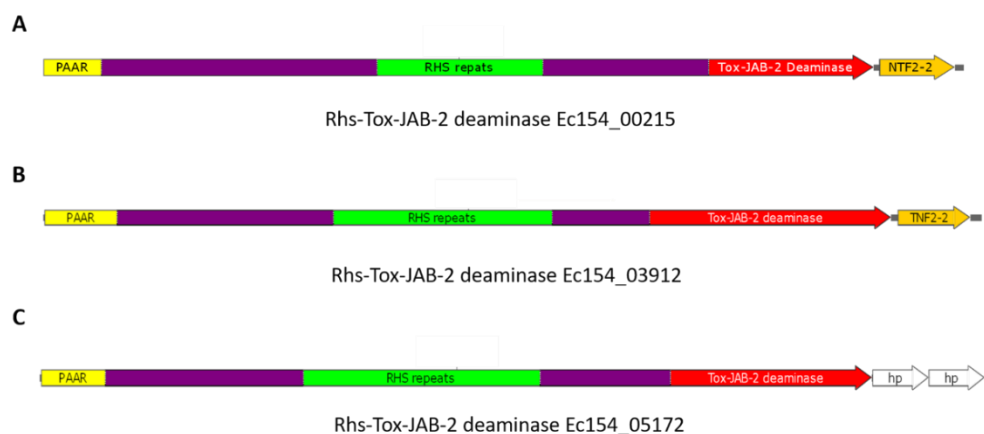


Figura 50. Diagrama de Rhs huérfanas Rhs-Tox-JAB-2. A, B y C) representan la caracterización de Ec154_00215, Ec154_03912 y Ec154_05172 con la presencia de regiones RHS (verde) y la presencia de dominio PAAR.

9.4.4 Isla de patogenicidad 6

Se encontró un gen *hcp* (Ec154_00381) codificado por fuera del operón del SST6 o de las islas VgrG. La proteína Hcp tiene un dominio HCP (evalue: $7.54e-47$) en la región N-terminal y un dominio HNH con actividad endonucleasa (evalue: $4.24e-3$) y un dominio colicina E7/E9 (Figura 51). Las proteínas Hcp con dominios en la región C-terminal son llamadas Hcp-ET (*Extension Toxin*) y se encuentran ampliamente distribuidas en *Enterobacteriaceae*. Las Hcp-ETs son proteínas estructurales del SST6-1 al formar el tubo central, así como también un efector especializado (197). Las proteínas Hcp, forman anillos heterohexaméricos con Hcp-ET y el sitio catalítico HNH-DNasa se encuentra

orientado hacia adentro del tubo. Luego, los efectores del SST6 son translocados junto con Hcp-ET en la célula blanco, donde Hcp-ET actúa como un efector (163). Existen 5 tipos diferentes de Hcp-ET (ET1-ET5). Hcp (Ec154_00381) muestra 99% identidad con Hcp-ET1 de *E. coli* O104:H4 C227-11 y *E. coli* 55989, las cuales presentan actividad HNH-DNasa. Según, Ma y colaboradores, Hcp-ET1 posee actividad citotóxica al degradar el DNA de la célula objetivo durante la competencia interbacteriana (163). Además, el SST6-2, pero no el SST6-1 es responsable por la translocación de Hcp-ET1 al citoplasma de la célula objetivo (163). La proteína de inmunidad ETI1 neutraliza la actividad DNasa. Ec154_00380, codificada río debajo de Hcp-ET1 (Figura 52), muestra 99,4% de identidad con ETI1 de *E. coli* O104:H4 C227-11 y *E. coli* 55989, lo cual indica que la toxina se encuentra codificada en tándem junto con la proteína de inmunidad en STEC O22:H8 154.

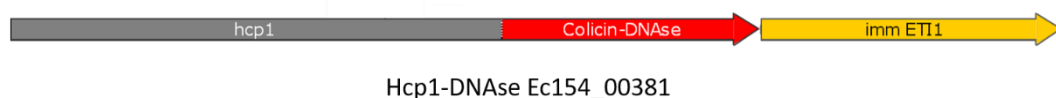


Figura 51. Esquema de Hcp1-DNasa. Caracterización de Ec154_00381, de la familia de proteínas Hcp con presencia de dominio Colicin-DNasa en el extremo C-terminal (rojo). Río abajo de Hcp-DNasa, su respectiva proteína de inmunidad ETI 1 (naranja).

9.5 Ensayo de competencia

Para estudiar el potencial antibacteriano del SST6-1 de STEC O22:H8 154, se realizó un ensayo de competencia bacteriana intra-especies entre cepas de *E. coli*. Se co-cultivó STEC O22:H8 154 en presencia de dos diferentes cepas presas carentes de SST6-

1: *E. coli* DH5- α ó EHEC O157:H7. En presencia de STEC O22:H8 154 en una proporción 0,5:1 (predador:presa), DH5- α reduce su sobrevida en 3 órdenes de magnitud (UFC/ml), mientras que EHEC O157:H7 se redujo en un orden (Figura 52). El incremento en la proporción de predador 3:1 causó una reducción mayor para DH5- α (4 órdenes) y EHEC O157:H7 (3 órdenes), respectivamente. Análisis similares utilizando sobrenadante de STEC O22:H8 154 fueron realizados, donde se demostró la ausencia de actividad bactericida contra DH5- α ó EHEC O157:H7.

El ensayo de competencia de EHEC O157:H7 (SST6-2) contra DH5- α no mostró reducción en la sobrevida de DH5- α , lo que confirma que SST6-2 no posee actividad antibacteriana.

Estos resultados confirman la actividad antibacterial de STEC O22:H8 154 contra EHEC O157:H7 y DH5- α .

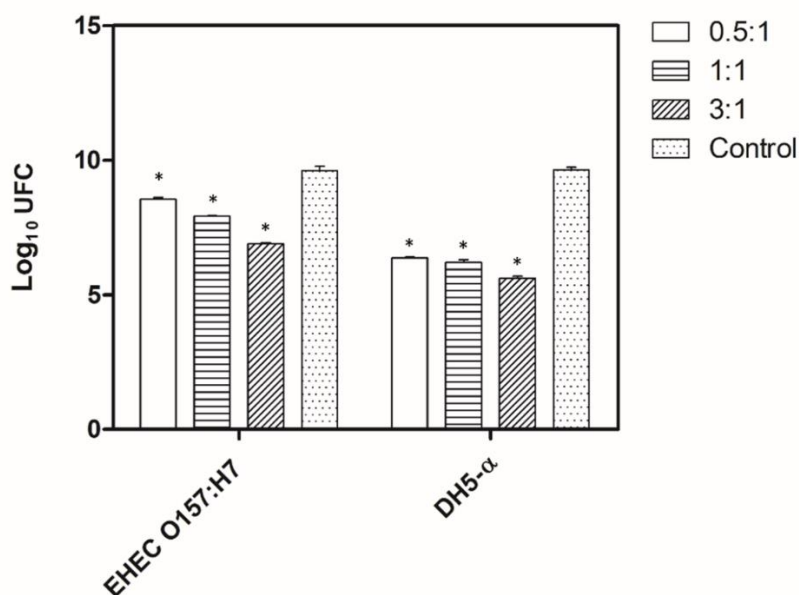


Figura 52. Ensayo de competencia. Co-cultivo de STEC O22:H8 (154) en presencia de *E. coli* DH5- α o EHEC O157:H7. La sobrevida de la cepa presa fue cuantificada por el \log_{10} UFC/ml. La relación de STEC O22:H8 (154) vs

E. coli DH5- α o EHEC O157:H7 fue representada por 0,5:1, 1:1 y 3:1. ANOVA de dos vías fue realizado como test estadístico. Los asteriscos representan significancia estadística, p-valor < 0,0001.

9.6 Discusión

Martorelli y colaboradores han demostrado que STEC O22:H8 cepa 154 podría competir con EHEC O157:H7 por el nicho de colonización en la juntura recto-anal del bovino, lo que hace que aquellos bovinos que hospedan a O22:H8 154 sean menos susceptibles a la colonización por EHEC O157:H7 y de esta manera se reduzca la excreción al ambiente (18). Los resultados obtenidos han permitido detectar actividad antibacteriana de STEC O22:H8 154 contra EHEC O157:H7 y DH5- α *in vitro* reforzando la hipótesis planteada. El estudio del genoma de STEC O22:H8 154 permitió la identificación de las bases moleculares de la interferencia antibacteriana en el intestino bovino y en ensayos *in vitro* al detectar la presencia completa de dos operones del SST6 (SST6-1 y SST6-2) y varias islas de patogenicidad que contienen potenciales efectores que probablemente conferirían ventajas adaptativas a STEC O22:H8 154 en nichos contra bacterias competentes.

APEC, EAEC, AIEC y UPEC codifican para el SST6-1 pero, hasta la fecha ninguna cepa STEC con SST6-1 había sido identificada (68,75,198,199). Esto resalta la importancia de este hallazgo ya que la presencia del SST6-1 en STEC O22:H8, acompañado por una amplia gama de potenciales efectores codificados en islas de patogenicidad, podrían otorgarle la capacidad de colonizar la mucosa bovina frente a la presencia de otras cepas STEC. Diferentes trabajos han reportado la presencia de proteínas efectoras Rhs con dominios catalíticos en sus extremos C-terminal, las cuales al ser secretadas ejercen su acción antibacteriana contra la célula blanco (94). Además, muchas de ellas presentan un dominio PAAR, lo que facilitaría su interacción con proteínas estructurales del SST6-1 como VgrG y consecuentemente su translocación (94).

Por otro lado, fueron identificados efectores especializados como VgrG1 con un dominio Tle1 y Hcp1 con un dominio DNasa. Estos efectores cumplen una función dual ya que son componentes estructurales y efectores cuando son translocados (101).

El análisis bioinformático permitió identificar una copia completa del SST6-2 en STEC O22:H8 cepa 154. Además, se observó que el SST6-2 de STEC O22:H8 cepa 154 y O157:H7 EDL933 son homólogos y que comparten la misma organización genética. En el capítulo 1 de esta tesis doctoral se demostró que el SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 le otorga ventajas adaptativas asociadas con la sobrevida en macrófagos. Por lo tanto, podría plantearse la hipótesis de que STEC O22:H8 también podría tener la misma ventaja adaptativa frente a los macrófagos. Si bien en esta tesis se demostró que el SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 no posee actividad antibacteriana frente a otra cepa no patógena *E. coli* DH5 α no se puede afirmar que el SST6-2 de STEC O22:H8 tampoco presente actividad antibacteriana. La presencia de dos SST6 (1 y 2) plantea la pregunta sobre si los efectores pueden ser translocados específicamente por uno de los SST6 o ambos. No obstante, la coexistencia de dos SST6 diferentes en STEC podrían conferir ventajas adaptativas en diversos entornos.

La demostración experimental de la competencia bacteriana de O22:H8 frente a O157:H7 y la cepa no patógena *E. coli* DH5 α junto con la identificación de potenciales efectores con dominios catalíticos, explicaría el fenómeno de competencia. No obstante, surge el interrogante sobre si esa actividad antibacteriana es dependiente del SST6-1. Además, es cuestionable su actividad antibacteriana frente a especies heterólogas, en este trabajo no se ha puesto a prueba dejando una puerta abierta para futuras investigaciones.

En el desarrollo de esta tesis se ha buscado obtener cepas mutantes STEC O22:H8 para el SST6-1 mediante la metodología de edición génica CRISPR Cas9 con el fin de demostrar que la actividad antibacteriana observada fuera dependiente del SST6-1. Si bien esta técnica fue puesta a punto para EHEC O157:H7 EDL933 con muy buenos resultados para la generación de una cepa mutante $\Delta tssB$ ([ver tópico 5.1.2.7 Obtención de cepas EHEC O157:H7 EDL933 mutantes para genes involucrados en la funcionalidad del SST6-2](#)) no fue posible para O22:H8. Por este motivo, serán necesarios futuros ensayos para demostrar la actividad antibacteriana del SST6-1, a través de la obtención de cepas mutantes y ensayos de secreción de proteínas efectoras con actividad catalítica antibacteriana.

9.7 Conclusión

En conclusión, el estudio de STEC O22:H8 ha revelado las bases moleculares que le permiten competir con EHEC O157:H7 en la colonización bovina. La actividad antibacterial de STEC O22:H8 podría estar asociada con el SST6-1, aunque no se descarta que el SST6-2 también esté implicado. Además, la identificación de diversas islas de patogenicidad que contienen potenciales efectores como Rhs, Hcp y VgrG con dominios catalíticos refuerza aún más esta actividad antibacteriana. Finalmente, los intentos de obtener cepas mutantes de STEC O22 para el SST6-1 mediante edición génica CRISPR-Cas9 no han sido exitosos hasta ahora, lo que subraya la necesidad de realizar ensayos adicionales para confirmar la actividad antibacteriana del SST6-1.

En definitiva, este estudio abre nuevas oportunidades para investigar los mecanismos de competencia bacteriana y las posibles aplicaciones de estos hallazgos en la reducción de la colonización por patógenos en el ganado.

¹⁰ Conclusión general

Conclusión general

La investigación presentada en esta tesis doctoral ha permitido avances significativos en la comprensión de los mecanismos de virulencia y competencia bacteriana de cepas STEC.

Los resultados obtenidos destacan varios puntos claves:

- **Importancia del SST6-2 en la sobrevida de EHEC O157:H7 frente a macrófagos:** Se ha demostrado que el SST6-2 de EHEC O157:H7 EDL933 juega un papel crucial en la sobrevida de la bacteria dentro de los macrófagos, sugiriendo un mecanismo de defensa frente a la respuesta inmune del hospedador.
- **Identificación de potenciales efectores del SST6-2 en EHEC O157:H7 EDL933:** A través de predicciones bioinformáticas y datos experimentales, se han identificado 98 candidatos. Se destacaron 43 de ellos debido a su sobreexpresión en la bacteria fagocitada y bajo condiciones de estrés extremo. Estos incluyen efectores como YbjW con actividad hidroxilamina reductasa, otros con funciones metabólicas específicas como (FumB, PurB, SucD) y otros con funciones hipotéticas (YbeL, YccJ), lo que abre nuevas líneas de investigación sobre su papel en la virulencia.
- **Actividad antibacteriana e identificaciones de potenciales efectores en STEC O22:H8:** Se identificó actividad antibacterial de STEC O22:H8 cepa 154 contra EHEC O157:H7 EDL933 y DH5- α . El análisis del genoma de STEC O22:H8 154 reveló la presencia de operones del SST6-1 y SST6-2 y varias islas de patogeni-

cidad, las cuales contienen potenciales efectores cuyo análisis bioinformático reveló la presencia de dominios catalíticos que podrían otorgarle una ventaja adaptativa en la competencia bacteriana.

- **Desafíos y Futuras Investigaciones:** A pesar de los avances logrados, la expresión de los potenciales efectores seleccionados en EHEC O157:H7 EDL933 para demostrar su secreción por medio del SST6-2 ha representado un desafío, al igual que la generación de cepas mutantes mediante CRISPR Cas9 en STEC O22:H8 para confirmar que la actividad antibacteriana es dependiente del SST6-1. Futuros estudios deben enfocarse en comprender la funcionalidad del SST6-1 y SST6-2, así como los mecanismos de translocación de efectores candidatos para profundizar en la patogénesis y competencia bacteriana.

