



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

La proteína EscK es un componente de la plataforma de clasificación de sustratos del inyectisoma de *Escherichia coli* enteropatógena

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

JOSÉ EDUARDO SOTO GUZMÁN

TUTOR PRINCIPAL

DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO
(INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
(INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR-UNAM)

DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA
(INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM)

Ciudad de México. Mayo, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. ¿Entonces para qué sirve la utopía? Para eso, sirve para caminar.”

Eduardo Galeano (Fernando Birri)

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 325 N del Departamento de Genética Molecular (División de Investigación Básica) del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Bertha González Pedrajo y el apoyo técnico de la Dra. Norma Espinosa Sánchez.

Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo de los donativos 180460 de CONACyT, IN212911 e IN209617 de la DGAPA, UNAM. Durante la realización de mi tesis me fue otorgada una beca de manutención con número 349951 por parte del CONACyT y una beca de apoyo por parte de la DGAPA, UNAM donativos IN212911 e IN209617.

Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) por el apoyo económico que me permitió exponer mis avances en distintos congresos.

El comité tutor que asesoró este trabajo estuvo conformado por la Dra. Bertha González Pedrajo, la Dra. Soledad Funes Argüello y el Dr. José Luis Puente García.

El jurado que examinó esta tesis estuvo formado por la Dra. Yolanda López Vidal, el Dr. Lorenzo Segovia Forcella, el Dr. Luis Servín González, el Dr. Rodolfo García Contreras y el Dr. Fernando Navarro García.

Se agradece el apoyo técnico de los miembros de la Unidad de Biología Molecular: Dra. Laura Ongay Larios, Biól. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera; de la Unidad de Cómputo: Biól. Gerardo Coello Coutiño, Ing. Juan Barbosa Castillo e Ing. Ivette Rosas Arciniega.

Se reconoce y agradece a Adrián Alvarado Martínez cuya labor ha sido muy importante para mi trabajo en el laboratorio y al apoyo técnico del Dr. Héctor Malagón Rivero por su ayuda con la generación de anticuerpos policlonales.

Agradecemos a los doctores: Luis Ángel Fernández, Ángel Manjarrez-Hernández y a Dimitris Georgellis por los anticuerpos anti-EscC, anti-EspC y anti-ArcB que amablemente nos prestaron. A los doctores Georges Dreyfus y Luis Servín González por los plásmidos pTB263 y pFLP2, respectivamente. A la Dra. Verónica Martínez por las construcciones en pBAD. A las doctoras Laura Camarena y Clelia Domenzain por su apoyo en los análisis de microscopía de fluorescencia.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
A/E	Adherencia y esfacelamiento (del inglés <i>Attaching and Effacing</i>)
AHL	Acil-homoserina lactona
Amp	Ampicilina
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales (del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
CaCl₂	Cloruro de calcio
Cm	Cloranfenicol
Da	Dalton
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO	Densidad óptica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
HMM	Cadenas ocultas de Markov (del inglés <i>Hidden Markov Models</i>)
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina
LEE	Locus de esfacelamiento del enterocito (del inglés <i>Locus of Enterocyte Effacement</i>)
M	Molar
Orf	Marco abierto de lectura (del inglés <i>Open Reading Frame</i>)
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
DELTA-BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales de dominio con tiempo acelerado (del inglés <i>Domain enhanced lookup time accelerated BLAST</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Medio sintético definido (del inglés <i>Synthetic Defined Media</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SST3	Sistema de secreción tipo III
Sm	Estreptomina
Tc	Tetraciclina
TA	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloroacético
WB	Inmunoblot (del inglés <i>Western blot</i>)
YPD	Medio de extracto de levadura, peptona, dextrosa

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
El sistema de secreción tipo III (SST3).....	3
Importancia de los SST3.....	6
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).....	9
Mecanismo de infección de EPEC.....	10
Locus de esfacelamiento del enterocito (LEE).....	15
Anatomía y origen evolutivo del LEE.....	15
Estructura del SST3 de EPEC.....	19
Cuerpo basal.....	19
Estructuras axiales y extracelulares.....	21
Aparato de exportación.....	22
Componentes citoplásmicos.....	22
ANTECEDENTES.....	26
El anillo citoplásmico funciona como una plataforma de clasificación.....	26
El LEE contiene marcos de lectura sin función asignada.....	29
La proteína codificada por el gen <i>orf4</i> no tiene anotación funcional.....	29
JUSTIFICACIÓN.....	31
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	44
Orf4 es un homólogo distante de la familia YscK/OrgA/MxiK.....	44
EscK es un componente importante del SST3 de EPEC.....	47
STM1410, homólogo de EscK, no restaura la secreción de la cepa mutante Δ escK.....	49
EscK interacciona directamente con EscQ.....	51
Localización subcelular de EscK.....	54
La estabilidad y la localización de EscQ no se ven afectadas en ausencia de EscK.....	59
Diseción molecular de EscK.....	63
Dominancia negativa de EscK sobre el SST3.....	67

La sobre-producción de sustratos compensa parcialmente la ausencia de componentes de la plataforma de clasificación.....	70
El ensamblado de los componentes de la plataforma de clasificación puede ser monitoreado con proteínas fluorescentes	73
DISCUSIÓN.....	78
CONCLUSIONES	85
PERSPECTIVAS	86
ANEXOS.....	91
REFERENCIAS	95

