

El receptor de aerobactina IutA, una proteína aislada en columna de agarosa, no es esencial para la infección por *Escherichia coli* uropatógena¹

Taise Natali Landgraf²

Alan Berlese³

Fabrizio Freitas Fernandes⁴

Mariani Lima Milanezi⁵

Roberto Martinez⁶

Ademilson Panunto-Castelo⁷

La falta de una clara comprensión de los mecanismos de participación de las lectinas en el proceso de colonización por *Escherichia coli*, nos motivó a identificar la presencia de otras lectinas que no han sido descritas en *Escherichia coli*. En este estudio, se aisló una proteína de 75kDa de *Escherichia coli* en una columna de Sepharosa, correspondiente al receptor de aerobactina (IutA). La asociación de IutA con cepas virulentas de *Escherichia coli* es controvertido, especialmente en *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), lo que nos llevó a evaluar la presencia del gen iutA en UPECs aisladas de pacientes con infección urinaria. El gen estaba presente en 38% de los aislamientos, lo que sugiere una débil asociación con la virulencia. Debido a la existencia de redundancia en los sistemas de captura de hierro, se sugiere que IutA puede ser una ventaja, sin embargo no es esencial para la UPEC.

Descriptores: *Escherichia coli* Uropatogénica; Sideróforos; Lectina; Virulencia.

¹ Apoyo financiero de la FAPESP, proceso nº 06/04482-6.

² Estudiante de maestría, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil. Becario de iniciación científica, FAPESP.

³ Estudiante de maestría, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil. Becario de maestría, FAPESP.

⁴ Estudiante de doctorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

⁵ Estudiante de maestría, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil. Becario de Entrenamiento Técnico, FAPESP.

⁶ Doctor, Profesor Asociado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

O receptor de aerobactina IutA, uma proteína isolada em coluna de agarose, não é essencial para a infecção por *Escherichia coli* uropatogênica

Apenas alguns relatos na literatura demonstram que lectinas são importantes nos processos de colonização e infecção por *Escherichia coli*. A falta de compreensão clara dos mecanismos envolvendo lectinas, no processo de colonização por *E. coli*, motivou a realização deste estudo para se identificar a presença de outras lectinas não descritas em *E. coli*. Neste trabalho, isolou-se uma proteína de 75kDa de *E. coli* em coluna de Sepharose, correspondente ao receptor de aerobactina férrica (IutA). A associação de IutA com virulência de cepas de *E. coli* é controversa, principalmente em *E. coli* uropatogênica (UPEC), o que levou a se avaliar a presença do gene *iutA* em UPECs isoladas de pacientes com infecção urinária. O gene estava presente em 38% dos isolados, sugerindo fraca associação com virulência. Devido à existência de redundância nos sistemas de captura de ferro, sugere-se, aqui, que IutA possa ser vantajosa, mas não essencial para UPEC.

Descritores: *Escherichia coli* Uropatogênica; Sideróforos; Ricina; Virulência.

The ferric aerobactin receptor IutA, a protein isolated on agarose column, is not essential for uropathogenic *Escherichia coli* infection

Although many proteins have been described involved in *Escherichia coli* colonization and infection, only few reports have shown lectins as important components in these processes. Because the mechanisms underlying *E. coli* colonization process involving lectins are not fully understood, we sought to identify the presence of other non-described lectins in *E. coli*. Here, we isolated a 75-kDa protein from *E. coli* on Sepharose column and identified it as ferric aerobactin receptor (IutA). Since IutA is controversially associated with virulence of some *E. coli* strains, mainly in uropathogenic *E. coli* (UPEC), we evaluated the presence of *iutA* gene in UPEC isolated from patients with urinary infection. This gene was present in only 38% of the isolates, suggesting a weak association with virulence. Because there is a redundancy in the

siderophore-mediated uptake systems, we suggest that IutA can be advantageous but not essential for UPEC.

Descriptors: Uropathogenic *Escherichia coli*; Siderophores; Lectin; Virulence.

organismo colonizado⁽²⁾. En bacterias gram-negativas, gran variedad de moléculas o estructuras pueden funcionar como adhesinas que promueven mejor adhesión al receptor de la célula epitelial⁽³⁾.