11 Referencias bibliográficas

1. *Escherichia coli*: An Overview on JSTOR [Internet]. [cited 2024 Jun 8]. Available from: <https://www.jstor.org/stable/3863227>
2. Lindstedt BA, Finton MD, Porcellato D, Brandal LT. High frequency of hybrid *Escherichia coli* strains with combined Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (IPEC) and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2024 Jun 22];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30497396/>
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2004 Feb [cited 2024 Jun 8];2(2):123–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15040260/>
4. Köhler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2024 Jun 8];301(8):642–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21982038/>
5. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* [Internet]. 2000 [cited 2024 Jun 8];181(5):1753–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10823778/>
6. Goldwater PN, Bettelheim KA. *Escherichia coli* “O” group serology of a haemolytic uraemic syndrome (HUS) epidemic. *Scand J Infect Dis* [Internet]. 2000 [cited 2024 Jun 8];32(4):385–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10959646/>
7. Kauffmann F. The Serology of the Coli Group. *The Journal of Immunology* [Internet]. 1947 Sep 1 [cited 2024 Jun 8];57(1):71–100. Available from: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.57.1.71>
8. Fratamico PM, DebRoy C, Liu Y, Needleman DS, Baranzoni GM, Feng P. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2024 Jun 8];7(MAY). Available from: [/pmc/articles/PMC4853403/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2683403/)
9. Cleary TG, Mathewson JJ, Faris E, Pickering LK. Shiga-like cytotoxin production by enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. *Infect Immun* [Internet]. 1985 [cited 2024 Jun 8];47(1):335–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3880727/>
10. Joseph A, Cointe A, Kurkdjian PM, Rafat C, Hertig A. Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. *Toxins (Basel)*. 2020 Feb 1;12(2).
11. Teunis PFM, Ogden ID, Strachan NJC. Hierarchical dose response of *E. coli* O157:H7 from human outbreaks incorporating heterogeneity in exposure. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2008 Jun [cited 2024 Jul 1];136(6):761–70. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/hierarchical-dose-response-of-e-coli-o157h7-from-human-outbreaks-incorporating-heterogeneity-in-exposure/4850E9AE4AE3F2DA02C6F5772A399F07>
12. Ludwig JB, Shi X, Shridhar PB, Roberts EL, DebRoy C, Phebus RK, et al. Multiplex PCR Assays for the Detection of One Hundred and Thirty Seven Serogroups of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Associated With Cattle. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020 Jul 29 [cited 2024 Jul 1];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32850480/>

13. Amigo N, Mercado E, Bentancor A, Singh P, Vilte D, Gerhardt E, et al. Clade 8 and clade 6 strains of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle in Argentina have hypervirulent-like phenotypes. *PLoS One*. 2015 Jun 1;10(6).
14. Li B, Liu H, Wang W. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and screening for non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli*. *BMC Microbiol* [Internet]. 2017 Nov 9 [cited 2024 Jul 1];17(1):1–13. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-1123-2>
15. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* [Internet]. 1983 Mar 1 [cited 2024 Jun 8];308(12):681–5. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/6338386>
16. Morton V, Cheng JM, Sharma D, Kearney A. Notes from the Field: An Outbreak of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* O121 Infections Associated with Flour — Canada, 2016–2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2019 Jul 7 [cited 2024 Jul 1];66(26):705–6. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/wr/mm6626a6.htm>
17. Alharbi MG, Al-Hindi RR, Esmael A, Alotibi IA, Azhari SA, Alseghayer MS, et al. The “Big Six”: Hidden Emerging Foodborne Bacterial Pathogens. *Trop Med Infect Dis* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2024 Jul 1];7(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3693546/>
18. Martorelli L, Albanese A, Vilte D, Cantet R, Bentancor A, Zolezzi G, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O22:H8 isolated from cattle reduces *E. coli* O157:H7 adherence in vitro and in vivo. *Vet Microbiol* [Internet]. 2017;208(May):8–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.021>
19. Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, López C, Justel P, et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. *BMC Microbiol* [Internet]. 2007 Mar 1 [cited 2024 Jun 8];7(1):1–9. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-7-13>
20. Gould LH, Mody RK, Ong KL, Clogher P, Cronquist AB, Garman KN, et al. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000–2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog Dis* [Internet]. 2013 Apr 6 [cited 2024 Jun 8];10(5):453–60. Available from: <https://europepmc.org/article/med/23560425>
21. Kolodziejek AM, Minnich SA, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors and the ruminant reservoir. Vol. 35, *Current Opinion in Infectious Diseases*. Lippincott Williams and Wilkins; 2022. p. 205–14.
22. Naylor SW, Low JC, Besser TE, Mahajan A, Gunn GJ, Pearce MC, et al. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect Immun* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2024 Jun 8];71(3):1505–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12595469/>
23. Yoon JW, Hovde CJ. Veterinary Science All blood, No stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. Vol. 9, *J. Vet. Sci*. 2008.
24. Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S, et al. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Prot* [Internet]. 2001 [cited 2024 Jun 22];64(9):1346–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11563511/>

25. Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Ouellette LM, et al. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Mar 25 [cited 2024 Jun 22];105(12):4868–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18332430/>
26. Bryant R V., Brain O, Travis SPL. Conventional drug therapy for inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2024 Jun 8];50(1):90–112. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25523560/>
27. Tuttle J, Gomez T, Doyle MP, Wells JG, Zhao T, Tauxe R V., et al. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: Insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol Infect.* 1999 Apr;122(2):185–92.
28. Hunt JM. Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* (STEC). *Clin Lab Med* [Internet]. 2010 Mar [cited 2024 Jun 22];30(1):21. Available from: [/pmc/articles/PMC7126671/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20000000/)
29. Ferraris JR, Ramirez JA, Ruiz S, Caletti MG, Vallejo G, Piantanida JJ, et al. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Absence of recurrence after renal transplantation. *Pediatric Nephrology.* 2002;17(10):809–14.
30. Repetto HA. Epidemic hemolytic-uremic syndrome in children. *Kidney Int.* 1997 Dec;52(6):1708–19.
31. O rskov F, O rskov I, Villar JA. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* [Internet]. 1987 Aug 1 [cited 2024 Jun 22];2(8553):276. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2886741/>
32. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1998 [cited 2024 Jun 8];11(1):142–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9457432/>
33. Palermo MS, Exeni RA, Fernández GC. Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2018 Aug [cited 2024 Jun 22];7(6):697–707. Available from: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/55090>
34. Sheerin NS, Glover E. Haemolytic uremic syndrome: diagnosis and management. *F1000Res* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jun 22];8. Available from: [/pmc/articles/PMC6764117/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33000000/)
35. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2004 2:2 [Internet]. 2004 Feb [cited 2024 Jun 22];2(2):123–40. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro818>
36. Bardiau M, Szalo M, Mainil JG. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Vet Res* [Internet]. 2010 Sep [cited 2024 Jul 1];41(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20423697/>
37. Phillips AD, Navabpour S, Hicks S, Dougan G, Wallis T, Frankel G. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer’s patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* [Internet]. 2000 [cited 2024 Jul 1];47(3):377–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10940275/>
38. Franzin FM, Sircili MP. Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jul 1];2015. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25710006/>

39. Gaytán MO, Martínez-Santos VI, Soto E, González-Pedrajo B. Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2016 Oct 21 [cited 2024 Jun 8];6(OCT). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27818950/>
40. Galán JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* [Internet]. 1999 May 21 [cited 2024 Jun 22];284(5418):1322–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10334981/>
41. Batchelor M, Prasannan S, Daniell S, Reece S, Connerton I, Bloomberg G, et al. Structural basis for recognition of the translocated intimin receptor (Tir) by intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO J* [Internet]. 2000 Jun 6 [cited 2024 Jun 22];19(11):2452. Available from: [/pmc/articles/PMC212744/](https://pmc/articles/PMC212744/)
42. Etienne-Mesmin L, Chassaing B, Sauvanet P, Denizot J, Blanquet-Diot S, Darfeuille-Michaud A, et al. Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *PLoS One*. 2011;6(8).
43. Levin R, Grinstein S, Canton J. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. 2016.
44. Nunes P, Demaurex N, Dinamer MC. Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis. *Traffic* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2024 Jun 8];14(11):1118–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tra.12115>
45. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology* 2004 2:10 [Internet]. 2004 Oct [cited 2024 Jun 8];2(10):820–32. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1004>
46. Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 1991 [cited 2024 Jun 8];3(1):65–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1711326/>
47. Rohmer L, Hocquet D, Miller SI. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. Vol. 19, *Trends in Microbiology*. 2011. p. 341–8.
48. Masłowska KH, Makiela-Dzubska K, Fijałkowska IJ. The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environ Mol Mutagen* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2024 Jun 22];60(4):368. Available from: [/pmc/articles/PMC6590174/](https://pmc/articles/PMC6590174/)
49. Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2000 [cited 2024 Jun 22];6(5):458. Available from: [/pmc/articles/PMC2627954/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC2627954/?report=abstract)
50. Tesh VL. Induction of apoptosis by Shiga toxins. *Future Microbiol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2024 Jun 22];5(3):431. Available from: [/pmc/articles/PMC2855686/](https://pmc/articles/PMC2855686/)
51. Griffin PM, Tauxe R V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* [Internet]. 1991 [cited 2024 Jun 8];13(1):60–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1765120/>
52. Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicon* [Internet]. 2001 [cited 2024 Jun 8];39(11):1629–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11595626/>

53. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2024 Jun 8];50(9):2951–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22760050/>
54. Sandvig K, Van Deurs B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* [Internet]. 1996 [cited 2024 Jun 8];76(4):949–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8874490/>
55. Garred Ø, Van Deurs B, Sandvig K. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* [Internet]. 1995 May 5 [cited 2024 Jun 8];270(18):10817–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7738018/>
56. Taguchi T, Uchida H, Kiyokawa N, Mori T, Sato N, Horie H, et al. Verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived cells. *Kidney Int* [Internet]. 1998 [cited 2024 Jun 8];53(6):1681–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9607200/>
57. Cherla RP, Lee SY, Tesh VL. Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2003 Nov 21 [cited 2024 Jun 8];228(2):159–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14638419/>
58. Jackson MP, Newland JW, Holmes RK, O'Brien AD. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microb Pathog* [Internet]. 1987 [cited 2024 Jun 8];2(2):147–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3333796/>
59. Tyler SD, Johnson WM, Lior H, Wang G, Rozee KR. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1991 [cited 2024 Jun 8];29(7):1339–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1679436/>
60. Leung PHM, Peiris JSM, Ng WWS, Robins-Browne RM, Bettelheim KA, Yam WC. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2003 Dec [cited 2024 Jun 8];69(12):7549–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14660413/>
61. Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, Ogasawara J, Cheasty T, Haruki K. Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O157 isolates in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2000 [cited 2024 Jun 8];38(6):2440–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10835027/>
62. Fuller CA, Pellino CA, Flagler MJ, Strasser JE, Weiss AA. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infect Immun* [Internet]. 2011 Mar [cited 2024 Jun 8];79(3):1329–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21199911/>
63. Fitzgerald SF, Beckett AE, Palarea-Albaladejo J, McAteer S, Shaaban S, Morgan J, et al. Shiga toxin sub-type 2a increases the efficiency of *Escherichia coli* O157 transmission between animals and restricts epithelial regeneration in bovine enteroids. *PLoS Pathog* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jun 8];15(10):e1008003. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1008003>
64. Boyer F, Fichant G, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* [Internet]. 2009 Mar

- 12 [cited 2024 Jun 8];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19284603/>
65. Coulthurst SJ. The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. *Res Microbiol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2024 Jun 8];164(6):640–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23542428/>
66. Basler M. Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2015 Oct 5 [cited 2024 Jun 8];370(1679). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26370934/>
67. Navarro-Garcia F, Ruiz-Perez F, Cataldi Á, Larzábal M. Type VI secretion system in pathogenic *Escherichia coli*: Structure, role in virulence, and acquisition. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
68. Journet L, Cascales E. The Type VI Secretion System in *Escherichia coli* and Related Species. *EcoSal Plus*. 2016 Jan 11;7(1).
69. Cascales E, Cambillau C. Structural biology of type VI secretion systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2012 [cited 2024 Jun 8];367(1592):1102–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22411981/>
70. Schwarz S, Hood RD, Mougous JD. What is type VI secretion doing in all those bugs? *Trends Microbiol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2024 Jun 8];18(12):531–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20961764/>
71. Nataro JP, Yikang D, Cookson S, Cravioto A, Savarino SJ, Guers LD, et al. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis* [Internet]. 1995 [cited 2024 Jun 8];171(2):465–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7844392/>
72. Bernard CS, Brunet YR, Gueguen E, Cascales E. Nooks and crannies in type VI secretion regulation. *J Bacteriol* [Internet]. 2010 [cited 2024 Jun 8];192(15):3850–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20511495/>
73. Brunet YR, Espinosa L, Harchouni S, Mignot T, Cascales E. Imaging Type VI Secretion-Mediated Bacterial Killing. *Cell Rep*. 2013 Jan 31;3(1):36–41.
74. Flaughnatti N, Le TTH, Canaan S, Aschtgen MS, Nguyen VS, Blangy S, et al. A phospholipase A1 antibacterial Type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Mol Microbiol* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2024 Jun 8];99(6):1099–118. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26714038/>
75. Ma J, Bao Y, Sun M, Dong W, Pan Z, Zhang W, et al. Two functional type VI secretion systems in avian pathogenic *Escherichia coli* are involved in different pathogenic pathways. *Infect Immun* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 8];82(9):3867–79. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.01769-14>
76. Aschtgen MS, Bernard CS, De Bentzmann S, Llobès R, Cascales E. SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* [Internet]. 2008 Nov [cited 2024 Jun 8];190(22):7523–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18805985/>
77. Wang S, Dai J, Meng Q, Han X, Han Y, Zhao Y, et al. DotU expression is highly induced during in vivo infection and responsible for virulence and Hcp1 secretion in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 8];5(NOV). Available from: [/pmc/articles/PMC4224132/](https://pmc/articles/PMC4224132/)
78. De Pace F, Nakazato G, Pacheco A, De Paiva JB, Sperandio V, Da Silveira WD. The type VI secretion system plays a role in type 1 fimbria expression and pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* [Internet].