RESUMEN

Los sistemas de secreción tipo III (SST3) son maquinarias supramoleculares usadas por una variedad de bacterias patógenas para translocar proteínas efectoras al interior del citoplasma de células de eucariontes. *Escherichia coli* enteropatógena es un importante agente causal de diarrea en países en vía de desarrollo. La virulencia de EPEC depende de un SST3 codificado en una isla de patogenicidad cromosomal conocida como locus de esfacelamiento del enterocito (LEE). En este trabajo se caracterizó la función desempeñada por la proteína EscK (previamente denominada Orf4) en el SST3 de EPEC. Se demostró que EscK es una pieza crucial para el funcionamiento eficiente del SST3. Estudios de fraccionamiento celular revelaron que EscK se localiza en la membrana interna de EPEC independientemente de la presencia de algún otro componente del SST3. Conjuntando experimentos de doble híbrido en levadura y ensayos de co-purificación se encontró que EscK interacciona de manera directa con EscQ, el componente principal de la plataforma de clasificación. Mediante mutagénesis sitio dirigida se encontraron residuos críticos para la función de EscK y para su interacción con EscQ. También se reporta por primera vez que la plataforma de clasificación no es esencial cuando los sustratos son sobre-producidos. Los datos obtenidos sugieren que EscK es un componente de la plataforma de clasificación de EPEC, y que esta subestructura juega un rol central en el reclutamiento de sustratos para incrementar la eficiencia del proceso de translocación.

ABSTRACT

The type III secretion system (T3SS) is a supramolecular machine used by many bacterial pathogens to translocate effector proteins directly into the eukaryotic host cell cytoplasm. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is an important cause of infantile diarrheal disease in underdeveloped countries. EPEC virulence relies on a T3SS encoded within a chromosomal pathogenicity island known as the locus of enterocyte effacement (LEE). In this work, we pursued the functional characterization of the LEE-encoded protein EscK (previously Orf4). We provide evidence indicating that EscK is crucial for efficient T3S and that it belongs to the SctK (OrgA/YscK/MxiK) protein family, whose members have been implicated in the formation of a sorting platform for secretion of T3 substrates. Bacterial fractionation studies showed that EscK localizes to the inner membrane independently of the presence of any other T3SS component. Combining yeast two-hybrid screening and pull-down assays, we identified an interaction between EscK and the C- ring/sorting platform component EscQ. Site directed mutagenesis on conserved residues revealed critical amino acids for EscK function and for its interaction with EscQ. In addition, we found that T3 substrate overproduction is capable of compensating for the absence of EscK. Overall, our data suggest that EscK is a structural component of the EPEC T3SS sorting platform, playing a central role in the recruitment of T3 substrates for boosting the efficiency of the protein translocation process.

INTRODUCCIÓN

El sistema de secreción tipo III (SST3)

Las bacterias, además de ser la forma de vida más temprana que apareció en la Tierra¹, son organismos ubicuos, diversos y esenciales para mantener los ecosistemas terrestres. Estos microorganismos usan distintas estrategias para interactuar con los diversos elementos de su ambiente. Una de estas estrategias es la secreción de proteínas por lo cual, a lo largo de la evolución, las bacterias han adaptado diversas maquinarias celulares dedicadas a esta tarea. Uno de estos dispositivos de secreción de proteínas utilizados por bacterias didermas² es el sistema de secreción tipo III (SST3).

El SST3, también conocido como inyectisoma, es un complejo macromolecular formado por alrededor de 20 proteínas distintas que permite translocar, sin intermediarios periplásmicos, proteínas bacterianas directamente al citoplasma de células eucariontes (Figura 1) (Cornelis 2006; Burkinshaw&Strynadka 2014; Galán et al. 2014). Las proteínas translocadas, conocidas en su conjunto como efectores, modifican diversas funciones celulares del hospedero para el beneficio de la bacteria (Coburn, Sekirov & Finlay 2007).

¹ Se ha estimado que las primeras formas de vida bacterianas aparecieron hace aproximadamente 3 800 millones de años (DeLong and Pace 2001).

² Las bacterias didermas cuentan con dos membranas celulares (Gram negativas) en contraste con las bacterias monodermas que sólo presentan una membrana celular (Gupta 2011).

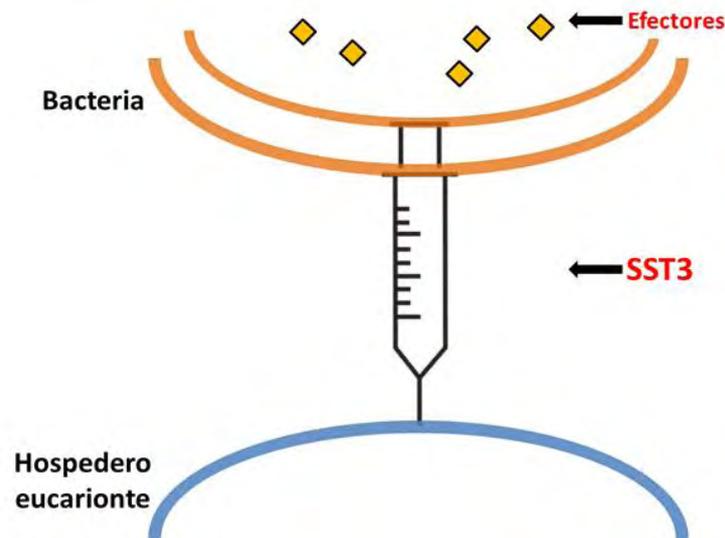


Figura 1. Esquema ilustrativo de la estructura y función del SST3 o inyectisoma bacteriano. Podemos pensar en el SST3 como una “jeringa” molecular a través de la cual las bacterias translocan proteínas efectoras al interior de células eucariontes.