Escherichia coli es lo más abundante de todos los micro-organismos que colonizan el intestino de muchos animales. Excepto en acogedores inmunocomprometidos, o cuando las barreras gastrointestinales son rotas, esas bacterias raramente causan enfermedad. El papel de las adhesinas y lectinas en la simbiosis de *Escherichia coli* con el hospedero no es bien conocido, lo que contrasta con *Escherichia coli* patógenas que tienen algunas fimbrias asociadas a virulencia. Después del trabajo pionero⁽⁴⁾, que logró la primera evidencia de que *E. coli* contenía lectina,

Introducción

La microbiota intestinal de mamíferos incluye varias especies bacterianas⁽¹⁾ que, normalmente, establecen relación de mutualismo con el hospedero. El primer paso en el proceso de colonización de un hospedero es una relación entre el agente colonizador y el epitelio del

algunos autores demostraron que proteínas con propiedad lectínica, tales como las fimbrias tipo 1 y P, eran factores de virulencia determinantes para el proceso de colonización e infección, especialmente en el epitelio de la vejiga. La fimbria del tipo 1 es uno de los factores de virulencia de *E. coli* más estudiados, estando presente en un 80% de las cepas de UPECs⁽⁵⁾. Además de las fimbrias tipo 1 y P, fue descrito que la fimbria F17 es importante para la patogénesis de *E. coli* enterotoxigénica en rumiantes⁽⁶⁾.

Una vez que lectinas han sido descritas como importantes componentes en el proceso de colonización e infección por bacterias y que algunos de los mecanismos subyacentes a la virulencia de *E. coli* no son completamente comprendidos, se buscó, aquí, identificar otras lectinas no descritas como marcadores moleculares.

Marcadores moleculares de patógenos han sido útiles para acelerar el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas. En infecciones del trato urinario (ITU), estudios que usan métodos moleculares se mostraron esenciales para la comprensión de la epidemiología de esas infecciones, una vez que las tasas de ITUs son muy altas y gran número de organismos diferentes pueden ser los agentes etiológicos de esas infecciones. Además, cepas de *E. coli* son la causa más común de ITUs⁽⁷⁾, comprendiendo grupo extremadamente heterogéneo⁽⁸⁾. ITU es un problema de salud pública que necesita de tratamiento efectivo para la prevención⁽⁹⁾. Así, la comprensión de los principios que guían estudios sobre marcadores moleculares es esencial para enfermeros de todas las áreas de la práctica clínica, ya que esos profesionales son responsables por la planificación, evaluación e implementación de estrategias que llevan a la asistencia más efectiva para los pacientes y la comunidad.

En este trabajo, se identificó una proteína con relación a agarose de 75kDa de *E. coli* como candidata a una nueva proteína con actividad lectínica y con papel putativo en la virulencia de *E. coli*. Esa proteína fue identificada como precursora del receptor de la aerobactina férrica (IutA), un receptor de sideróforo, codificado por un gene del plasmidio pColV-30⁽¹⁰⁾, asociado con virulencia de algunas cepas de *E. coli*⁽¹¹⁾. Se evaluó, también, en este estudio, la presencia del gene *iutA* en cepas de UPEC para correlación con la infección bacteriana.

Métodos

Aislamiento de proteína de *E. coli* que se une a carbohidratos

Separados de UPEC (gentilmente cedidos por el Dr. Ebert Hanna, Invent Biotecnologia Ltda, Ribeirão Preto,