- 2010 Dec [cited 2024 Jun 8];78(12):4990–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20855516/>
79. Ma J, Sun M, Bao Y, Pan ZH, Zhang W, Lu C, et al. Genetic diversity and features analysis of type VI secretion systems loci in avian pathogenic *Escherichia coli* by wide genomic scanning. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jun 8];20:454–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24120694/>
 80. Zoued A, Brunet YR, Durand E, Aschtgen MS, Logger L, Douzi B, et al. Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 8];1843(8):1664–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24681160/>
 81. Logger L, Aschtgen MS, Guérin M, Cascales E, Durand E. Molecular Dissection of the Interface between the Type VI Secretion TssM Cytoplasmic Domain and the TssG Baseplate Component. *J Mol Biol* [Internet]. 2016 Nov 6 [cited 2024 Jun 8];428(22):4424–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27600411/>
 82. Zoued A, Durand E, Bebeacua C, Brunet YR, Douzi B, Cambillau C, et al. TssK is a trimeric cytoplasmic protein interacting with components of both phage-like and membrane anchoring complexes of the type VI secretion system. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Sep 20 [cited 2024 Jun 8];288(38):27031–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23921384/>
 83. Zoued A, Durand E, Santin YG, Journet L, Roussel A, Cambillau C, et al. TssA: The cap protein of the Type VI secretion system tail. *Bioessays* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2024 Jun 8];39(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28817192/>
 84. Basler M, Pilhofer M, Henderson GP, Jensen GJ, Mekalanos JJ. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature* [Internet]. 2012 Mar 8 [cited 2024 Jun 8];483(7388):182–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22367545/>
 85. Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, et al. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Mar 17 [cited 2024 Jun 8];106(11):4154–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19251641/>
 86. Renault MG, Zamarreno Beas J, Douzi B, Chabalier M, Zoued A, Brunet YR, et al. The gp27-like Hub of VgrG Serves as Adaptor to Promote Hcp Tube Assembly. *J Mol Biol* [Internet]. 2018 Sep 14 [cited 2024 Jun 8];430(18 Pt B):3143–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30031895/>
 87. Taylor NMI, van Raaij MJ, Leiman PG. Contractile injection systems of bacteriophages and related systems. *Molecular Microbiology*. 2018.
 88. Shneider MM, Buth SA, Ho BT, Basler M, Mekalanos JJ, Leiman PG. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jun 8];500(7462):350–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23925114/>
 89. Coulthurst SJ. The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. *Res Microbiol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2024 Jun 8];164(6):640–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23542428/>
 90. Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A View to a Kill: The Bacterial Type VI Secretion System. *Cell Host Microbe*. 2014 Jan;15(1):9–21.
 91. Durand E, Nguyen VS, Zoued A, Logger L, Péhau-Arnaudet G, Aschtgen MS, et al. Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. *Nature*

- [Internet]. 2015 Jul 30 [cited 2024 Jun 8];523(7562):555–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26200339/>
92. Bönemann G, Pietrosiuk A, Mogk A. Tubules and donuts: a type VI secretion story. *Mol Microbiol* [Internet]. 2010 [cited 2024 Jun 8];76(4):815–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20444095/>
 93. Cianfanelli FR, Monlezun L, Coulthurst SJ. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. Vol. 24, *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2016. p. 51–62.
 94. Russell AB, Peterson SB, Mougous JD. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology* 2014 12:2 [Internet]. 2014 Jan 2 [cited 2024 Jun 8];12(2):137–48. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3185>
 95. Benz J, Meinhart A. Antibacterial effector/immunity systems: it's just the tip of the iceberg. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2024 Jun 8];17(1):1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24581686/>
 96. Durand E, Cambillau C, Cascales E, Journet L. VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of Type VI secretion effectors. *Trends Microbiol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 8];22(9):498–507. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25042941/>
 97. Whitney JC, Beck CM, Goo YA, Russell AB, Harding BN, De Leon JA, et al. Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Mol Microbiol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 8];92(3):529–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24589350/>
 98. De Maayer P, Venter SN, Kamber T, Duffy B, Coutinho TA, Smits THM. Comparative genomics of the Type VI secretion systems of *Pantoea* and *Erwinia* species reveals the presence of putative effector islands that may be translocated by the VgrG and Hcp proteins. *BMC Genomics* [Internet]. 2011 Nov 24 [cited 2024 Jun 8];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22115407/>
 99. Russell AB, Leroux M, Hathazi K, Agnello DM, Ishikawa T, Wiggins PA, et al. Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* 2013 496:7446 [Internet]. 2013 Apr 3 [cited 2024 Jun 8];496(7446):508–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature12074>
 100. Alcoforado Diniz J, Coulthurst SJ. Intraspecies Competition in *Serratia marcescens* Is Mediated by Type VI-Secreted Rhs Effectors and a Conserved Effector-Associated Accessory Protein. *J Bacteriol* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jun 8];197(14):2350. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26150500/>
 101. Liang X, Moore R, Wilton M, Wong MJQ, Lam L, Dong TG. Identification of divergent type VI secretion effectors using a conserved chaperone domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2015 Jul 21 [cited 2024 Jun 8];112(29):9106–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26150500/>
 102. Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Sep 25 [cited 2024 Jun 8];104(39):15508–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17873062/>
 103. Schwarz S, Singh P, Robertson JD, LeRoux M, Skerrett SJ, Goodlett DR, et al. VgrG-5 is a *Burkholderia* type VI secretion system-exported protein required for multinucleated giant cell formation and virulence. *Infect Immun* [Internet]. 2014

- [cited 2024 Jun 8];82(4):1445–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24452686/>
104. Brunet YR, Hénin J, Celia H, Cascales E. Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway. *EMBO Rep* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 8];15(3):315–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24488256/>
 105. Ma J, Pan Z, Huang J, Sun M, Lu C, Yao H. The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. *Virulence* [Internet]. 2017;8(7):1189–202. Available from: <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1279374>
 106. Bondage DD, Lin JS, Ma LS, Kuo CH, Lai EM. VgrG C terminus confers the type VI effector transport specificity and is required for binding with PAAR and adaptor-effector complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Jul 5 [cited 2024 Jun 8];113(27):E3931–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27313214/>
 107. Ma J, Sun M, Dong W, Pan Z, Lu C, Yao H. PAAR-Rhs proteins harbor various C-terminal toxins to diversify the antibacterial pathways of type VI secretion systems. *Environ Microbiol*. 2017;19(1):345–60.
 108. Alteri CJ, Mobley HLT. The Versatile Type VI Secretion System. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016 Mar 25 [cited 2024 Jun 8];4(2). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.vmbf-0026-2015>
 109. Ma LS, Hachani A, Lin JS, Filloux A, Lai EM. *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for inter-bacterial competition in planta. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2014 Jul 9 [cited 2024 Jun 8];16(1):94–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24981331/>
 110. Koskiniemi S, Lamoureux JG, Nikolakakis KC, De Roodenbeke CTK, Kaplan MD, Low DA, et al. Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Apr 23 [cited 2024 Jun 8];110(17):7032–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23572593/>
 111. Vazquez-Lopez J, Navarro-Garcia F. In silico Analyses of Core Proteins and Putative Effector and Immunity Proteins for T6SS in Enterohemorrhagic *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 May 5;10.
 112. Hachani A, Wood TE, Filloux A. Type VI secretion and anti-host effectors. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2024 Jun 8];29:81–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26722980/>
 113. Zhou Y, Tao J, Yu H, Ni J, Zeng L, Teng Q, et al. Hcp family proteins secreted via the type VI secretion system coordinately regulate *Escherichia coli* K1 interaction with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun*. 2012;80(3):1243–51.
 114. de Pace F, de Paiva JB, Nakazato G, Lancellotti M, Sirsili MP, Stehling EG, et al. Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. *Microbiology (Reading)* [Internet]. 2011 Oct [cited 2024 Jun 8];157(Pt 10):2954–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21778203/>
 115. Wan B, Zhang Q, Ni J, Li S, Wen D, Li J, et al. Type VI secretion system contributes to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS). *PLoS Pathog*. 2017 Mar 1;13(3).
 116. Gupta A, Gupta R, Singh RL. *Microbes and Environment. Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jun 8];43. Available from: [/pmc/articles/PMC7189961/](https://pmc/articles/PMC7189961/)

117. Panthee B, Gyawali S, Panthee P, Techato K. Environmental and Human Microbiome for Health. *Life* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 Jun 8];12(3). Available from: [/pmc/articles/PMC8949289/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3949289/)
118. Zhang D, de Souza RF, Anantharaman V, Iyer LM, Aravind L. Polymorphic toxin systems: Comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics [Internet]. 2012. Available from: <http://www.biology-direct.com/content/7/1/18>
119. Russell AB, Hood RD, Bui NK, Leroux M, Vollmer W, Mougous JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* [Internet]. 2011 Jul 21 [cited 2024 Jun 8];475(7356):343–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21776080/>
120. Yang X, Long M, Shen X. Effector-Immunity Pairs Provide the T6SS Nanomachine its Offensive and Defensive Capabilities. *Molecules* [Internet]. 2018 [cited 2024 Jun 8];23(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29701633/>
121. Dong TG, Ho BT, Yoder-Himes DR, Mekalanos JJ. Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Feb 12 [cited 2024 Jun 8];110(7):2623–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23362380/>
122. Basler M, Ho BT, Mekalanos JJ. Tit-for-tat: Type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*. 2013 Feb 14;152(4):884–94.
123. Kukurba KR, Montgomery SB. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2024 Jul 1];2015(11):951–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25870306/>
124. Nelson NJ. Microarrays have arrived: gene expression tool matures. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2001 Apr 4 [cited 2024 Jul 3];93(7):492–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11287436/>
125. Romanov V, Davidoff SN, Miles AR, Grainger DW, Gale BK, Brooks BD. A critical comparison of protein microarray fabrication technologies. *Analyst*. 2014 Feb 17;139(6):1303–26.
126. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2009 Jan [cited 2024 Jul 1];10(1):57–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19015660/>
127. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Jul 2];13(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28545146/>
128. Farman MR, Petráčková D, Kumar D, Držmíšek J, Saha A, Čurnová I, et al. Avirulent phenotype promotes *Bordetella pertussis* adaptation to the intramacrophage environment. *Emerg Microbes Infect*. 2023;12(1).
129. Srikumar S, Kröger C, Hébrard M, Colgan A, Owen S V., Sivasankaran SK, et al. RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of *Salmonella Typhimurium*. *PLoS Pathog*. 2015 Nov 1;11(11).
130. Poirier K, Faucher SP, Béland M, Brousseau R, Gannon V, Martin C, et al. *Escherichia coli* O157:H7 survives within human macrophages: Global gene expression profile and involvement of the Shiga toxins. *Infect Immun*. 2008 Nov;76(11):4814–22.
131. Zerbini F, Zanella I, Fraccascia D, König E, Irene C, Frattini LF, et al. Large scale validation of an efficient CRISPR/Cas-based multi gene editing protocol in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2017 Apr 24 [cited 2024 Jul 3];16(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28438207/>

132. Silva-Rocha R, Martínez-García E, Calles B, Chavarría M, Arce-Rodríguez A, De Las Heras A, et al. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2024 Jul 3];41(Database issue). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23180763/>
133. Jiang L, Yang W, Jiang X, Yao T, Wang L, Yang B. Virulence-related O islands in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut Microbes* [Internet]. 2021 [cited 2024 Jun 8];13(1). Available from: [/pmc/articles/PMC8565820/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/338565820/)
134. Silva CA, Blondel CJ, Quezada CP, Porwollik S, Andrews-Polymenis HL, Toro CS, et al. Infection of Mice by *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Involves Additional Genes That Are Absent in the Genome of Serovar Typhimurium. *Infect Immun* [Internet]. 2012 Feb [cited 2024 Jun 8];80(2):839. Available from: [/pmc/articles/PMC3264302/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2264302/)
135. Blondel CJ, Jiménez JC, Leiva LE, Álvarez SA, Pinto BI, Contreras F, et al. The type VI secretion system encoded in *Salmonella* pathogenicity island 19 is required for *Salmonella enterica* serotype Gallinarum survival within infected macrophages. *Infect Immun* [Internet]. 2013 Apr [cited 2024 Jun 8];81(4):1207–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23357385/>
136. Pezoa D, Yang HJ, Blondel CJ, Santiviago CA, Andrews-Polymenis HL, Contreras I. The type VI secretion system encoded in SPI-6 plays a role in gastrointestinal colonization and systemic spread of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken. *PLoS One* [Internet]. 2013 May 14 [cited 2024 Jun 8];8(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23691117/>
137. Poole SJ, Diner EJ, Aoki SK, Braaten BA, t'Kint de Roodenbeke C, Low DA, et al. Identification of Functional Toxin/Immunity Genes Linked to Contact-Dependent Growth Inhibition (CDI) and Rearrangement Hotspot (Rhs) Systems. *PLoS Genet* [Internet]. 2011 Aug [cited 2024 Jun 8];7(8):e1002217. Available from: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1002217>
138. González-Magaña A, Tascón I, Altuna-Alvarez J, Queralt-Martín M, Colautti J, Velázquez C, et al. Structural and functional insights into the delivery of a bacterial Rhs pore-forming toxin to the membrane. *Nature Communications* 2023 14:1 [Internet]. 2023 Nov 28 [cited 2024 Jun 8];14(1):1–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-43585-5>
139. Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P. Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* [Internet]. 1995 [cited 2024 Jun 8];20(7):257–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7667876/>
140. D'Andrea LD, Regan L. TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2003 [cited 2024 Jun 8];28(12):655–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14659697/>
141. Tang L, Dong S, Rasheed N, Wu HW, Zhou N, Li H, et al. *Vibrio parahaemolyticus* prey targeting requires autoproteolysis-triggered dimerization of the type VI secretion system effector RhsP. *Cell Rep* [Internet]. 2022 Dec 6 [cited 2024 Jun 8];41(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36476863/>
142. Graumann P, Marahiel MA. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch Microbiol* [Internet]. 1996 [cited 2024 Jun 8];166(5):293–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8929274/>
143. Keto-Timonen R, Hietala N, Palonen E, Hakakorpi A, Lindström M, Korkeala H. Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Csp-family of Enteropathogenic *Yersinia*. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Jul 22 [cited 2024 Jun 8];7:209537. Available from: www.frontiersin.org

144. Bycroft M, Hubbard TJP, Proctor M, Freund SMV, Murzin AG. The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* [Internet]. 1997 Jan 24 [cited 2024 Jun 8];88(2):235–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9008164/>
145. Cianfanelli FR, Alcoforado Diniz J, Guo M, De Cesare V, Trost M, Coulthurst SJ. VgrG and PAAR Proteins Define Distinct Versions of a Functional Type VI Secretion System. *PLoS Pathog*. 2016;12(6):1–27.
146. Jurénas D, Rosa LT, Rey M, Chamot-Rooke J, Fronzes R, Cascales E. Mounting, structure and autocleavage of a type VI secretion-associated Rhs polymorphic toxin. *Nature Communications* 2021 12:1 [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Jun 8];12(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-27388-0>
147. Piper SJ, Brillault L, Rothnagel R, Croll TI, Box JK, Chassagnon I, et al. Cryo-EM structures of the pore-forming A subunit from the *Yersinia entomophaga* ABC toxin. *Nature Communications* 2019 10:1 [Internet]. 2019 Apr 26 [cited 2024 Jun 8];10(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-09890-8>
148. Wolfe MT, Heo J, Garavelli JS, Ludden PW. Hydroxylamine reductase activity of the hybrid cluster protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* [Internet]. 2002 Nov [cited 2024 Jun 8];184(21):5898–902. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12374823/>
149. Bönemann G, Pietrosiuk A, Diemand A, Zentgraf H, Mogk A. Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *EMBO J* [Internet]. 2009 Feb 18 [cited 2024 Jun 8];28(4):315–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19131969/>
150. Kapitein N, Bönemann G, Pietrosiuk A, Seyffer F, Hausser I, Locker JK, et al. ClpV recycles VipA/VipB tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type VI protein secretion. *Mol Microbiol*. 2013;
151. Murdoch SL, Trunk K, English G, Fritsch MJ, Pourkarimi E, Coulthurst SJ. The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. *J Bacteriol* [Internet]. 2011 Nov [cited 2024 Jun 8];193(21):6057–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21890705/>
152. Cassels FJ, Wolf MK. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol* [Internet]. 1995 Sep [cited 2024 Jun 22];15(3):214–26. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01569828>
153. Nazareth H, Genagon SA, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* survives within neutrophils. *Infect Immun* [Internet]. 2007 Jun [cited 2024 Jun 8];75(6):2776–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17296761/>
154. Medina E, Goldmann O, Toppel AW, Chhatwal GS. Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion. *J Infect Dis* [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2024 Jun 8];187(4):597–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12599076/>
155. Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* [Internet]. 2000 Apr 1 [cited 2024 Jun 8];164(7):3713–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10725730/>
156. Baldassarri L, Bertuccini L, Creti R, Filippini P, Ammendolia MG, Koch S, et al. Glycosaminoglycans mediate invasion and survival of *Enterococcus faecalis* into macrophages. *J Infect Dis* [Internet]. 2005 Apr 15 [cited 2024 Jun 8];191(8):1253–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15776371/>