Debido a que el transporte directo de proteínas permite a las bacterias colonizar diversos organismos eucariontes para obtener un nicho ecológico estable, los SST3 han sido adquiridos por una gran diversidad de bacterias Gram-negativas. Por esta razón los SST3 son interfaces para la interacción bacteria-eucarionte sumamente versátiles ya que son codificados tanto por patógenos como por simbiontes bacterianos para establecer relaciones ecológicas con organismos eucariontes (Preston 2007). En un estudio filogenómico donde se exploraron 1385 genomas bacterianos secuenciados, se encontró que más de 150 bacterias didermas poseen al menos un SST3 codificado en su genoma (Abby&Rocha 2012). En la Tabla I se muestran sólo algunos ejemplos representativos de bacterias que establecen interacciones con organismos eucariontes mediante el SST3.

Tabla I. Rol ecológico de algunos SST3 bacterianos.

Bacteria	Hospedero	Relación con el hospedero	Efecto de la interacción
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	Humano	Patógeno	Diarrea acuosa y persistente, cólicos
<i>Shigella flexneri</i>	Humano	Patógeno	Disentería bacilar, diarrea, vómito
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Humano, vaca, cerdo	Patógeno	Fiebre entérica, enterocolitis/diarrea, bacteremia
<i>Yersinia pestis</i>	Humano, vaca, roedores	Patógeno	Diarrea, enterocolitis, peste
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Humano	Patógeno oportunista	Neumonía, infecciones urinarias, infecciones post-operatorias en heridas y quemaduras
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Humano	Patógeno oportunista	Diarrea, otitis, endoftalmitis
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Humano	Patógeno intracelular obligado	Infecciones oculares, genitales y pulmonares
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peces	Patógeno	Furunculosis
<i>Edwardsiella tarda</i>	Peces	Patógeno	Edwardsiellosis (septicemia, hemorragias, nefritis, hepatitis)
<i>Xanthomonas campestris</i>	Plantas (pimiento, tomate)	Patógeno	Mancha bacteriana
<i>Erwinia amylovora</i>	Plantas (manzano, peral, membrillo)	Patógeno	Fuego bacteriano (necrosis)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Plantas (plátano, soya, berenjena)	Patógeno	Mancha bacteriana
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Plantas (soya)	Mutualista	Necesario para la eficiente formación de nódulos fijadores de nitrógeno
<i>Rhizobium etli</i>	Plantas (leguminosas)	Mutualista	Necesario para la correcta formación de nódulos fijadores de nitrógeno

<i>Burkholderia terrae</i>	Hongos (<i>Lyophyllum</i>)	Mutualista	Co-migración con la hifa
<i>Sodalis glossinidius</i>	Insectos (mosca tse-tse)	Simbionte	Necesario para la exitosa invasión de las células hospederas de insecto

Importancia de los SST3

El estudio de los SST3 es de especial interés por múltiples razones. Bacterias cuya patogenicidad depende de un SST3 han sido históricamente muy importantes. Sólo por citar un par de ejemplos, la bacteria *Yersinia pestis* fue el agente causal de la peste negra (Shannon et al. 2013), pandemia histórica que mató a más de un tercio de la población europea entre los años 1348 y 1350 (Figura 2A). Estudios de DNA antiguo y de inmunocromatografía en muestras de dientes y esqueletos encontrados en tumbas europeas asociadas a la peste negra demostraron -sin ambigüedad- que *Y. pestis* fue el agente etiológico de esta pandemia. Por su parte en el México post-hispánico, entre los años 1545 y 1576, una epidemia de origen incierto, conocida por los nativos como *cocoliztli* (enfermedad o mal en náhuatl³) causó entre 7 y 18 millones de muertes de nativos (Figura 2B). Recientemente se encontraron, mediante estudios metagenómicos de DNA antiguo, trazas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi C en restos humanos de sitios arqueológicos ligados al *cocoliztli* indicando que pudo haber sido esta cepa de *Salmonella* el agente causal de dicha catástrofe demográfica (Vågene et al. 2017) (Figura 2).