SP, Brasil) fueron cultivados en medio Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM)⁽¹²⁾, a 37°C, bajo agitación constante a 200rpm, por toda la noche. Para evaluar la influencia de iones en la producción de proteínas bacterianas, DMEM fue suplementado con 22mM de KH₂PO₄, 10mM de CaCl₂, 0,25mM de Fe(NO₃)₃ ó 22mM de KH₂PO₄ más 0,25mM de Fe(NO₃)₃⁽¹²⁾. Las células fueron recobradas por centrifugación (10.000 × g, por 15 minutos, a 4°C), nuevamente suspendidas en 25mL de TBS-azida (solución salina tamponada con Tris-HCl a 50mM conteniendo 10mM de CaCl₂, 2% (v/v) de Triton X-100 y 0,02% (m/v) de azida sódica, 100mM de MOPS, pH 7,4) y puestas en baño de hielo con 5 cambios de 30 segundos cada, a 60Hz (Vibra-cell, Sonics & Materiales Inc., Danbury, EEUU). Los lisados bacterianos fueron centrifugados a 10.000 × g, por 15 minutos, a 4°C. Los sobrenadantes fueron sometidos a dos procesos: A. incubación seriada con Sepharose CL-4B y resinas inmovilizadas con carbohidratos (d-galactose, d-manose, d-GlcNAc o lactosa), por 1 hora, a la temperatura ambiente. Después del lavado de las resinas con TBS para remoción del material no adsorbido, éstas fueron sometidas a la SDS-Page; B. cromatografía de afinidad en columna de Sepharose CL-4B, con volumen de lecho de 1mL, en sistema automatizado *ÅKTA Purifier* (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia). El material adsorbido a la columna fue fraccionado con 1M de NaCl o 0,1% (v/v) de ácido acético en agua. La cromatografía fue monitorizada por absorbancia a 280nm y las fracciones divididas fueron colectadas en *pools*, concentrados y procesados contra TBS, utilizándose Amicon Ultra-15 (membrana de exclusión con tamaño de 10kDa) (Millipore, Billerica, EEUU), de acuerdo con instrucciones del fabricante. Las proteínas de las fracciones concentradas fueron separadas en gel de poliacrilamida a 10%, en condiciones aisladas (SDS-Page). Los geles fueron rubicundos con azul de Coomassie.

Identificación de proteínas

Las proteínas rubicundas con azul de Coomassie fueron recortadas y tripsinizadas en el gel, anteriormente al análisis por 1D nLC-MS-MS, usando el sistema de espectrometría de masa (MS) *4000 QTrap* (Applied Biosystems) *tandem MS system* (Fingerprints Proteomics Facility, Universidad de Dundee). Los resultados fueron analizados usando el programa Mascot (www.matrixscience.com).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gene *iutA* en cepas de UPEC

Cepas de UPEC, separadas de la orina de pacientes hospitalizados, fueron colectadas en la Unidad de

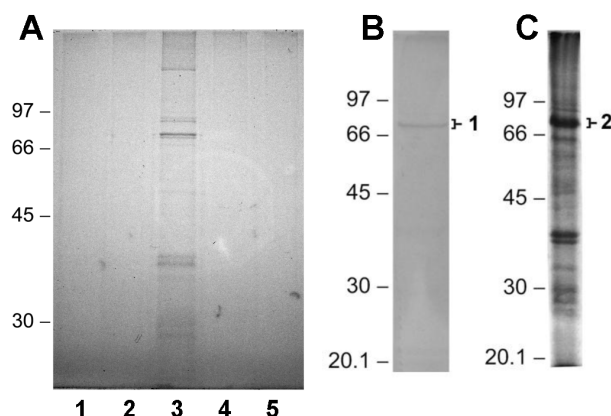
Emergencia del Hospital de las Clínicas de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, en el período de julio a septiembre de 2009. Esas cepas fueron sometidas a PCR para detección del gene *iutA*. El plasmídeo pPOC9-*iutA*, gentilmente cedido por el Dr. Michael El'Connell, Dublin City University, Irlanda⁽¹³⁾, fue utilizado como control positivo. Los ensayos de PCR fueron realizados con 20µL de un mejunje conteniendo 1 colonia de cada cepa testada, 1,25µM de cada par de iniciadores 5'-AAATTCATATGATG ATAAGCAAAAAG-3' y 5'-TTCAAGCTTTCAGAACAGCA CAGAGTAG-3', 0,2mM de cada desoxinucleosídeo trifosfato, compresa de PCR concentrado 10X, 1,5mM de MgCl₂, 2U de la enzima Taq ADN polimerasa (Fermentas, Burlington, Canadá). A PCR fue realizada en un aparato *Eppendorf Master Cycler Gradient Thermocycler* (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, EEUU), en las siguientes condiciones: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto y 72°C por 2,5 minutos y, en el final de esos 30 ciclos, 72°C por 5 minutos. Las reacciones fueron mantenidas a 4°C hasta el uso. Los productos de la PCR (*amplicons*) fueron analizados en gel de agarose a 1%, después de la marcación con bromuro de etidio, siendo los *amplicons* identificados con base en los tamaños de los productos amplificados.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de San Paulo, bajo Protocolo nº0737/2006.