157. Wan B, Zhang Q, Ni J, Li S, Wen D, Li J, et al. Type VI secretion system contributes to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS). *PLoS Pathog*. 2017;13(3):1–28.
158. Abshire KZ, Neidhardt FC. Growth rate paradox of *Salmonella typhimurium* within host macrophages. *J Bacteriol* [Internet]. 1993 [cited 2024 Jun 8];175(12):3744–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8509329/>
159. De Chastellier C, Berche P. Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infect Immun* [Internet]. 1994 [cited 2024 Jun 8];62(2):543. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/186140/>
160. Srinivasa Rao PS, Yamada Y, Yuen PT, Ka YL. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Mol Microbiol* [Internet]. 2004 Jul [cited 2024 Jun 8];53(2):573–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15228535/>
161. Salomon D, Kinch LN, Trudgian DC, Guo X, Klimko JA, Grishin N V., et al. Marker for type VI secretion system effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2014;111(25):9271–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1406110111>
162. Lien YW, Lai EM. Type VI Secretion Effectors: Methodologies and Biology. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017;7(June):1–11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00254/full>
163. Ma J, Pan Z, Huang J, Sun M, Lu C, Yao H. The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. *Virulence*. 2017 Oct 3;8(7):1189–202.
164. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2024 Jun 8];264(1):182–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25703560/>
165. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* [Internet]. 2001 [cited 2024 Jun 8];2(10):907–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11577346/>
166. Aubert DF, Xu H, Yang J, Shi X, Gao W, Li L, et al. A *Burkholderia* Type VI Effector Deamidates Rho GTPases to Activate the Pyrin Inflammasome and Trigger Inflammation. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016 May 11 [cited 2024 Jun 8];19(5):664–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27133449/>
167. Henderson B, Martin A. Bacterial Moonlighting Proteins and Bacterial Virulence. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2024 Jul 3];358:155–213. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/82_2011_188
168. (16) (PDF) The Roles of Moonlighting Proteins in Bacteria [Internet]. [cited 2024 Jul 3]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/250924056_The_Roles_of_Moonlighting_Proteins_in_Bacteria
169. Westermann AJ, Barquist L, Vogel J. Resolving host–pathogen interactions by dual RNA-seq. Vol. 13, *PLoS Pathogens*. Public Library of Science; 2017.
170. Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, Morin NP, Nataro JP. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* [Internet]. 2006 Sep [cited 2024 Jun 8];61(5):1267–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16925558/>
171. Salomon D, Klimko JA, Orth K. H-NS regulates the *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1. *Microbiology (N Y)* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 8];160(Pt 9):1867. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24148687/>

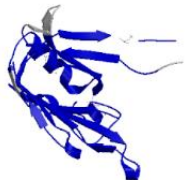
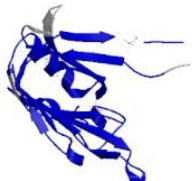
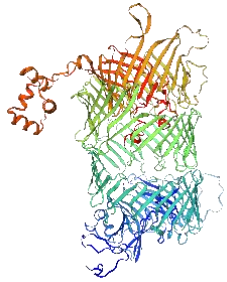
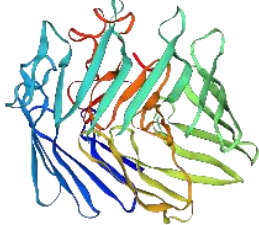
172. Zhang J, Xiao J, Zhang Y, Cui S, Liu Q, Wang Q, et al. A new target for the old regulator: H-NS suppress T6SS secretory protein EvpP, the major virulence factor in the fish pathogen *Edwardsiella tarda*. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2024 Jun 8];59(5):557–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25131176/>
173. Brunet YR, Khodr A, Logger L, Aussel L, Mignot T, Rimsky S, et al. H-NS Silencing of the Salmonella Pathogenicity Island 6-Encoded Type VI Secretion System Limits Salmonella enterica Serovar Typhimurium Interbacterial Killing. *Infect Immun* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jun 8];83(7):2738–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25916986/>
174. Kim O Bin, Lux S, Unden G. Anaerobic growth of *Escherichia coli* on D-tartrate depends on the fumarate carrier DcuB and fumarase, rather than the L-tartrate carrier TtdT and L-tartrate dehydratase. *Arch Microbiol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2024 Jun 8];188(6):583–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17643228/>
175. Tsai M, Koo J, Yip P, Colman RF, Segall ML, Howell PL. Substrate and product complexes of *Escherichia coli* adenylosuccinate lyase provide new insights into the enzymatic mechanism. *J Mol Biol* [Internet]. 2007 Jul 13 [cited 2024 Jun 8];370(3):541–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17531264/>
176. Joyce MA, Fraser ME, Brownie ER, James MNG, Bridger WA, Wolodko WT. Probing the nucleotide-binding site of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *Biochemistry* [Internet]. 1999 Jun 1 [cited 2024 Jun 8];38(22):7273–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10353839/>
177. Hespanhol JT, Nóbrega-Silva L, Bayer-Santos E. Regulation of type VI secretion systems at the transcriptional, posttranscriptional and posttranslational level. *Microbiology (N Y)* [Internet]. 2023 [cited 2024 Jun 23];169(8). Available from: [/pmc/articles/PMC10482370/](https://pmc/articles/PMC10482370/)
178. Speare L, Woo M, Bultman KM, Mandel MJ, Wollenberg MS, Septer AN. Host-Like Conditions Are Required for T6SS-Mediated Competition among *Vibrio fischeri* Light Organ Symbionts. *mSphere* [Internet]. 2021 Aug 25 [cited 2024 Jun 23];6(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34287008/>
179. Pomposiello PJ, Demple B. Redox-operated genetic switches: The SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol*. 2001 Mar 1;19(3):109–14.
180. Kim SK, Lee JB, Yoon JW. Characterization of transcriptional activities at a divergent promoter of the type VI secretion system in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2024 Jun 22];60(9):928–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35984617/>
181. Dorman CJ. H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2024 Jun 8];5(2):157–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17191074/>
182. Russell AB, Leroux M, Hathazi K, Agnello DM, Ishikawa T, Wiggins PA, et al. Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* [Internet]. 2013 Apr 25 [cited 2024 Jun 8];496(7446):508–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23552891/>
183. Liu M, Wang H, Liu Y, Tian M, Wang Z, Shu RD, et al. The phospholipase effector Tle1Vc promotes *Vibrio cholerae* virulence by killing competitors and impacting gene expression. *Gut Microbes* [Internet]. 2023 [cited 2024 Jun 8];15(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37526354/>

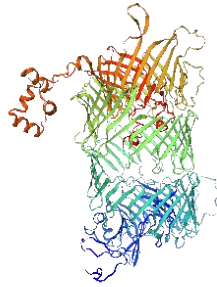
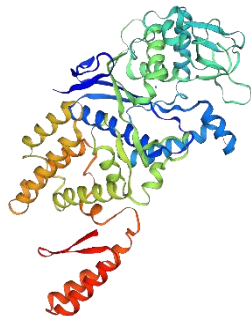


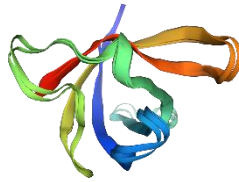
184. Flaugnatti N, Rapisarda C, Rey M, Beauvois SG, Nguyen VA, Canaan S, et al. Structural basis for loading and inhibition of a bacterial T6SS phospholipase effector by the VgrG spike. *EMBO J* [Internet]. 2020 Apr 30 [cited 2024 Jun 8];39(11):e104129–e104129. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC7265238>
185. Zhang D, de Souza RF, Anantharaman V, Iyer LM, Aravind L. Polymorphic toxin systems: Comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics. *Biol Direct* [Internet]. 2012 Jun 25 [cited 2024 Jun 8];7(1):1–76. Available from: <https://biologydirect.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-6150-7-18>
186. Ray A, Schwartz N, de Souza Santos M, Zhang J, Orth K, Salomon D. Type VI secretion system MIX-effectors carry both antibacterial and anti-eukaryotic activities. *EMBO Rep* [Internet]. 2017 Nov [cited 2024 Jun 8];18(11):1978–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28912123/>
187. Lang AE, Konukiewitz J, Aktories K, Benz R. TcdA1 of *Photobacterium luminescens*: Electrophysiological Analysis of Pore Formation and Effector Binding. *Biophys J*. 2013 Jul 16;105(2):376–84.
188. Kung VL, Khare S, Stehlik C, Bacon EM, Hughes AJ, Hauser AR. An rhs gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a virulence protein that activates the inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Jan 24 [cited 2024 Jun 8];109(4):1275–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22232685/>
189. Mittl PRE, Schneider-Brachert W. Sel1-like repeat proteins in signal transduction. *Cell Signal*. 2007 Jan;19(1):20–31.
190. Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, et al. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Mar;106(11):4154–9.
191. Zhang D, Iyer LM, Aravind L. A novel immunity system for bacterial nucleic acid degrading toxins and its recruitment in various eukaryotic and DNA viral systems. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2011 Jun [cited 2024 Jun 8];39(11):4532. Available from: <https://pmc/articles/PMC3113570/>
192. Aravind L, Makarova KS, Koonin E V. Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Sep 9 [cited 2024 Jun 8];28(18):3417. Available from: <https://pmc/articles/PMC110722/>
193. Bellieny-Rabelo D, Tanui CK, Miguel N, Kwenda S, Shyntum DY, Moleleki LN. Transcriptome and Comparative Genomics Analyses Reveal New Functional Insights on Key Determinants of Pathogenesis and Interbacterial Competition in *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2024 Jun 8];85(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30413477/>
194. Santos MNM, Cho ST, Wu CF, Chang CJ, Kuo CH, Lai EM. Redundancy and Specificity of Type VI Secretion vgrG Loci in Antibacterial Activity of *Agrobacterium tumefaciens* 1D1609 Strain. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 Jan 14 [cited 2024 Jun 8];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31993035/>
195. Ting SY, Bosch DE, Mangiameli SM, Radey MC, Huang S, Park YJ, et al. Bifunctional Immunity Proteins Protect Bacteria against FtsZ-Targeting ADP-Ribosylating Toxins. *Cell* [Internet]. 2018 Oct 18 [cited 2024 Jun 8];175(5):1380–1392.e14. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC6239978>
196. Berni B, Soscia C, Djermoun S, Ize B, Bleves S. A Type VI Secretion System Trans-Kingdom Effector Is Required for the Delivery of a Novel Antibacterial

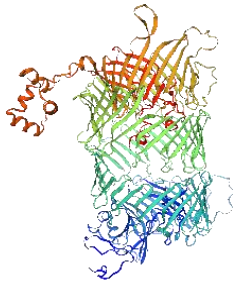
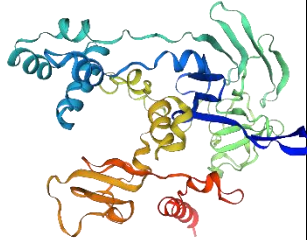
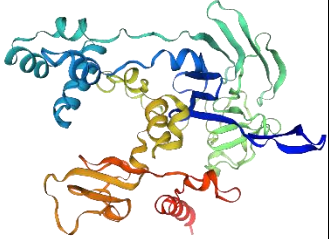

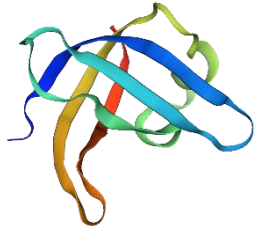
- Toxin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jun 8];10(JUN). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31231326/>
197. Hood RD, Singh P, Hsu FS, Güvener T, Carl MA, Trinidad RRS, et al. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2010 Jan 21 [cited 2024 Jun 8];7(1):25–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20114026/>
 198. Le TTH, Kellenberger C, Boyer M, Santucci P, Flaughatti N, Cascales E, et al. Activity and Crystal Structure of the Adherent-Invasive *Escherichia coli* Tle3/Tli3 T6SS Effector/Immunity Complex Determined Using an AlphaFold2 Predicted Model. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2024 Jun 23];24(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36675258/>
 199. Zong B, Zhang Y, Wang X, Liu M, Zhang T, Zhu Y, et al. Characterization of multiple type-VI secretion system (T6SS) VgrG proteins in the pathogenicity and antibacterial activity of porcine extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Virulence* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2024 Jun 23];10(1):118–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30676217/>

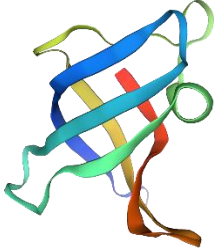
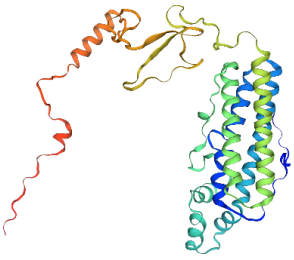
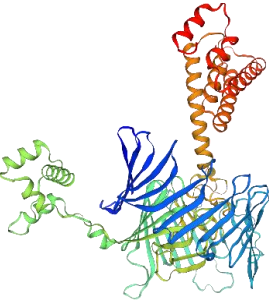
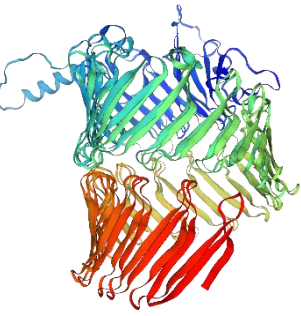
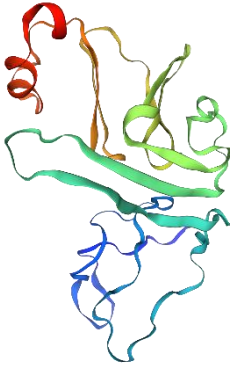
12 Material suplementario: capítulo 1

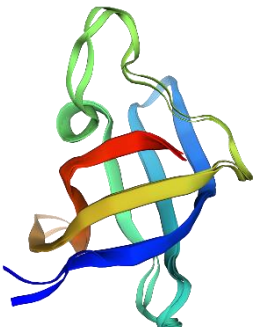
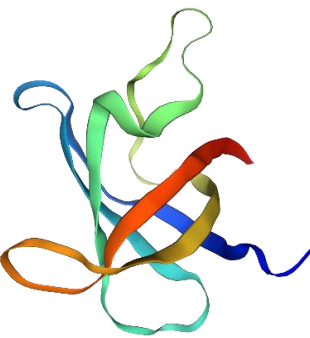

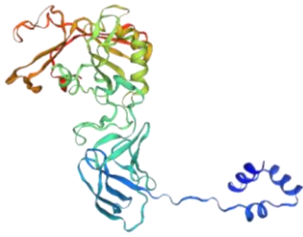
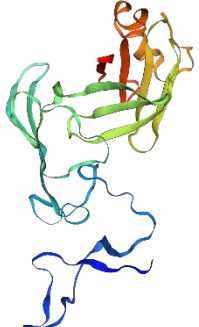
12.1 Tabla suplementaria 1

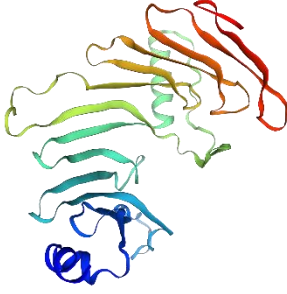
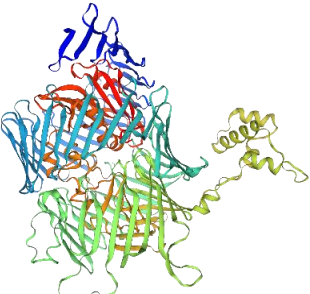
Tabla suplementaria 1. Análisis estructural de potenciales efectores del SST6-2 predichos por bioinformática					
	Locus tag	Nombre	HHpred	Swiss model	Estructura tridimensional
Adentro del SST6-2	Z0248	Hcp-1	Probabilidad: 99,97% E-value: 6.4e-29 Haemolysin co-regulated protein; T6SS, extended conformation, <i>Vibrio cholerae</i> , Structural protein; 3.7A <i>Vibrio cholerae</i>	Type VI secretion system tube protein Hcp Crystal structure of Hcp protein Identidad: 32.91 Similitud: 0,36	
	Z0266	Hcp-2	Probabilidad: 100 % E-value: 3.3e-34 Haemolysin co-regulated protein; T6SS, extended conformation, <i>Vibrio cholerae</i> , Structural protein; 3.7A <i>Vibrio cholerae</i>	Type VI secretion system tube protein Hcp Crystal structure of Hcp protein Identidad: 32.91 Similitud: 0,36	
	Z0268	RhsA	Probabilidad: 100% E-value: 3.8e-64 Toxin protein Tse5; Pore-forming protein, <i>P.aeruginosa</i> , effector, Bacterial Rearrangement hot spot protein, ion channel,	Toxin protein Tse5 Type six secretion system exported effector 5 (Tse5) Identidad: 39 Similitud: 0,38	
	Z0272	RhsB	Probabilidad: 100% E-value: 5.5e-33 Putative Rhs-family protein; T6SS, Rhs proteins, polymorphic toxins, TOXIN; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O3:K6 (strain RIMD 2210633)	Toxin protein Tse5 Type six secretion system exported effector 5 (Tse5) Identidad: 39 Similitud: 0,38	