³ <http://www.gdn.unam.mx/diccionario/consultar/palabra/cocoliztli/>

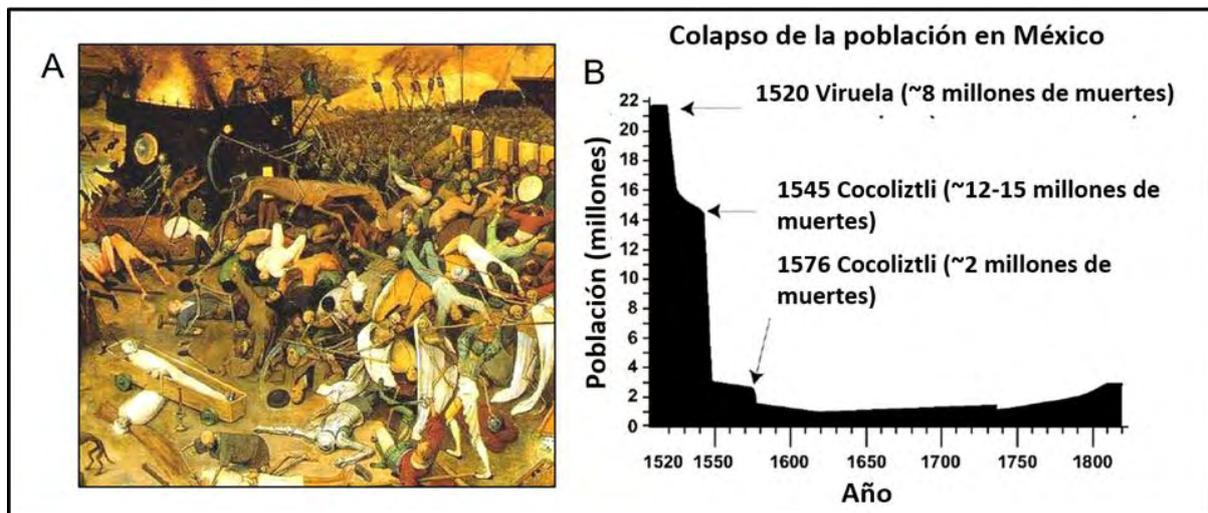


Figura 2. El SST3 en la historia. (A) El efecto de la peste negra causada por *Y. pestis* sobre la vida europea medieval fue tal que influenció de manera importante el trabajo artístico de la época. La imagen aquí mostrada del cuadro con tono apocalíptico de Pieter Brueghel, “El triunfo de la muerte”, se interpreta como una visión alegórica a las epidemias de ese entonces. (B) Uno de los factores que llevó a la caída del Imperio Azteca fueron las enfermedades traídas por los españoles. El *cocoliztli*, que recientemente fue asociado con infecciones por *Salmonella*, mermó considerablemente a la población nativa. Modificado de (Acuna-Soto et al. 2002). Tanto *Y. pestis* como *Salmonella* basan su capacidad patogénica en la inyección de proteínas vía SST3.

Al día de hoy numerosos patógenos bacterianos causantes de enfermedades frecuentes en humanos hacen uso de al menos un inyectisoma para causar infección (Tabla I). *Shigella* y *Salmonella* son enteropatógenos comunes de humanos que son adquiridos por agua o alimentos contaminados (Schroeder&Hilbi 2008; Ramos-Morales 2012). *Pseudomonas* y *Chromobacterium* son patógenos oportunistas (Hauser 2009; Miki et al. 2010; Betts, Chaudhuri, & Pallen 2004), mientras que *Chlamydia* es responsable de diversas enfermedades de transmisión sexual tanto en humanos como en animales⁴ (Betts-Hampikian&Fields 2010). Otros patógenos dependen del SST3 para causar enfermedades en animales domésticos como *Bordetella* -que infecta perros y cerdos (Nicholson et al. 2013; Abe, Nagamatsu, & Watanabe 2008)- o a animales de vida libre como *Edwardsiella* que coloniza peces (Xie et al. 2014). También existen patógenos bacterianos de plantas

⁴ En la actualidad, uno de los factores que tiene a la población de koalas en Australia gravemente amenazada son las infecciones causadas por *Chlamydia pecorum* (Polkinghorne et al. 2013). Las infecciones por esta bacteria en koalas producen ceguera infecciones de vías urinarias e infertilidad. *C. pecorum* cuenta con SST3 para causar infección.

que dependen del SST3 para colonizar tejidos vegetales. Especies de los géneros *Xanthomonas*⁵ y *Ralstonia* infectan cultivos de pimientos, fresas, papa, arroz, cítricos, entre otros (Buttner&He 2009; Coll&Valls 2013). Las infecciones por estos patógenos de plantas representan pérdidas millonarias para la industria de la agricultura (Strange&Scott 2005). Recientemente también se ha comenzado a reconocer la importancia del SST3 en el establecimiento de relaciones mutualistas como en el caso de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Kambara et al. 2009; Okazaki et al. 2013) que pueden beneficiar al organismo hospedero.

Por otro lado, los avances en el entendimiento de la estructura y funcionamiento de los SST3 han permitido aprovecharlos como dispositivos biotecnológicos al reprogramarlos para la secreción y translocación de biomateriales. Ejemplo de esto es la translocación de proteínas terapéuticas a blancos específicos en organismos eucariontes usando bacterias no replicativas como chasis molecular (Rüssmann 2004; Hegazy&Hensel 2012; Carleton et al. 2013; Ruano-Gallego, Álvarez, & Fernández 2015; Ittig et al. 2015). Otro uso biotecnológico que se ha dado al inyectisoma es la secreción de proteínas de interés comercial para su posterior purificación. Debido a que la sobreproducción en bacterias de proteínas recombinantes puede llevar a que éstas se agreguen en el espacio intracelular o tener efectos negativos sobre el crecimiento de la cepa de expresión, se ha visto que secretar las proteínas recombinantes al medio extracelular a través del SST3 resulta en una estrategia sumamente eficiente para su posterior purificación (Widmaier et al. 2009; Singer et al. 2012).