Resultados

E. coli presenta una proteína de 75kDa con relación al agarose

Para identificar proteínas que relacionan los carbohidratos que podrían ser específicas para la colonización, inicialmente, se cultivó *E. coli* en medio mínimo (DMEM), que mimetiza las condiciones del trato intestinal⁽¹²⁾. Cuando el sobrenadante del lisado de *E. coli* participó de la incubadora de manera serial con Sepharose CL-4B y resinas inmovilizadas con carbohidrato, no fueron detectadas proteínas adsorbidas a Sepharose (Figura 1A, raya 1), o a cualquiera una de las otras resinas (datos no mostrados). Teniendo como base el trabajo de Kenny et al.⁽¹²⁾, que lograron aumento en la producción de factores de virulencia de EPEC, cuando suplementaran el medio mínimo con sales, se cultivaron, aquí, bacterias en medio DMEM suplementados con 22mM de KH₂PO₄, 10mM de CaCl₂, 0,25mM de Fe(NO₃)₃ o 22mM de KH₂PO₄ más 0,25 mM Fe(EN EL₃)₃. La inducción de proteínas que relacionan la Sepharose fue observada apenas en bacterias que fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con



sin adición de suplementación adicional con sales o suplementado con (2) KH₂PO₄, (3) CaCl₂, (4) Fe(NO₃)₃, (5) KH₂PO₄ y Fe(NO₃)₃, pasó por la incubadora con sepharose CL-4B. Después del lavado, las resinas conteniendo proteínas adsorbidas fueron sometidas a la SDS-Page. Lisado de *E. coli* cultivado en medio mínimo suplementado con CaCl₂ fue también sometido a la cromatografía de afinidad en sepharose. Material adsorbido fue fraccionado con (B) 1M de NaCl y (C) 0,1% de ácido acético, procesado y sometido a la SDS-Page. Los geles fueron rubicundados con azul de Coomassie. Posición de emigración de marcadores con masa molecular conocida están indicadas en la izquierda de la figura, en kDa.

Figura 1 - Proteína de 75kDa de UPEC se relaciona a la Sepharose CL-4B de un modo dependiente de CA²⁺

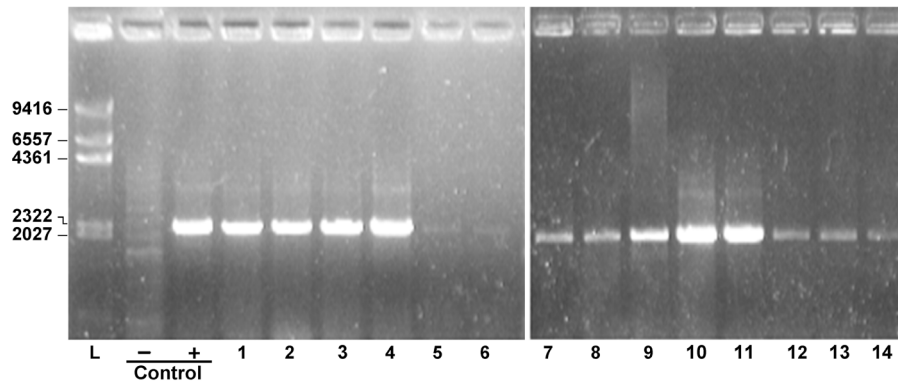
CaCl₂ (Figura 1A, raya 3). En la preparación, se logró una proteína mayoritaria de 75kDa, seguida por proteínas secundarias con MM>97kDa, ~85kDa y un dúplex de ~40kDa. El hecho de agarose ser un soporte para inmovilizar carbohidrato hizo con que fuese incubado el lisado primero con Sepharose CL-4B, seguido de las otras resinas. Como la proteína de 75-kDa relacionó a la Sepharose CL-4B, no fue posible detectar proteínas en las otras resinas.

Proteína de 75kDa corresponde a la *iutA* de *E. coli*

Las proteínas de 75kDa de *E. coli*, logradas por cromatografía de afinidad, en columnas de Sepharose, después de la fracción 1M de NaCl y 0,1% de ácido acético, fueron sometidas a la electroforesis (Figura 1B y C, respectivamente) y a la identificación por MS. Las secuencias tríplicas de la proteína de 75kDa ha mostrado alta identidad con la proteína envuelta en el apresamiento de hierro por la bacteria, la proteína *IutA*.