Afuera del SST6-2	Z0651	RhsD	Probabilidad: 100% E-value: 5e-71 Rhs family protein; bacterial type VI secretion system, effector, Rhs repeats, TOXIN; <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	Toxin protein Tse5 Type six secretion system exported effector 5 (Tse5) Identidad: 34 Similitud: 0,38	
	Z0681	CysS	Probabilidad: 100% E-value: 5.9e-83 CYSTEINYL-TRNA SYNTHETASE; TRNA SYNTHETASE, CYSTEINE, E.COLI, LIGASE; 2.3A <i>Escherichia coli</i>	Cysteine--tRNA ligase Crystal structure of cysteinyl-tRNA synthetase binary complex with tRNACys Identidad: 99,57 Similitud: 0,62	
	Z0702	RhsG	Probabilidad: 99,6% E-value: 1.5e-27 Tre23; RHS, TVISS, T6SS, TOXIN; 3.17A <i>Photorhabdus laumondii</i> subsp. laumondii TTO1	<i>Photorhabdus laumondii</i> T6SS-associated Rhs protein carrying the Tre23 toxin domain Identidad: 49,10 Similitud: 0,43	
	Z0705	RhsF	Probabilidad: 99,6% E-value: 1.1e-98 Putative Rhs-family protein; T6SS, Rhs proteins, polymorphic toxins, TOXIN; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O3:K6 (strain RIMD 2210633	<i>Photorhabdus laumondii</i> T6SS-associated Rhs protein carrying the Tre23 toxin domain Identidad: 43,87 Similitud: 0,43	
	Z0769	cspE	Probabilidad: 99,3% E-value: 4.4e-10 RNA chaperone, negative regulator of cspA transcription; BETA BARREL, DNA BINDING PROTEIN/TRANSCRIPTION, Cytoplasm, GENE	PRNA chaperone, negative regulator of cspA transcription Structure of cold shock protein E from <i>Salmonella typhimurium</i> Identidad: 98,5 Similitud: 0,61	

Z0847	RhsC	Probabilidad: 100% E-value: 2.6e-72 Rhs family protein; bacterial type VI secretion system, effector, Rhs repeats, TOXIN; <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	Toxin protein Tse5 Type six secretion system exported effector 5 (Tse5) Identidad: 34,9 Similitud: 0,39	
Z0851	Hipótesis	Probabilidad: 99,85% E-value: 1.1e-20 RHS2; ABC toxin, RHS, TOXIN; 2.4A <i>Yersinia entomophaga</i>	Putative uncharacterized protein YbfO Identidad: 97,5 Similitud: 0,63	
Z1107	ybjW	Probabilidad: 100% E-value: 6.6e-119 Hydroxylamine reductase; Hybrid cluster, iron-sulfur cluster, METAL BINDING PROTEIN, OXIDOREDUCTASE; 3.61A <i>Escherichia coli</i> K-12	Hydroxylamine reductaseHybrid cluster protein (HCP) from <i>Escherichia coli</i> Identidad: 99,4 Similitud: 0,64	
Z1117	cspD	Probabilidad: 99,24% E-value: 2.2e-9 Cold-shock protein; cold shock protein, beta-barrel, DNA binding, DNA BINDING PROTEIN; NMR <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (strain C231)	Cold shock-like protein CspD lphaFold DB model of D3GZV1_ECO44 (gene: cspD, organism: <i>Escherichia coli</i> O44:H18 (strain 042 / EAEC)) Identidad: 99,4 Similitud: 0,64	
Z1405	cspH	Probabilidad: 99,27% E-value: 7.2e-10 Cold shock-like protein; cold shock-like protein, CSD, Csp, oligonucleotide binding fold, OB fold, RNA BINDING PROTEIN.	Cold-shock DNA-binding domain protein AlphaFold DB model of A0A829LBR4_ECOLX (gene: A0A829LBR4_ECOLX, organism: <i>Escherichia coli</i> 907889) Identidad: 100 Similitud: 0,61	

Z1406	cspG	<p>Probabilidad: 99,17% E-value: 2.9e-9 Cold shock-like protein; cold shock-like protein, CSD, Csp, oligonucleotide binding fold, OB fold, RNA BINDING PROTEIN.</p>	<p>AlphaFold DB model of A0A6I4KI99 (gene: unknown, organism: unknown) Identidad: 100 Similitud: 0,62</p>	
Z1921	KatN	<p>Probabilidad: 99,17% E-value: 2.9e-9 Manganese catalase; OXIDOREDUCTASE, HEXAMER, DIMANGANESE CATALASE, METALLOENZYME, PEROXIDASE; HET: MN3, MES; 1.33A <i>Lactobacillus plantarum</i></p>	<p>Mn-containing catalase AlphaFold DB model of A0A1S9IWE2_SHIBO (gene: A0A1S9IWE2_SHIBO, organism: <i>Shigella boydii</i>) Identidad: 99,32 Similitud: 0,61</p>	
Z2257	RhsE	<p>Probabilidad: 100% E-value: 1.1e-35 Putative Rhs-family protein; T6SS, Rhs proteins, polymorphic toxins, TOXIN; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O3:K6 (strain RIMD 2210633)</p>	<p>RHS repeat protein AlphaFold DB model of A0A793N7P1_ECOLX (gene: A0A793N7P1_ECOLX, organism: <i>Escherichia coli</i>) Identidad: 83,20 Similitud: 0,56</p>	
Z2259	Hipótesis	<p>Probabilidad: 100% E-value: 1.1e-35 Tre23; RHS, TVISS, T6SS, TOXIN; 3.17A <i>Photorhabdus laumondii</i> subsp. laumondii TTO1</p>	<p>Toxin protein Tse5 Type six secretion system exported effector 5 (Tse5) Identidad: 30,33 Similitud: 0,34</p>	
Z2261	Hipótesis	<p>Probabilidad: 98,36 % E-value: 0.0000057 Tre23; RHS, TVISS, T6SS, TOXIN; 3.17A <i>Photorhabdus laumondii</i> subsp. laumondii TTO1</p>	<p>Uncharacterized protein AlphaFold DB model of A0A3T4KHM5_ECOLX (gene: A0A3T4KHM5_ECOLX, organism: <i>Escherichia coli</i>) Identidad: 95,15 Similitud: 0,60</p>	

Z2868	cspC	Probabilidad: 99,28 % E-value: 5.9e-10 RNA chaperone, negative regulator of cspA transcription; BETA BARREL, DNA BINDING PROTEIN/TRANSCRIPTION, Cytoplasm, GENE	Cold shock-like protein CspC Crystal structure of PlyGRCS, a bacteriophage Endolysin in complex with Cold shock protein C Identidad: 100 Similitud: 0,61	
Z4981	cspA	Probabilidad: 99,34 % E-value: 2.3e-10 Cold shock-like protein; cold shock-like protein, CSD, Csp, oligonucleotide binding fold, OB fold, RNA BINDING PROTEIN	Major cold shock protein AlphaFold DB model of B7MER3_ECO45 (gene: cspA, organism: Escherichia coli O45:K1 (strain S88 / ExPEC)) Identidad: 86,49 Similitud: 0,59	
Z5014	Rhs	Probabilidad: 100 % E-value: 1.7e-64 Toxin protein Tse5; Pore-forming protein, <i>P.aeruginosa</i> , effector, Bacterial Rearrangement hot spot protein, ion channel	Toxin protein Tse5 Type six secretion system exported effector 5 (Tse5) Identidad: 97,60 Similitud: 0,62	
Z5017	RhsH	Probabilidad: 99,72 % E-value: 2.2e-17 RHS2; ABC toxin, RHS, TOXIN; 2.4A <i>Yersinia entomophaga</i>	Type VI secretion protein Rhs AlphaFold DB model of A0A377BUB4_ECOLX (gene: wapA_1, organism: <i>Escherichia coli</i>) Identidad: 98,08 Similitud: 0,62	
Z5485	Hipótesis	Probabilidad: 99,36 % E-value: 2.3e-10 Putative Rhs-family protein; T6SS, Rhs proteins, polymorphic toxins, TOXIN; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O3:K6	RhsB protein AlphaFold DB model of A0A377A7Q1_ECOLX (gene: rhsB_2, organism: <i>Escherichia coli</i>) Identidad: 89,25 Similitud: 0,57	

Z5487	Hipótesis	Probabilidad: 99,41 % E-value: 2.9e-11 Putative Rhs-family protein; T6SS, Rhs proteins, polymorphic toxins, TOXIN; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype O3:K6	UniProtKB entry unknown, most likely obsolete AlphaFold DB model of F4SRG8 (gene: unknown, organism: unknown) Identidad: 95 Similitud: 0,61	
Z5488	RhsI	Probabilidad: 100 % E-value: 8e-58 Rhs family protein; bacterial type VI secretion system, effector, Rhs repeats, TOXIN; <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	Protein RhsB AlphaFold DB model of RHSB_ECOLI (gene: rhsB, organism: <i>Escherichia coli</i> (strain K12)) Identidad: 89,37 Similitud: 0,59	

12.2 Tabla suplementaria 2

Tabla suplementaria 2. Efectores identificados por Wan y colaboradores (157)		
Gen	Locus tag	Proteína
<i>aceA</i>	Z5601	isocitrate lyase
<i>aceB</i>	Z5600	malate synthase A
<i>aceE</i>	Z0124	pyruvate dehydrogenase (decarboxylase component)
<i>agp</i>	Z1421	periplasmic glucose-1-phosphatase
<i>argS</i>	Z2929	arginine tRNA synthetase
<i>argT</i>	Z3572	lysine-, arginine-, ornithine-binding periplasmic protein
<i>artI</i>	Z1093	arginine 3rd transport system periplasmic binding protein
<i>aspS</i>	Z2919	aspartate tRNA synthetase
<i>astD</i>	Z2778	putative aldehyde dehydrogenase
<i>atpA</i>	Z5232	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, alpha-subunit
<i>bglA</i>	Z4239	6-phospho-beta-glucosidase A; cryptic
<i>cadA</i>	Z5734	lysine decarboxylase 1
<i>cysK</i>	Z3680	cysteine synthase A, O-acetylserine sulfhydrylase A
<i>cysP</i>	Z3690	thiosulfate binding protein
<i>dadX</i>	Z1953	alanine racemase 2, catabolic
<i>dcp</i>	Z2160	dipeptidyl carboxypeptidase II
<i>fabA</i>	Z1304	beta-hydroxydecanoyl thioester dehydrase, trans-2-decenoyl-ACP isomerase
<i>fliD</i>	Z3014	flagellar biosynthesis; filament capping protein; enables filament assembly
<i>fumB</i>	Z5724	fumarase B= fumarate hydratase Class I; anaerobic isozyme
<i>gabD</i>	Z3959	succinate-semialdehyde dehydrogenase, NADP-dependent activity

<i>galM</i>	Z0926	galactose-1-epimerase (mutarotase)
<i>gldA</i>	Z5500	glycerol dehydrogenase, (NAD)
<i>glnH</i>	Z1033	periplasmic glutamine-binding protein; permease
<i>glnS</i>	Z0827	glutamine tRNA synthetase
<i>gltA</i>	Z0873	citrate synthase
<i>gltX</i>	Z3665	glutamate tRNA synthetase, catalytic subunit
<i>gor</i>	Z4900	glutathione oxidoreductase
<i>hemL</i>	Z0165	glutamate-1-semialdehyde aminotransferase (aminomutase)
<i>hisC</i>	Z3183	histidinol-phosphate aminotransferase
<i>htrA</i>	Z0173	periplasmic serine protease Do; heat shock protein HtrA
<i>ilvC</i>	Z5285	ketol-acid reductoisomerase
<i>katE</i>	Z2761	catalase; hydroperoxidase HP(II)(III)
<i>katG</i>	Z5497	catalase; hydroperoxidase HP(I)
<i>katN</i>	z1921	catalase
<i>kbl</i>	Z5044	2-amino-3-ketobutyrate CoA ligase (glycine acetyltransferase)
<i>lolA</i>	Z1237	periplasmic protein effects translocation of lipoproteins from inner membrane to outer
<i>manA</i>	Z2616	mannose-6-phosphate isomerase
<i>manB</i>	Z3194	phosphomannomutase
<i>mtlD</i>	Z5024	mannitol-1-phosphate dehydrogenase
<i>oppA</i>	Z2019	oligopeptide transport; periplasmic binding protein
<i>pepA</i>	Z5872	aminopeptidase A/I
<i>pnp</i>	Z4525	polynucleotide phosphorylase; cytidylate kinase activity
<i>ppiA</i>	Z4724	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (rotamase A)
<i>purB</i>	Z1860	adenylosuccinate lyase
<i>purD</i>	Z5582	phosphoribosylglycinamide synthetase = GAR synthetase
<i>purH</i>	Z5583	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase = AI-CAR formyltransferase; IMP cyclohydrolase
<i>purL</i>	Z3835	phosphoribosylformyl-glycineamide synthetase = FGAM synthetase
<i>pyrC</i>	Z1699	dihydro-orotase
<i>rfaD</i>	Z5046	ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase
<i>rplP</i>	Z4684	50S ribosomal subunit protein L16
<i>rpoC</i>	Z5561	RNA polymerase, beta prime subunit
<i>serA</i>	Z4251	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
<i>stx2B</i>	Z1465	shiga-like toxin II B subunit encoded by bacteriophage BP-933W
<i>sucD</i>	Z0883	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit
<i>talA</i>	Z3720	transaldolase A
<i>talB</i>	Z0008	transaldolase B
<i>tig</i>	Z0541	trigger factor; a molecular chaperone involved in cell division
<i>tktB</i>	Z3721	transketolase 2 isozyme
<i>topA</i>	Z2536	DNA topoisomerase type I, omega protein
<i>tyrB</i>	Z5652	tyrosine aminotransferase, tyrosine repressible
<i>ugpB</i>	Z4822	sn-glycerol 3-phosphate transport system; periplasmic binding protein
<i>ushA</i>	Z0599	UDP-sugar hydrolase (5'-nucleotidase)

<i>uvrA</i>	Z5657	excision nuclease subunit A
<i>yaiA</i>	Z0485	orf, hypothetical protein
<i>ybeJ</i>	Z0805	putative periplasmic binding transport protein
<i>ybeL</i>	Z0790	putative alpha helical protein
<i>yccJ</i>	Z1422	orf, hypothetical protein
<i>yedU</i>	Z3059	hypothetical protein Z3059
<i>yeiP</i>	Z3430	putative elongation factor
<i>yncB</i>	Z2270	putative oxidoreductase
<i>yqhE</i>	Z4365	putative enzyme
<i>zwf</i>	Z2904	glucose-6-phosphate dehydrogenase