Evolutivamente, se ha descrito que los SST3 descienden de un sistema flagelar ancestral. El flagelo bacteriano es un sistema de locomoción mediante propulsión, que estructural y funcionalmente es muy parecido al inyectisoma (Figura 3). El flagelo se conforma de una maquinaria citoplásmica, componentes membranales y una propela extracelular conocida como filamento. Mediante un análisis filogenómico a gran escala, se propuso que mediante un proceso de exaptación, un subconjunto de componentes estructurales de un sistema ancestral flagelar de

⁵ Tan sólo el género *Xanthomonas* es agente causal de más de 350 enfermedades distintas en plantas (Leyns et al. 1984).

locomoción fueron “reclutados” para llevar a cabo una nueva función como maquinaria de secreción (Abby&Rocha 2012) (Figura 3).

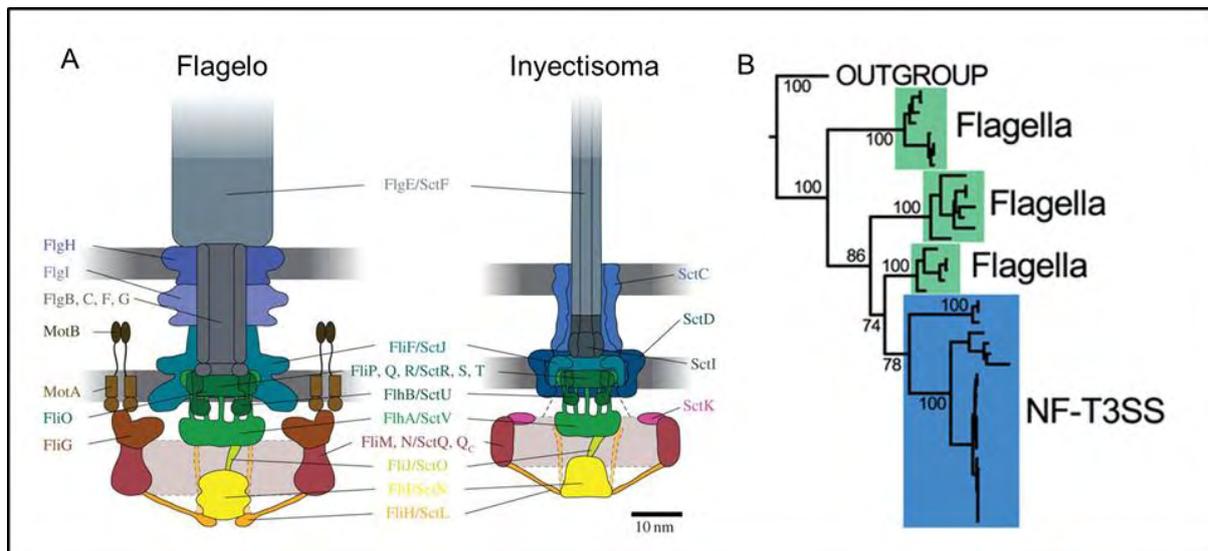


Figura 3. El flagelo y el inyectisoma tienen un origen evolutivo en común. (A) Esquema comparativo del flagelo (izquierda) y el inyectisoma (derecha) en donde se muestra la similitud arquitectónica entre estas dos maquinarias bacterianas. Modificado de (Diepold & Armitage, 2015). (B) Reconstrucción filogenética de la familia de las ATPasas de inyectisomas (azul) y flagelares (verde). Se observa como las ATPasas del inyectisoma derivan de una ATPasa flagelar ancestral. Como grupo externo (outgroup) para enraizar el árbol los autores usaron a la familia de las ATP sintasas. Modificado de (Abby&Rocha 2012).

Escherichia coli enteropatógena (EPEC)

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un importante agente causal de diarrea infantil especialmente en países en vía de desarrollo. La infección por EPEC se da más comúnmente en niños menores de dos años en países sub-desarrollados. Meta-análisis sistemáticos han reportado que EPEC es responsable de alrededor de 79,000 muertes anuales en niños menores de 5 años alrededor del mundo (Lanata et al. 2013). En México se ha estimado que hasta el 19% de los casos de diarrea pediátrica pueden atribuirse a EPEC (Vidal et al. 2007). Además de humanos, se ha reportado que EPEC es capaz de infectar ganado bovino y de colonizar animales domésticos como perros, gatos, ovejas, cerdos y gallinas (Krause et al. 2005).