Detección del gene *iutA* en cepas de UPEC

El hecho de *IutA* ser expresa en condiciones que mimetizan el sitio de colonización de *E. coli* y haber sido asociado a la virulencia⁽¹¹⁾, motivó a determinarse, en este



Productos de PCR fueron sometidos a la electroforesis en gel de agarose a 1% para detectar el gene *iutA* en diferentes aislados de UPEC. (L) Marcador de 1kpb de ADN, (-) control negativo, (+) control positivo y (1-14) separados de UPEC. Geles fueron rubicundos con bromuro de etidio. Posiciones de emigración de los segmentos de ADN que sirvieron de marcador están indicadas en la izquierda de la Figura en PB.

Figura 2 - Detección del gene *iutA* en cepas de UPEC

estudio, la presencia del gene *iutA* en cepas de *E. coli* y correlacionarla a la infección bacteriana. Para detectar el gene *iutA* en cepas de UPEC, inicialmente se acarreó una reacción de amplificación en un plasmídeo producido con *iutA* (pPOC9-*iutA*). Como mostrado en la Figura 2, raya +, el producto amplificado tenía tamaño entre 2.322 y 2.027 pares de bases (pb), lo que es consistente con el tamaño esperado de 2.202pb para el gene *iutA*. El pPOC9-*iutA* fue usado como control positivo (Figura 2, raya +) en todas las reacciones.

El gene fue detectado en 14 de 37 separados de UPEC (datos no mostrados). Para confirmar las amplificaciones, los separados positivos fueron sometidos a otra reacción de amplificación (Figura 2). A pesar de las muestras de las rayas 5 y 6 presenten flaca amplificación, se validó, aquí, que 14 separados de UPEC contenían el gene *iutA*, lo que rehace una positividad del 38% entre los separados. No hubo ninguna asociación entre a positividad de IutA en UPEC y la gravedad de las infecciones (datos no mostrados), llevando a cuestionarse si IutA sería realmente es un factor de virulencia de *E. coli*.

Discusión

Hasta el momento, apenas algunas proteínas que relacionan los carbohidratos fueron identificadas en *E. coli*. Además, el papel de esas moléculas en la interacción proteína/carbohidrato, mediando la colonización bacteriana es poco conocida⁽⁶⁾. Así, se invirtió esfuerzo en el sentido de identificar nuevas proteínas que relacionan los carbohidratos que podrían estar envueltas en la colonización por *E. coli*. Se relata, aquí, el aislamiento y la identificación de una proteína de 75kDa como el receptor

de aerobactina férrica (IutA), que parece tener propiedad lectínica y ser importante para la colonización.

Curiosamente, IutA fue expresa apenas en *E. coli* cultivadas en medio DMEM suplementado con calcio, lo que mimetiza las condiciones encontradas en el ambiente del intestino⁽¹²⁾. Además, esa proteína no fue producida por bacterias cultivadas en caldo LB, mismo cuando suplementado con CaCl₂ (datos no mostrados), sugiriendo que señales adicionales, tales como el estrés nutricional, pueden ser responsables por la producción de esa proteína.

La adsorción de la proteína de 75kDa a la Sepharose fue reproducida, mismo cuando sometida a la cromatografía de afinidad en columna de Sepharose, lo que llevó a la sugestión de que la proteína tiene una relación con la galactose, una vez que Sepharose es un polímero que consiste en residuos alternados de β-d-galactopiranos-3-O-relacionada y 3,6-anidro-α-1-galactopiranos-4-O-relacionada⁽¹⁴⁾. Aunque ninguna proteína de 75kDa haya sido fraccionada con 0,1M de d-galactose o lactosa de la columna (datos no mostrados), se imaginó la hipótesis de que mayor especificidad de esa proteína por las unidades repetidas del disacárido que componen la agarose y baja especificidad por monosacárido o disacárido, como ocurre con algunas lectinas vegetales, se evitó la fracción de la proteína. No hay duda de que ése es un de los motivos por el cual la clasificación de las lectinas, de acuerdo con la especificidad por monosacáridos, generalmente enmascaró las características raras que esas proteínas frecuentemente demuestran para di, tri o tetra sacárido, con constantes desde asociación hasta 1.000 veces mayor cuando comparado a los monosacáridos. Además, muchas veces la conformación tridimensional del oligosacárido suministra estructuras complejas que no pueden ser