12.3 Tabla suplementaria 3

Tabla suplementaria 3. Localización subcelular de potenciales efectores identificados por bioinformática y obtenidos por Wan y colaboradores (115) PSORTb predice localización subcelular donde CT: citoplasmática; EX: extracelular; PE: periplasma Signal IP predice péptido señal (en rojo se indican las proteínas que son positivas para péptido señal) TMHM 2.0 predice dominios transmembranas									
				PSORTb	Signal IP				TMHMM 2.0
Predicción de efectores	Gen	Locus tag	Proteína/Función	LSC	Signal peptide (Sec/SPI)	TAT signal peptide (Tat/SPI)	Lipoprotein signal peptide (Sec/SPII)	Otra	α -Hélices TM
Bioinformática	<i>cspA</i>	z4981	Cold shock protein CspA	CT	0,0087	0,00007	0,0013	0,9894	no
	<i>cspC</i>	z2868	Cold shock protein CspC	CT	0,0093	0,0006	0,0008	0,9892	no
	<i>cspD</i>	z1117	Cold shock protein CspD	CT	0,0097	0,0005	0,0011	0,9886	no
	<i>cspE</i>	z0769	Cold shock protein CspE	CT	0,009	0,0009	0,0007	0,9895	no
	<i>cspG</i>	z1406	Cold shock protein CspG	CT	0,0056	0,0004	0,0008	0,9993	no
	<i>cspH</i>	z1405	Cold shock protein CspH	CT	0,0104	0,0012	0,0013	0,9871	no
	<i>cysS</i>	z0681	Cysteine--tRNA ligase	CT	0,014	0,0003	0,0016	0,9841	no
	<i>hcp1</i>	z0248		EX	0,0125	0,0012	0,2946	0,6916	no
	<i>hcp2</i>	z0266		EX	0,0313	0,002	0,0063	0,9604	no
	<i>KatN</i>	z1921	Catalase-peroxidase	CT	0,0047	0,0005	0,0007	0,9941	no
	<i>rhsA</i>	z0268		desconocida	0,1093	0,2086	0,5624	0,1197	no
	<i>rhsA</i>	z5014		desconocida	0,1093	0,2086	0,5624	0,1197	no
	<i>rhsB</i>	z0272		EX	0,0781	0,1054	0,0151	0,8015	no
	<i>rhsC</i>	z0847		desconocida	0,2121	0,1097	0,1606	0,5176	no
	<i>rhsD</i>	z0651		desconocida	0,2154	0,0855	0,1212	0,5779	no
	<i>rhsE</i>	z2257		desconocida	0,0115	0,0005	0,001	0,9869	no
	<i>rhsF</i>	z0705		CT	0,0244	0,094	0,0035	0,8781	no
	<i>rhsG</i>	z0702		desconocida	0,0194	0,0191	0,0083	0,9235	no
	<i>rhsH</i>	z5017		desconocida	0,0055	0,1563	0,0176	0,7706	no

Potenciales efectores reportados por Wan y colaboradores	<i>rhsI</i>	z5488		EX	0,0378	0,0102	0,0076	0,9443	no
	<i>ybjw</i>	z1107	Hidroxilamino reductase	CT	0,0159	0,0032	0,0081	0,9728	no
	<i>z0851</i>	z0851		desconocida	0,0101	0,0015	0,0041	0,9843	no
	<i>z2259</i>	z2259		desconocida	0,3445	0,2332	0,0551	0,3672	no
	<i>z2261</i>	z2261		desconocida	0,2154	0,0855	0,1212	0,5779	no
	<i>z5485</i>	z5485		desconocida	0,2207	0,0934	0,1194	0,5665	no
	<i>z5487</i>	z5487		desconocida	0,0566	0,0014	0,0059	0,9361	no
	<i>aceA</i>	z5601	Isocitrate lyase	CT	0,0069	0,0034	0,0034	0,986	no
	<i>aceB</i>	z5600	malate synthase A	CT	0,0028	0,0011	0,0003	0,9959	no
	<i>aceE</i>	z0124	Pyruvate dehydrogenase E1 component	CT	0,0454	0,076	0,0002	0,874	no
	<i>agp</i>	z1421	Glucose-1-phosphatase	PE	0,9979	0,0003	0,0016	0,0003	sí
	<i>argS</i>	z2929	Arginine--tRNA ligase	CT	0,0735	0,024	0,0157	0,8868	no
	<i>argT</i>	z3572	lysine-, arginine-, ornithine-binding periplasmic protein	PE	0,9964	0,0006	0,0027	0,0003	no
	<i>artI</i>	z1093	arginine 3rd transport system periplasmic binding protein	PE	0,9873	0,0008	0,0107	0,0012	no
	<i>aspS</i>	z2919	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase	CT	0,0068	0,0033	0,0068	0,983	no
	<i>astD</i>	z2778	putative aldehyde dehydrogenase	CT	0,0121	0,002	0,0037	0,9825	no
	<i>atpA</i>	z5232	ATP synthase subunit alpha	CT	0,0061	0,002	0,0007	0,9912	no
	<i>bglA</i>	z4239	6-phospho-beta-glucosidase BglA	CT	0,312	0,0545	0,0328	0,5995	no
	<i>cadA</i>	z5734	Inducible lysine decarboxylase	CT	0,0021	0,0001	0,0002	0,9976	no
	<i>cysK</i>	z6380	cysteine synthase A, O-acetylserine sulfhydrylase A	CT	0,0064	0,0013	0,0018	0,994	no
	<i>cysP</i>	z3690	Thiosulfate-binding protein	PE	0,9887	0,0009	0,0085	0,0019	no
	<i>dadX</i>	Z1953	alanine racemase 2, catabolic	CT	0,0141	0,0036	0,0013	0,9811	no
	<i>dcp</i>	z2160	Dipeptidyl carboxypeptidase	CT	0,0108	0,0008	0,0014	0,987	si
	<i>fabA</i>	Z1304	beta-hydroxydecanoyl thioester dehydrase, trans-2-decenoyl-ACP isomerase	CT	0,0124	0,004	0,0037	0,9799	no
	<i>fliD</i>	Z3014	flagellar biosynthesis; filament capping protein; enables filament assembly	EX	0,0346	0,0351	0,0081	0,9222	no
	<i>fumB</i>	z5724	Fumarate hydratase class I, anaerobic	CT	0,0034	0,0009	0,0005	0,9952	no

<i>gabD</i>	Z3959	succinate-semialdehyde dehydrogenase, NADP-dependent activity	CT	0,0346	0,0351	0,0081	0,9222	no
<i>galM</i>	z0926	Aldose 1-epimerase	PE	0,0126	0,0353	0,0017	0,9505	no
<i>gldA</i>	z5500	Glycerol dehydrogenase	CT	0,0084	0,0004	0,0009	0,9903	no
<i>glnH</i>	Z1033	periplasmic glutamine-binding protein; permease	PE	0,9919	0,0015	0,0046	0,0021	no
<i>glnS</i>	Z0827	glutamine tRNA synthetase	CT	0,0143	0,001	0,0016	0,9831	no
<i>gltA</i>	z0873	Glutamate synthase [NADPH] large chain	CT	0,0041	0,0028	0,0006	0,9925	sí
<i>gltX</i>	z3665	Glutamate--tRNA ligase	CT	0,014	0,0017	0,0068	0,9775	si
<i>gor</i>	Z4900	glutathione oxidoreductase	CT	0,1126	0,0155	0,0152	0,8567	no
<i>hemL</i>	z0165	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	CT	0,0357	0,038	0,0018	0,9246	no
<i>hisC</i>	z3183	Histidinol-phosphate aminotransferase	CT	0,0138	0,0039	0,0022	0,9801	no
<i>htrA</i>	Z0173	periplasmic serine protease Do; heat shock protein HtrA	PE	0,9954	0,0022	0,0021	0,0003	no
<i>ilvC</i>	Z5285	ketol-acid reductoisomerase	CT	0,0431	0,0017	0,0019	0,9533	no
<i>KatE</i>	Z2761	catalase; hydroperoxidase HPII(III)	CT	0,0175	0,0162	0,0043	0,9621	no
<i>KatG</i>	z5497	Catalase-peroxidase	CT	0,0121	0,0022	0,0038	0,982	no
<i>KatN</i>	z1921	Catalase-peroxidase	CT	0,0047	0,0005	0,0007	0,9941	no
<i>kbl</i>	z5044	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	CT	0,0158	0,0086	0,0012	0,9744	no
<i>lolA</i>	z1237	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	PE	0,998	0,0004	0,0012	0,0004	sí
<i>manA</i>	z2616	Mannose-6-phosphate isomerase	PE	0,0313	0,0029	0,0074	0,9854	no
<i>manB</i>	Z3194	phosphomannomutase	CT	0,0089	0,0003	0,0005	0,9903	no
<i>mtld</i>	Z5024	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	CT	0,0611	0,0071	0,002	0,9298	no
<i>oppA</i>	Z2019	oligopeptide transport; periplasmic binding protein	PE	0,9706	0,0241	0,0034	0,0019	sí
<i>pepA</i>	Z5872	aminopeptidase A/I	CT	0,0067	0,0006	0,0013	0,9914	no
<i>pnp</i>	z4525	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	CT	0,0151	0,012	0,0022	0,9707	sí
<i>ppiA</i>	Z4724	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (rotamase A)	PE	0,9928	0,0047	0,0019	0,0006	no

<i>purB</i>	z1860	Adenylosuccinate lyase	CT	0,0055	0,0032	0,0006	0,9907	no
<i>purD</i>	Z5582	phosphoribosylglycinamide synthetase = GAR synthetase	CT	0,0293	0,0041	0,004	0,9626	no
<i>purH</i>	Z5583	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase = AICAR formyltransferase; IMP cyclohydrolase	CT	0,0394	0,0988	0,0064	0,8554	no
<i>purL</i>	Z3835	phosphoribosylformyl-glycineamide synthetase = FGAM synthetase	CT	0,0061	0,0021	0,0009	0,991	no
<i>pyrC</i>	Z1699	dihydro-orotase	CT	0,0064	0,0018	0,0017	0,9901	no
<i>rfaD</i>	z5046	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	CT	0,1457	0,0006	0,0024	0,8514	no
<i>rplP</i>	z4684	Large ribosomal subunit protein uL16	CT	0,0107	0,157	0,0052	0,8313	no
<i>rpoC</i>	z5561	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	CT	0,0051	0,0041	0,0009	0,99	no
<i>serA</i>	Z4251	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	CT	0,003	0,0003	0,0004	0,9963	no
<i>stx2B</i>	Z1465	shiga-like toxin II B subunit encoded by bacteriophage BP-933W	PE	0,9707	0,0006	0,0271	0,0016	no
<i>sucD</i>	z0883	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	CT	0,0242	0,0064	0,0021	0,9674	no
<i>talA</i>	Z3720	transaldolase A	CT	0,0083	0,0011	0,001	0,9895	no
<i>talB</i>	Z0008	transaldolase B	CT	0,0061	0,0007	0,0014	0,9918	no
<i>tig</i>	Z0541	trigger factor; a molecular chaperone involved in cell division	CT	0,0097	0,0019	0,0021	0,9863	no
<i>topA</i>	Z2536	DNA topoisomerase type I, omega protein	CT	0,0246	0,0017	0,0018	0,9719	no
<i>tktB</i>	Z3721	transketolase 2 isozyme	CT	0,0272	0,0047	0,0027	0,9654	no
<i>tyrB</i>	z5652	Aromatic-amino-acid aminotransferase	CT	0,0039	0,0009	0,0007	0,9946	no
<i>ugpB</i>	z4822	sn-glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein UgpB	PE	0,9969	0,0005	0,0018	0,0007	sí
<i>ushA</i>	z0599	Protein UshA	PE	0,9965	0,001	0,0019	0,0016	sí
<i>uvrA</i>	z5657	Excinuclease ABC subunit A	CT	0,0191	0,0193	0,033	0,9583	no
<i>yaiA</i>	Z0485	orf, hypothetical protein	desconocida	0,0131	0,0009	0,0029	0,9832	no
<i>ybeJ</i>	Z0805	putative periplasmic binding transport protein	PE	0,9923	0,0021	0,0046	0,001	no

	<i>ybeL</i>	z0790	Uncharacterized protein YbeL	CT	0,0054	0,0014	0,0007	0,9925	no
	<i>yccJ</i>	z1422	Uncharacterized protein YccJ	desconocida	-	-	-	-	no
	<i>yedU</i>	Z3059	hypothetical protein Z3059	CT	0,0092	0,0023	0,0016	0,9869	no
	<i>yeiP</i>	Z3430	putative elongation factor	CT	0,0654	0,0081	0,0136	0,9129	no
	<i>yncB</i>	Z2270	putative oxidoreductase	CT	0,0103	0,0038	0,0016	0,9842	no
	<i>yqhE</i>	Z4365	putative enzyme	CT	0,0043	0,0003	0,001	0,9943	no
	<i>zwf</i>	z2904	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	CT	0,0062	0,0017	0,0014	0,9908	no

13 Material suplementario capítulo 2

13.1 Control de calidad de muestras de RNA para secuenciar de EHEC O157:H7 fagocitada y expuesta a estrés *in vitro*

Dado que la secuenciación de RNA a través de la tecnología de Illumina NextSeq demanda la obtención de RNA de alta calidad y en cantidades apropiadas para garantizar una cobertura significativa en las lecturas (reads), y, por ende, asegurar una representación precisa de los distintos RNA mensajeros expresados, resultó esencial llevar a cabo una evaluación exhaustiva de las muestras antes de proceder con la secuenciación.

Una primera evaluación para determinar la calidad de las muestras fue una corrida electroforética capilar para observar la presencia de las bandas correspondientes a los ARN ribosomales totales 28, 23, 18 y 16s (Figura suplementaria 1 A). Puede observarse que las muestras de RNA derivadas de la fagocitosis de EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada presentan RNA ribosomal eucariota (28 y 18s) y de manera más tenue se aprecian las bandas ribosomales 23 y 16 s procariotas. Si bien las muestras pasaron por un proceso de enriquecimiento de RNA bacteriano, una parte significativa del RNA ribosomal del macrófago se filtró inadvertidamente (Figura suplementaria 1 A). En el caso del RNA obtenido de EHEC O157:H7 EDL933 expuesta a estrés posee exclusivamente el RNA bacteriano (23 y 16s) al igual que los controles EHEC O157:H7 EDL933 crecidos en los medios correspondientes (DMEM y M9), se observa que el RNA es puramente procariota con sus dos bandas distintivas 23 y 16s (Figura suplementaria 1 A).

Mediante el uso de electroforesis capilar en el equipo Agilent 2100, se lograron obtener los electroferogramas de las muestras analizadas. La figura suplementaria 1B presenta un electroferograma representativo para todas las muestras, donde se visualiza la fluorescencia en relación con los tamaños en pares de bases (pb) del RNA analizado. En cada uno de ellos, son evidentes los dos picos distintivos correspondientes a los RNA

ribosomales. El equipo utilizado, el Agilent 2100, emplea la electroforesis capilar y la detección de fluorescencia, proporcionando una plataforma para registrar digitalmente la distribución de las moléculas de RNA en función de su tamaño. Esta metodología permite evaluar la integridad del RNA mediante un algoritmo específico. El algoritmo RIN (RNA Integrity Number) calcula la fracción del área en la región del rRNA (28 y 18s) y la compara con el área total bajo la curva, reflejando la proporción de moléculas largas frente a las de menor tamaño. En función de esta relación, asigna un valor de RIN de 1 a 10, donde un RIN mayor a 7 se considera indicativo de una muestra de RNA de calidad óptima. Para todas las muestras el valor promedio de RIN fue superior a 7 (Tabla suplementaria 4).

13.1.1 Eliminación de RNA ribosomales

A partir del RNA obtenido, se llevó a cabo la eliminación de los RNAr (RNA ribosomal) debido a su potencial interferencia con el proceso de secuenciación Illumina. En la Figura suplementaria 1C, se presenta de manera representativa para todas las muestras la notable desaparición de los picos correspondientes a los RNAr después del tratamiento con Ribozero. Este resultado evidencia de manera efectiva la eficacia del procedimiento aplicado para eliminar selectivamente los RNAr y así mejorar la calidad y la precisión de los datos de secuenciación. De esta manera se procedió a la construcción de la biblioteca de cDNA.