El primer reporte de infección por una cepa de EPEC data de 1945 cuando un brote de diarrea infantil en una guardería de Londres fue asociado a *Bacterium coli* neapolitanum, nombre original con que el pediatra británico John Bray describió a la cepa ahora nombrada EPEC del serogrupo O111 (Bray&John 1945). Sin embargo, la cepa de EPEC arquetipo más empleada en laboratorios alrededor del mundo para entender la patogénesis de esta bacteria es la cepa EPEC E2348/69 serotipo O127:H6. Esta cepa fue originalmente aislada en octubre de 1969 de un niño de 9 días de nacido en medio de un brote que afectó a 17 niños en una guardería de Taunton, en el Reino Unido (Iguchi et al. 2009; Nisa et al. 2013). La cepa E2348/69 es resistente a estreptomicina debido a la presencia del operón *strAB* codificado en el plásmido pE2348-2 (Nisa et al. 2013).

Mecanismo de infección de EPEC

La vía de transmisión de esta bacteria es comúnmente fecal-oral por alimentos contaminados o, más frecuentemente, por agua contaminada (Labbé&García 2001). Se ha calculado que la dosis de infección de EPEC es de 10^8 unidades formadoras de colonia en adultos sanos y en niños la dosis requerida es mucho menor (Bieber et al. 1998; Donnenberg et al. 1993). Los efectos causados por esta bacteria pueden manifestarse tan rápido como 3 horas después de haber sido ingerida (Donnenberg et al. 1993). Los síntomas predominantes en la infección por EPEC son diarrea acuosa prolongada con sangrado ocasional y fiebre. La virulencia de EPEC depende estrictamente de un SST3 y la importancia de la integridad de este sistema de secreción para la patogenicidad de EPEC ha sido comprobada incluso en experimentos con voluntarios humanos (Donnenberg et al. 1993; Tacket et al. 2000).

Para entender cómo es que EPEC se establece en el intestino humano se ha dividido la infección de esta bacteria en 3 pasos distintos: adherencia localizada, translocación de proteínas y adherencia íntima.

Adherencia localizada. Una vez ingerida, EPEC viaja por el tracto gastrointestinal del hospedero hasta alojarse en el intestino delgado. En este nicho intestinal, EPEC establece una adherencia inicial auxiliada por un pilus tipo IV llamado BFP (del

inglés, *bundle forming pilus*) (Clarke et al. 2003; Girón, Ho, & Schoolnik 1991). La fimbria BFP se encuentra codificada en un plásmido de 80 kb denominado EAF (del inglés, *EPEC adherence factor*)⁶. Esta fimbria, en principio, permite la agrupación interbacteriana para formar agregados bacterianos conocidos como microcolonias. Posteriormente, estas microcolonias de EPEC se adhieren al intestino (Figura 4) en un patrón conocido como adherencia localizada. Se ha propuesto que la N-acetil-lactosamina de los enterocitos podría ser el receptor específico con el cual la fimbria BFP podría establecer contacto con el hospedero (Khursigara et al. 2001).

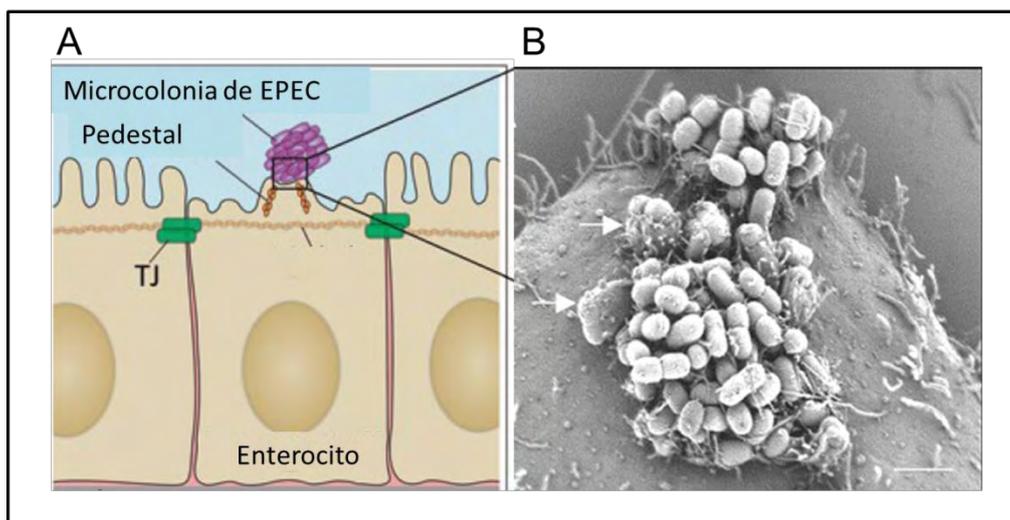


Figura 4. Adherencia localizada de EPEC. (A) Representación esquemática de la adherencia de las microcolonias de EPEC a los enterocitos (Yashunsky, Victor, & Benjamin 2015). TJ, uniones estrechas (del inglés *tight junctions*). (B) Imagen de microscopía electrónica de barrido donde se muestran microcolonias de EPEC adheridas a células HT-29 (Saldaña et al. 2009).