mimetizadas por azúcares simples⁽¹⁵⁾. La identificación de la proteína de 75kDa de *E. coli* como IutA, que es un receptor para el sideróforo aerobactina férrica, fue un resultado bastante interesante, una vez que esa molécula, implicada en el apresamiento de hierro, está envuelta en el proceso de colonización, siendo esencial para el crecimiento bacteriano en el hospedero^(10,16). Sideróforos y sistemas de captación de sideróforo desempeñan papel crucial en la virulencia microbiana, pues son esenciales para la patogénesis bacteriana. Sin embargo, existe redundancia de esos sistemas, lo que torna difícil la asociación entre virulencia y un receptor de sideróforo específico⁽¹⁷⁾. Aunque IutA sea expresada en bacterias patógenas y frecuentemente sea asociada a la virulencia⁽¹¹⁾, no se detectó el gene *iutA* preferencialmente entre los separados de UPEC, pues apenas 38% de los separados de UPEC presentaron gene *iutA*. Esos hallazgos corroboran un estudio reciente⁽¹⁸⁾ que mostró positividad en apenas 14% de separados de orina.

Varios estudios han demostrado el modo de acción del receptor de sideróforos, tales como receptor de aerobactina, pero ninguna mención ha sido hecha sobre la dependencia de la interacción proteína/carbohidrato en ese sistema. A pesar de la glicosilación de proteínas en bacterias ser limitada, otros glicoconjugados son abundantes⁽¹⁹⁾. Esos glicoconjugados podrían, de alguna forma, interactuar con proteína, como en organismos de mayor complejidad. Además, sideróforos glicosilados han sido encontrados, como salmoquelinas, aunque no esté claro el porqué de esa modificación⁽²⁰⁾.

Conclusión

La correlación entre IutA con relación a Sepharose y sistema proteico para la absorción de hierro por *E. coli* ofrece interesante averiguación sobre la participación de lectinas en ese proceso. La identificación de nuevas proteínas que relacionan los carbohidratos es un campo abierto para muchos hallazgos, como un posible involucramiento de esas proteínas en el proceso de colonización de tejido. En este estudio, se demostró que, aunque IutA pueda ser importante para la infección por EPEC, esa proteína no desempeña papel esencial en ese proceso.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Leandro L. Oliveira, Denissami ASF Lima, Brandão Izáira, Ana Paula Masson y Ana Flávia Gembre para la asistencia técnica, el Dr. Ebert Hanna de Invent Biotecnologia, Brasil, para proporcionar

comensales *E. coli* y el Dr. Michael O'Connell de la Dublin City University, Irlanda, por la generosa donación del plásmido pPOC9-*iutA*. Agradecemos a la Dra. Andrea Kaufmann Zeh para una revisión crítica del manuscrito

Referencias

- Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, et al. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science*. 2003;299(5615):2074-6.
- Neish AS. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes Infect*. 2002;4(3):309-17.
- Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004;14(11):53R-62R.
- Aronson M, Medalia O, Schori L, Mirelman D, Sharon N, Ofek I. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside. *J Infect Dis*. 1979;139(3):329-32.
- Kucheria R, Dasgupta P, Sacks SH, Khan MS, Sheerin NS. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad Med J*. 2005;81:83-6.
- Sharon N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760(4):527-37.
- Hagan EC, Lloyd AL, Rasko DA, Faerber GJ, Mobley HL. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathog*. 2010;6(11):e1001187.
- Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol*. 2001;153(12):1135-41.
- Hagan EC, Mobley HL. Uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane antigens expressed during urinary tract infection. *Infect Immunol*. 2007;75(8):3941-9.
- Williams PH. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect Immunol*. 1979;26(3):925-32.
- Crosa JH, Walsh CT. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(2):223-49.
- Kenny B, Abe A, Stein M, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immunol*. 1997;65(7):2606-12.
- Cuiv PO, Clarke P, O'Connell M. Identification and characterization of an iron-regulated gene, *chtA*, required