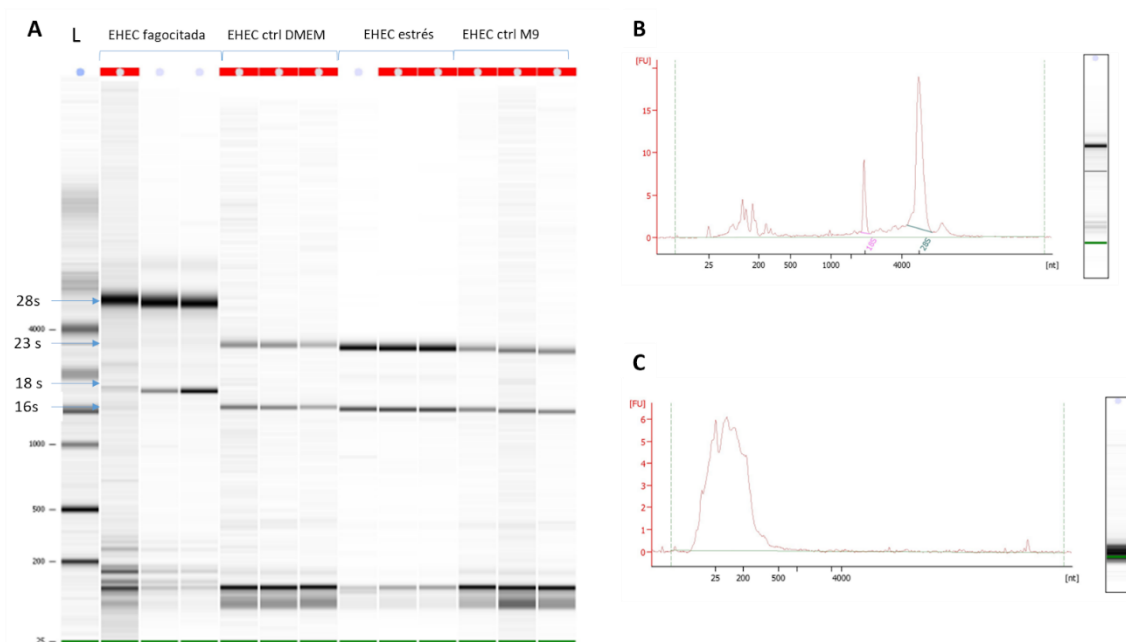


Tabla suplementaria 1. Cuantificación de las muestras de RNA obtenido para las distintas condiciones mediante electroforesis capilar con Agilent 2100. Concentración de RNA en ng/ul y valor de RIN (RNA integrity number). n/a: no asignado

	EHEC fagocitada			EHEC ctrl DMEM			EHEC vs estrés			EHEC ctrl M9		
Réplicas	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
[RNA]ng/ul	152	443	704	62	141	105	399	584	469	140	84	215
RIN	8	8.90	9.20	8	n/a	n/a	9.70	9	8.2	7	7.1	7.5

13.1.2 Construcción de bibliotecas de cDNA

Las bibliotecas de cDNA se construyeron siguiendo el protocolo TruSeq de Illumina single-end. Antes de proceder a la secuenciación, se llevó a cabo un riguroso control de calidad mediante electroforesis capilar. En la Figura suplementaria 2 A, se aprecia

claramente que las bibliotecas de cDNA exhiben el tamaño esperado de aproximadamente 300 pares de bases (pb). Este hallazgo se confirma de manera consistente en el electroferograma, representado de manera significativa para todas las muestras, donde se evidencia un pico distintivo en 300 pb (Figura suplementaria 2 B).

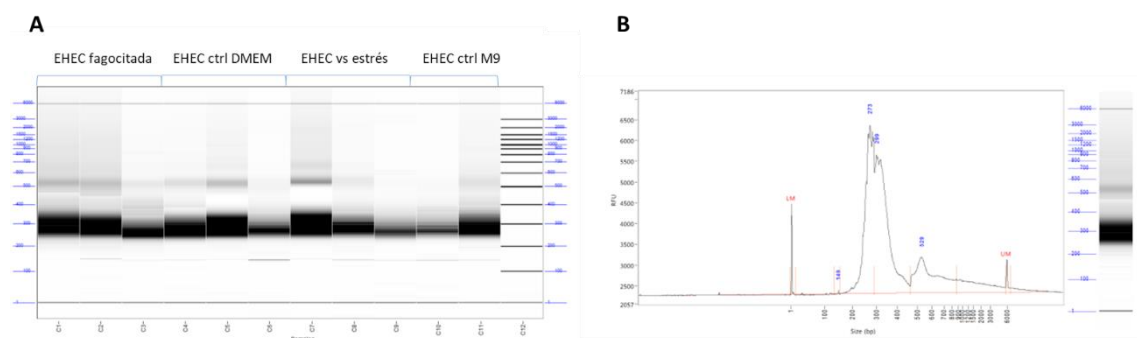


Figura suplementaria 2. Control de calidad de la biblioteca de cDNA mediante electroforesis capilar Agilent 2100.

A) Representación de la corrida electroforética de las bibliotecas de todas las muestras. **B)** electroferograma representativo de todas las muestras obtenido por electroforesis capilar.

13.2 Clonado y expresión de proteínas para ensayos de secreción

En la etapa inicial del doctorado se seleccionaron algunos genes candidatos a efectores con la finalidad de clonarlos, expresarlos y evaluar si pueden ser secretados por el SST6-2 de EHEC O157:H7. Entre ellos *hcaE* (Z3809) que, aunque no se encuentre en el listado de candidatos a efectores diferencialmente expresados, fue considerado como una primera aproximación por su homología con el efector TecA de *Burkholderia*. Además, se seleccionó el gen *hcp-2* (Z0266) con el fin de clonarlo y expresarlo para tener un control positivo de secreción.

Inicialmente, estos genes fueron clonados en el plásmido pTrcB-His Amp^r, el cual es inducible por IPTG, y luego transformados en la cepa *E. coli* DH5- α . La expresión de las proteínas Hcp-2 y HcaE fue evaluada a partir de pellet bacteriano mediante *Western Blot* (Figura suplementaria 3 A). Se observó que la presencia de IPTG indujo la expresión

de las proteínas Hcp-2 y Hcae, y las bandas de las proteínas mostraron un peso molecular esperado para cada una de ellas (Figura suplementaria 3 A). Sin embargo, no se observó expresión en EHEC O157:H7 EDL933 luego de ser transformadas con ambas construcciones (Figura suplementaria 3 B). Se volvieron a clonar sus secuencias en los plásmidos pBAD18 y pSEVA, y sin embargo tampoco se pudo observar expresión de Hcp-2 y Hcae en EHEC O157:H7.

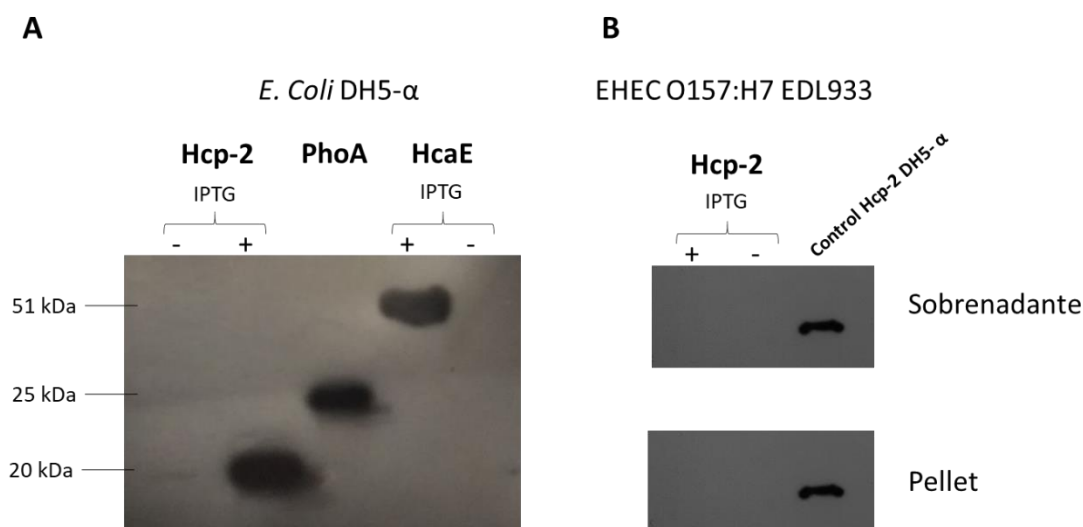


Figura suplementaria 3. Análisis de la expresión de las proteínas Hcp-2 y HcaE de EHEC O157:H7 EDL933. Tanto el gen *hcp-2* como *hcae* fueron clonados en el plásmido pTrc, por separado. **A)** Se llevó a cabo el análisis de la expresión de Hcp-2 y HcaE a partir de un pellet bacteriano de DH5-α pTrc-efector-His. La expresión fue inducida mediante IPTG y luego se detectó utilizando un anticuerpo primario anti-His, seguido de la revelación con un anticuerpo secundario que tiene actividad peroxidasa. La detección se visualizó en una placa fotográfica. Se utilizó la proteína PhoA como control positivo. **B)** Se evaluó la expresión de pTrc-Hcp-2 en la cepa EHEC O157:H7 EDL933 a partir del pellet bacteriano y del sobrenadante. La detección se realizó utilizando la proteína Hcp-2 purificada de *E. coli* DH5-α como control de revelado.

La ausencia de un sistema de expresión que funcionase en EHEC O157:H7 EDL933 impidió la caracterización molecular de los candidatos a efectores.

Tabla suplementaria 2. Efectores reportados por Wan y colaboradores y su expresión diferencial en EHEC O157:H7 EDL933 fagocitada y expuesta a estrés

Genes	Locus tag	Función	EHEC fagocitada		EHEC en estrés	
			log ₂ FC	p-value	log ₂ FC	p-value
<i>aceA</i>	z5601	Isocitrate lyase	2,51	4,35E-15	-4,66	7,50E-119
<i>aceB</i>	z5600	Malate synthase A	1,57	5,19E-08	-5,20	6,89E-66
<i>aceE</i>	z0124	Pyruvate dehydrogenase E1 component	0,17	2,35E-01	4,96	1,56E-282
<i>agp</i>	z1421	Glucose-1-phosphatase	-0,13	6,84E-01	4,04	1,06E-08
<i>argS</i>	z2929	Arginine--tRNA ligase	1,02	3,70E-06	0,62	2,16E-05
<i>argT</i>	z3572	Lysine/arginine/ornithine-binding periplasmic protein	0,76	2,88E-02	-1,87	2,93E-84
<i>aspS</i>	z2919	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase	1,43	6,09E-19	2,53	3,24E-87
<i>astD</i>	z2778	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	1,26	2,70E-01	-1,69	7,27E-07
<i>atpA</i>	z5232	ATP synthase subunit alpha	0,29	1,10E-01	1,69	1,81E-27
<i>bglA</i>	z4239	6-phospho-beta-glucosidase BglA	2,05	3,84E-24	1,97	6,96E-24
<i>cadA</i>	z5734	Inducible lysine decarboxylase	-2,53	6,83E-06	4,83	2,53E-35
<i>cysP</i>	z3690	Thiosulfate-binding protein	1,78	1,64E-02	-1,90	1,67E-05
<i>dadX</i>	z1953	Alanine racemase, catabolic	-0,04	9,41E-01	-1,35	1,50E-29
<i>dcp</i>	z2160	Dipeptidyl carboxypeptidase	-1,46	7,49E-03	1,78	8,13E-08
<i>fumB</i>	z5724	Fumarate hydratase class I, anaerobic	-0,70	8,19E-01	3,07	2,20E-232
<i>gabD</i>	z3959	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)] GabD	1,01	5,70E-01	0,98	1,30E-01
<i>galM</i>	z0926	Aldose 1-epimerase	-1,53	6,57E-06	1,66	3,33E-232
<i>gldA</i>	z5500	Glycerol dehydrogenase	-0,73	1,10E-01	2,77	5,97E-57
<i>glnH</i>	z1033	Glutamine-binding periplasmic protein	-0,60	4,46E-04	-1,26	1,85E-47
<i>gltA</i>	z0873	Glutamate synthase [NADPH] large chain	2,52	1,66E-66	1,65	1,66E-84
<i>gltX</i>	z3665	Glutamate--tRNA ligase	-0,44	4,97E-02	1,38	4,47E-18
<i>hemL</i>	z0165	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	1,97	3,15E-29	0,36	1,15E-02
<i>hisC</i>	z3183	Histidinol-phosphate aminotransferase	0,50	2,31E-01	2,64	1,56E-23

<i>KatG</i>	z5497	Catalase-peroxidase	0,59	2,47E-05	3,37	6,27E-143
<i>kbl</i>	z5044	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	1,88	1,35E-16	1,02	4,74E-87
<i>lolA</i>	z1237	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	-2,01	2,83E-08	2,18	2,62E-18
<i>manA</i>	z2616	Mannose-6-phosphate isomerase	-1,61	6,80E-05	1,17	0,00E+00
<i>mtlD</i>	z5024	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	-1,12	3,89E-01	-2,21	1,33E-15
<i>oppA</i>	z2019	Periplasmic oligopeptide-binding protein	-2,29	5,43E-31	-0,87	6,08E-21
<i>pnp</i>	z4525	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	1,05	8,00E-30	1,59	7,99E-25
<i>purB</i>	z1860	Adenylosuccinate lyase	-1,24	8,24E-05	1,38	1,84E-22
<i>rfaD</i>	z5046	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	0,10	6,59E-01	2,09	1,83E-52
<i>rplP</i>	z4684	Large ribosomal subunit protein uL16	2,43	1,73E-66	1,69	1,39E-36
<i>rpoC</i>	z5561	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	0,50	5,63E-04	2,14	3,20E-42
<i>serA</i>	z4251	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-1,86	1,82E-30	-1,20	3,27E-18
<i>sucD</i>	z0883	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	0,31	2,04E-01	2,49	1,08E-77
<i>tyrB</i>	z5652	Aromatic-amino-acid aminotransferase	-1,45	6,12E-04	1,48	6,58E-16
<i>ugpB</i>	z4822	sn-glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein UgpB	3,26	3,14E-15	-0,60	1,23E-04
<i>ushA</i>	z0599	Protein UshA	-0,65	9,14E-02	3,10	1,67E-127
<i>uvrA</i>	z5657	Excinuclease ABC subunit A	3,39	9,98E-179	3,90	1,05E-48
<i>yaiA</i>	z0485	Uncharacterized protein YaiA	-2,02	1,23E-02	-1,41	1,60E-12
<i>ybeL</i>	z0790	Uncharacterized protein YbeL	-1,10	1,02E-02	1,45	0,00E+00
<i>yccJ</i>	z1422	Uncharacterized protein YccJ	-2,77	4,04E-03	3,97	7,04E-96
<i>zwf</i>	z2904	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	-0,74	3,15E-02	1,94	1,60E-15

14 Material suplementario capítulo 3.

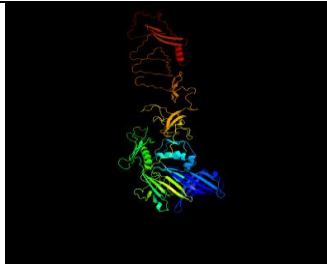
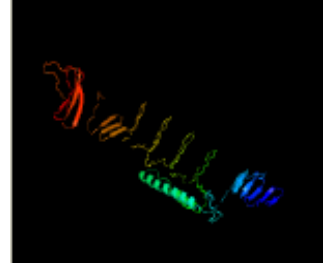
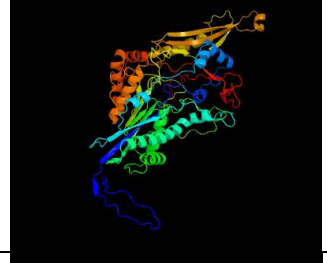
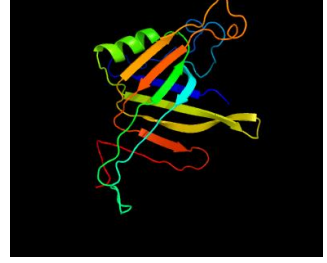
14.1 Tabla suplementaria 1