Translocación de proteínas. Una vez que se estableció la adherencia inicial de EPEC, se comienza la translocación de proteínas de virulencia o efectores al enterocito infectado mediante el SST3. La estructura extracelular del inyectisoma establece contacto con la célula hospedera y las proteínas de virulencia (o

⁶ Es importante mencionar que no todas las cepas de EPEC poseen el plásmido EAF. Con base en la presencia o ausencia de dicho plásmido, las cepas de EPEC se clasifican como típicas o atípicas, respectivamente. Mientras que las cepas atípicas son aisladas más frecuentemente en países industrializados, las cepas típicas predominan en países no capitalizados (Kaper, Nataro, and Mobley 2004; Trabulsi, Keller, and Tardelli Gomes 2002).

efectores) son transportados por este sistema desde el citoplasma de EPEC hasta el interior de los enterocitos. Los efectores inyectados despliegan dentro de la célula hospedera una gran variedad de actividades bioquímicas ocasionando una serie de alteraciones celulares tales como fallas en la función de los microtúbulos, disrupción de las uniones estrechas celulares, desbalances en el gradiente electroquímico del epitelio, mal funcionamiento mitocondrial, redistribución de aquaporinas, modulación del ciclo celular, inhibición de apoptosis, entre otros (Lapointe, O'Connor, & Buret 2009; Dean & Kenny 2009; Gaytán et al. 2016; Ugalde-Silva, Gonzalez-Lugo, & Navarro-Garcia 2016) (Tabla II, Figura 5). Análisis proteómicos de las proteínas secretadas por EPEC han reportado que el repertorio de efectores translocados ronda alrededor de 27 sustratos distintos (Deng et al. 2012).

Tabla II. Descripción general de algunos efectores translocados por el SST3 de EPEC

Efactor	Función fisiológica en el hospedero*
Map	Disfunción mitocondrial, formación de filopodios
EspF	Antifagocitosis, disrupción del nucléolo, ruptura de uniones estrechas
EspG	Disrupción de los microtúbulos, redistribución de de las aquaporinas
EspH	Promoción de la formación del pedestal
NleA	Inhibición del tráfico vesicular entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi
NleC	Proteasa de zinc que modula la respuesta inmune
NleD	Proteasa de zinc que modula la respuesta inmune
Cif	Ciclomodulina que induce un arresto del ciclo celular en G1 y G2 y promueve un retraso en la muerte celular

* Se dan sólo algunos ejemplos de los efectos generales descritos que tienen los efectores dentro de la célula hospedera.

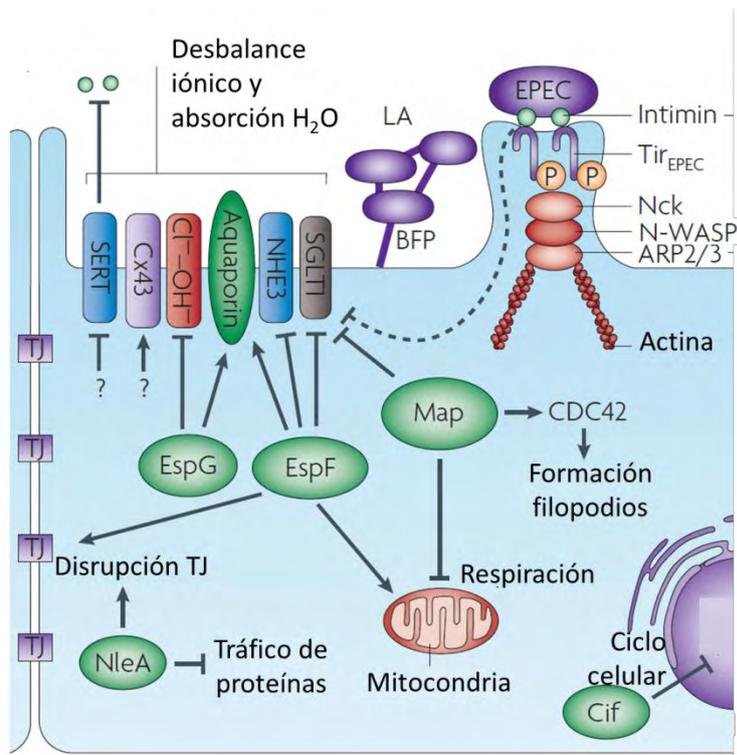


Figura 5. Los efectores inyectados modulan numerosas funciones celulares del hospedero. Esquema caricaturizado de los efectos dentro de los enterocitos de algunos de los efectores (EspG, EspF, Map, Tir, NleA, Cif) inyectados por EPEC. LA, adherencia localizada, TJ, uniones estrechas. Modificado de Croxen & Finlay 2009.

Adherencia íntima. El último paso en el establecimiento del nicho ecológico de EPECes la adherencia íntima. Las subunidades que forman la estructura extracelular del inyectisoma se despolimerizan de la superficie bacteriana. Uno de los efectores inyectados a la célula hospedera es Tir (del inglés, Translocated-Intimin receptor) el cual, una vez translocado, es fosforilado en la tirosina 474 por cinasas propias del hospedero (Kenny 1999). Tir fosforilado se inserta en la membrana de la célula hospedera de modo que la región central queda expuesta al espacio extracelular mientras que los extremos amino y carboxilo terminales interaccionan en el citoplasma con otras proteínas del hospedero (Luo et al. 2000). La intimina, adhesina codificada en el LEE, se ancla en la membrana externa de EPEC y sirve como receptor de Tir (Figura 6A). La interacción Tir-intimina produce el cambio fenotípicamente más drástico de la colonización de EPEC: la actina de las microvellosidades aledañas se reabsorbe para acumularse justo por debajo del sitio de unión de la bacteria al intestino formando una estructura tipo pedestal (Figura

6B). Esta microlesión característica ocasionada por EPEC se conoce como lesión de adherencia y esfacelamiento (lesión A/E).