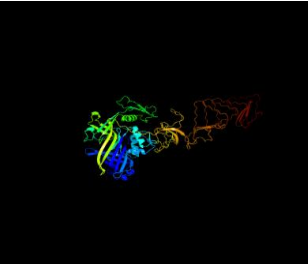
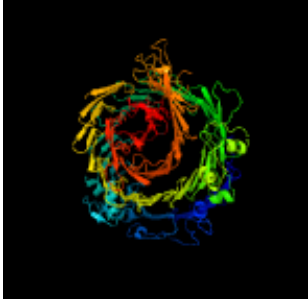

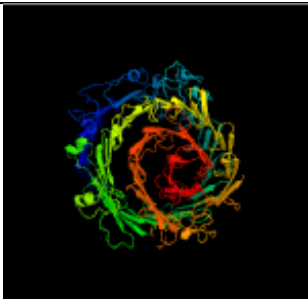
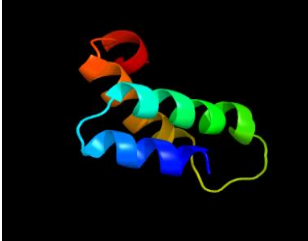
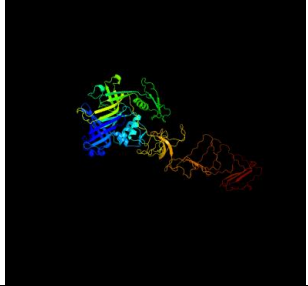
Tabla suplementaria 1. Potenciales efectores de STEC O22:H8 con la predicción de dominios catalíticos (pfam y Batch web CD-search tool) y un score de probabilidad de efector del SST6 (Bastion 6)				
Proteína	Locus Tag	Pfam (evalue)	Batch web CD-search tool (evalue)	Bastion6
VrgG	Ec154_00120	Phage_GPD:5.1e-60	vgr_GE superfamily: 6.5e-103	0.891
		DUF2345:4.5e-48	DUF2345:1.6e-55	
		T6SS_Vgr:1.9e-34	T6SS_Vgr:6.4e-44	
Tle1	Ec154_00121	DUF2235:1.3e-09	DUF2235:1.5e-15	0.824
Tli1	Ec154_00122	DUF2931:2.1e-42	DUF2931:2.6e-42	0.789
		LPAM_1:4.1e-2		
Hcp	Ec154_04254	T6SS_HCP:4.9e-31	VI_effect_Hcp1: 1.e-83	1
VgrG	Ec154_04253	Phage_GPD: 2.4e-72		0.912
Rhs	Ec154_04252	RHS_repeat: 5.6e-05/ 5.6e-09	RHS_repeat: 1e-05	0.947
		RHS: 6.9e-13		
			RhsA:7.9e-150	
			PAAR_like superfamily:5.2e-06	
Hypothetical protein	Ec154_04251	Lip_prot_lig_C:2e-2		0.159
Rhs	Ec154_04245	RHS_repeat: 4.9e-05/ 3.7e-09		0.947
		RHS: 5.0e-13		
			RhsA: 3.4e-149	
			PAAR_like superfamily: 1.8e-05	
Hypothetical protein	Ec154_04244	TPR_1:1.9e-1		0.260
VgrG	Ec154_03857	Phage_GPD: 2.4e-72		0.893
		Gp5_C:1.2e-2		
		Phage_base_V:1.9e-1	VI_Rhs_Vgr:0	
DcrB/DUF1795	Ec154_03858	DcrB: 5.7e-24	COG5435:8.e-61	0.513
Rhs	Ec154_03859	RHS_repeat:1.9e-05/ 2.2e-07		0.926
		PAAR_motif: 1.3e-08	PAAR_RHS:3.6e-23	


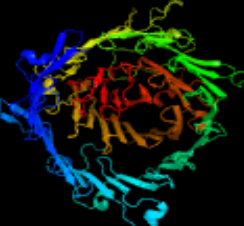

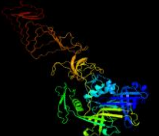

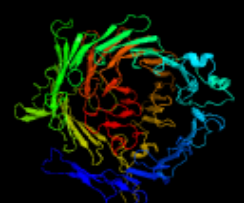
		MafB19-deam: 3.8e-15	MafB19-deam:2.4e-12	
			RhsA:1.7e-97	
Hypothetical protein	Ec154_03860	Imm1:1.1e-3		0.695
Rhs	Ec154_03862	RHS_repeat: 4.4e-05/ 4.5e-07	RHS_repeat:1.1e-3	0.950
		PAAR_motif: 7.8e-09	PAAR_RHS: 8.5e-25	
		RHS:4.3e-2		
		AHH: 6.7e-13	AHH:9.1e-14	
			YD_repeat_2x:2.4e-06	
			RhsA: 6e-82	
Hypothetical protein	Ec154_03863			0.417
Rhs	Ec154_03866	RHS_repeat:300/5e-3		0.884
		RHS:5.5e-3		
		Tox-MPTase4:1.0e-32		
			RhsA:9.8e-42	
hypothetical protein	Ec154_03867			0.268
VgrG	Ec154_02831	Phage_GPD:3.8e-72		0.905
		Phage_base_V:2e-1		
		Gp5_C:3.3e-2		
			VI_Rhs_Vgr:0	
Rhs	Ec154_02830	RHS_repeat: 5.4e-05/ 4.9e-10		0.946
		RHS: 6e-16		
		PAAR_motif:5.8	PAAR_like superfamily: 7e-08	
			RhsA: 1.9e-155	
hp/Rhs	Ec154_02829	DUF3887:3.7e-4		0.412
		DUF4019:2.7e-3		
Rhs	Ec154_02824	RHS_repeat: 8.6e-05/ 1e-08		0.956
		Peptidase_M91:4e-2		
			RhsA:2.8e-143	
hypothetical protein	Ec154_02823			0.235
		RHS_repeat:5.2e-05/ 2.5e-08		

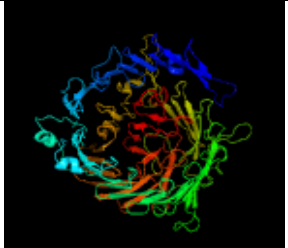
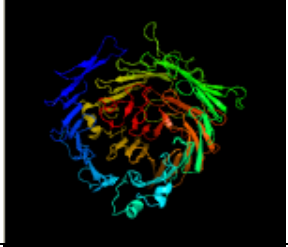
Rhs	Ec154_00215			0.962
		RHS:2.5e-14		
		DUF4329:1.8e-35		
			PAAR_like superfamily: 7.6e-08	
			RhsA: 1.3e-171	
YhhH	Ec154_00214	Imm-NTF2-2:2.1e-23	Imm-NTF2-2:1.5e-24	0.198
Rhs	Ec154_03912	RHS_repeat:5.5e-05/ 1.9e-10		0.954
		RHS:5.2e-15		
		DUF4329:9.4e-33		
		PAAR_motif:1.4e-1	PAAR_like superfamily:6.9e-08	
			RhsA: 7e-156	
YbbC/YhhH	Ec154_03911	Imm-NTF2-2: 1.3e-22	Imm-NTF2-2: 5.2e-26	
Rhs	Ec154_05172	RHS_repeat: 5.2e-05/ 8.9e-08		0.963
		RHS: 2.4e-14		
		DUF4329: 1.4e-15		
			PAAR_like superfamily:7.5e-08	
			RhsA:2.4e-170	
hypothetical protein	Ec154_05171	Potential T6SS effector		0.507
Hcp1	Ec154_00381	T6SS_HCP: 1e-10	Hcp:7.5e-47	0.821
		Colicin-DNase: 7e-05	HNHc superfamily:4.2e-3	

14.2 Tabla suplementaria 2

Tabla Suplmentaria 2. Predicción de estructura tridimensional (HHPred) y modelado molecular de potenciales efectores de STEC O22:H8 (PHYRE 2)				
Locus Tag	Proteína	HHPred (Probability; evalue)	PHYRE2 molecular modeling (% confidence; % i.d.)	
Ec154_00120	VrgG	P: 100 Evalue: 8.1e-59 vrgg1, valine-glycine repeat protein g1; structural protein, vrgg1, virulence, toxin; (<i>Escherichia coli</i>)	C: 100% i.d.: 98% PDB header: hydrolase Chain: C: PDB Molecule: putative type vi secretion protein; PDB Title: structure of the tle1 effector bound to the vrgg spike from the type 62 secretion system	
			C: 69.9% i.d.: 100% PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: putative type vi secretion protein; PDB Title: the tle hydrolase bound to the ttr domain of the vrgg spike of the2 type 6 secretion system	Not modelled
			C: 100% i.d.: 98% PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: putative type vi secretion protein; PDB Title: the tle hydrolase bound to the ttr domain of the vrgg spike of the2 type 6 secretion system	
Ec154_00121	Tle1	P: 100 Evalue: 6.2e-93 Putative type VI secretion protein; Hydrolase, toxin, lipase, effector, bacterial; (<i>Escherichia coli</i>)	C: 100% i.d.: 93% PDB header: hydrolase Chain: F: PDB Molecule: putative type vi secretion protein; PDB Title: the tle hydrolase bound to the ttr domain of the vrgg spike of the2 type 6 secretion system	
Ec154_04254	Hcp	P: 100 Evalue: 2.9e-33 Major exported Hcp3 protein; structural genomics, APC22128, Hcp3, HcpC; HET: GOL, MSE; 2.098A (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	C: 100% i.d.: 99% PDB header: transport protein Chain: 1: PDB Molecule: haemolysin co-regulated protein; PDB Title: atomic model of the vipa/vipb/hcp, the type six secretion system non-2 contractile sheath-tube of vibrio cholerae from cryo-em	

Ec154_04253	VgrG	P: 100 Evalue: 1.3e-64 vgrg1, valine-glycine repeat protein g1; structural protein, vgrg1, virulence, toxin; (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	C: 100% i.d.: 84% PDB header: toxin Chain: D: PDB Molecule: vgrg1; PDB Title: crystal structure of pa0091 vgrg1, the central spike of the type vi2 secretion system	
Ec154_04252	Rhs	P: 100 Evalue: 2.8e-45 TcdA1, TcdB2, TccC3; Complex, Holotoxin, Photorhabdus, Insecticidal, TOXIN; 3.4A (<i>Photorhabdus luminescens</i>)	C: 100 % i.d.: 17 PDB header: toxin Chain: A: PDB Molecule: tcdB2, tccc3; PDB Title: crystal structure of tcdB2-tccc3	
Ec154_04251	Hypothetical protein	-----	C: 16.7 % i.d.: 32 PDB header: hydrolase Chain: A: PDB Molecule: sel1 repeat protein; PDB Title: crystal structure of sel1 repeat protein from <i>oxalobacter formigenes</i>	
Ec154_04245	Rhs	P: 100 Evalue: 6.4e-48 protein; toxins, tc toxins, toxin; 2.0A (<i>Photorhabdus luminescens</i>); Related PDB entries: 4O9X_A 6H6G_A	C: 100 % i.d.: 16 PDB header: toxin Chain: A: PDB Molecule: tcdB2, tccc3; PDB Title: crystal structure of tcdB2-tccc3	
Ec154_04244	Hypothetical protein	P: 99.13 Evalue: 1.2e-9 ybgf; tetratricopeptide, alpha-helical, metal binding; 1.57a (<i>Xanthomonas campestris</i>); related pdb entries: 2xeV_c 2xeV_	C: 81.2% i.d.: 44% Fold: alpha-alpha superhelix Superfamily: TPR-like Family: Tetratricopeptide repeat (TPR)	
Ec154_03857	VgrG	P: 100 Evalue: 9.2e-64 vgrg1, valine-glycine repeat protein g1; structural protein, vgrg1, virulence, toxin; (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	C: 100% i.d.: 95% PDB header: toxin Chain: D: PDB Molecule: vgrg1; PDB Title: crystal structure of pa0091 vgrg1, the central spike of the type vi2 secretion system	

Ec154_03859	Rhs	P: 100 Evalue: 1e-53 Teneurin-2; TTR, fi- bronectin, FN-plug, NHL, YD-repeat; HET: NAG, BMA, MAN; 2.38A (<i>Gallus gallus</i>)	C: 100% i.d.: 16% PDB header: toxin Chain: B: PDB Molecule: rhs2; PDB Title: yenb/rhs2 com- plex	
Ec154_03862	Rhs	P: 100 Evalue: 1.8e-55 Teneurin-2; TTR, fi- bronectin, FN-plug, NHL, YD-repeat; HET: NAG, BMA, MAN; 2.38A (<i>Gallus gallus</i>)	C: 100% i.d.: 16% PDB header: toxin Chain: B: PDB Molecule: rhs2; PDB Title: yenb/rhs2 com- plex	
Ec154_03866	Rhs	P: 100 Evalue: 4.5e-31 Teneurin-2; TTR, fi- bronectin, FN-plug, NHL, YD-repeat; HET: NAG, BMA, MAN; 2.38A (<i>Gallus gallus</i>)	C: 100% i.d.: 21% PDB header: toxin Chain: B: PDB Molecule: rhs2; PDB Title: yenb/rhs2 complex	
Ec154_02831	VgrG	P: 100 Evalue: 2.7e-64 vgrg1, valine-glycine re- peat protein g1; struc- tural protein, vgrg1, vir- ulence, toxin; het: mse, na, cl; 2.0a (<i>pseudomona aeruginosa</i>)	C: 100% i.d.: 85% PDB header: toxin Chain: D: PDB Mole- cule:vgrg1; PDB Title: crystal struc- ture of pa0091 vgrg1, the central spike of the type vi2 secretion system	
Ec154_02830	Rhs	P: 76.72 Evalue: 18 Hydrophilic protein; sal- monella effector, SpvB, ADP-ribosyltransferase, (<i>Salmonella</i>)	C: 15.2% i.d.: 34% Fold: ADP-ribosylation Superfamily: ADP-ribosyl- ation Family: ADP-ribosylating toxins	Not modelled
Ec154_02824	Rhs	P: 100 Evalue: 1.3e-50 Teneurin-2; TTR, fi- bronectin, FN-plug, NHL, YD-repeat; (<i>Gal- lus gallus</i>)	C: 100% i.d.: 18% PDB header: toxin Chain: B: PDB Molecule: rhs2; PDB Title: yenb/rhs2 complex	
Ec154_00215	Rhs	P: 100 Evalue: 1.7e-52 Teneurin-2; TTR, fi- bronectin, FN-plug, NHL, YD-repeat (<i>Gallus gallus</i>)	C: 100% i.d.: 20% PDB header: toxin Chain: B: PDB Molecule: rhs2; PDB Title: yenb/rhs2 complex	

Ec154_03912	Rhs	P: 100 Evalue: 1.7e-50 Teneurin-2; TTR, fibronectin, FN-plug, NHL, YD-repeat (Gallus gallus)	C: 100% i.d.: 19% PDB header: toxin Chain: B: PDB Molecule: rhs2; PDB Title: yenb/rhs2 complex	
Ec154_05172	Rhs	P: 100 Evalue: 2.4e-52 Teneurin-2; TTR, fibronectin, FN-plug, NHL, YD-repeat (Gallus gallus)	C: 100% i.d.: 19% PDB header: toxin Chain: B: PDB Molecule: rhs2; PDB Title: yenb/rhs2 complex	
Ec154_00381	Hcp1	P: 99.93 Evalue: 2.2e-8 Hcp1; Type VI secretion, Haemolysin coregulated; HET: MSE; 2.496A (Flavobacterium johnsoniae strain ATCC 17061/ DSM 20)	C: 97.7% i.d.: 28% PDB header: immune system Chain: B: PDB Molecule: protein (colicin e7 immunity protein); PDB Title: the endonuclease domain of colicin e7 in complex with its inhibitor2 im7 protein	