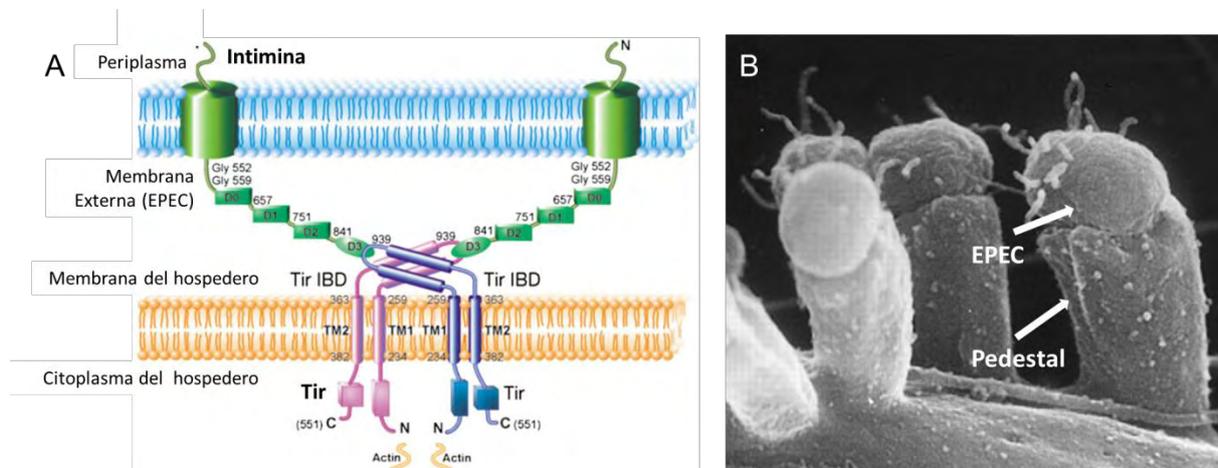


Figura 6. La interacción Tir-intimina es importante para la formación de la lesión A/E. (A) Modelo de la asociación íntima entre el efector Tir translocado al hospedero y la intimina, adhesina de membrana externa de EPEC. La región extracelular de Tir (azul y morado) que interacciona con la intimina (verde) se asocia para formar un homodímero. Tanto el amino (N) como el carboxilo (C) de Tir se encuentran dentro del enterocito. Modificado de (Luo et al. 2000). (B) Imagen de microscopía electrónica de barrido de la lesión A/E tipo pedestal inducida por EPEC en cultivos de células HeLa (Knutton 1998).

La ventaja adaptativa que confiere la formación de la lesión A/E a la bacteria no se tiene clara aún, pero una posibilidad es que la adherencia íntima podría ayudar a la bacteria a competir contra la microbiota intestinal cuando el flujo de diarrea se hace presente en el intestino (Campellone 2010). En concordancia con esto, en *Citrobacter rodentium* -otro patógeno bacteriano que tiene la habilidad de causar esta misma lesión pero en ratón- se ha visto que el SST3 es dispensable para la colonización de la bacteria en un modelo murino libre de gérmenes (Kamada et al. 2012). Esto implicaría que, al no competir con otras bacterias intestinales, el éxito reproductivo de *C. rodentium* se vuelve independiente del SST3 en este nicho ecológico.

Locus de esfacelamiento del enterocito (LEE)

El locus de esfacelamiento del enterocito (LEE, del inglés *Locus of enterocyte effacement*) es una isla de patogenicidad codificada en el cromosoma de EPEC. Esta isla contiene todos los genes necesarios para la expresión, ensamblaje y funcionamiento del inyectisoma de EPEC así como para la formación de la lesión A/E (Figura 7). Se ha descrito que otras bacterias filogenéticamente cercanas a EPEC como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), EPEC asociado a conejo (REPEC) y patógenos de ratón como *C. rodentium* poseen una isla LEE cromosomal que les permite causar la lesión A/E en sus respectivos hospederos, por lo que son conocidos en su conjunto como patógenos A/E. Además de estos grupos bacterianos, otras bacterias asociadas a aves como *S. enterica* subespecie *salamae* serovar Sofia (Chandry et al. 2012) o a peces como *Edwardsiella tarda* FPC503 (Nakamura et al. 2013) también poseen esta isla de patogenicidad en su genoma.

Anatomía y origen evolutivo del LEE

En EPEC esta isla de 35.6 kb consta de 41 marcos de lectura identificados, los cuales están organizados transcripcionalmente en 7 operones (LEE1-LEE7) y 4 unidades transcripcionales individuales (Figura 7). Estos genes codifican para los componentes estructurales del inyectisoma, reguladores transcripcionales que modulan la expresión de la propia isla, algunos de los efectores translocados, chaperonas de sustratos del SST3 y reguladores funcionales de la jerarquía de secreción de sustratos (Figura 7).

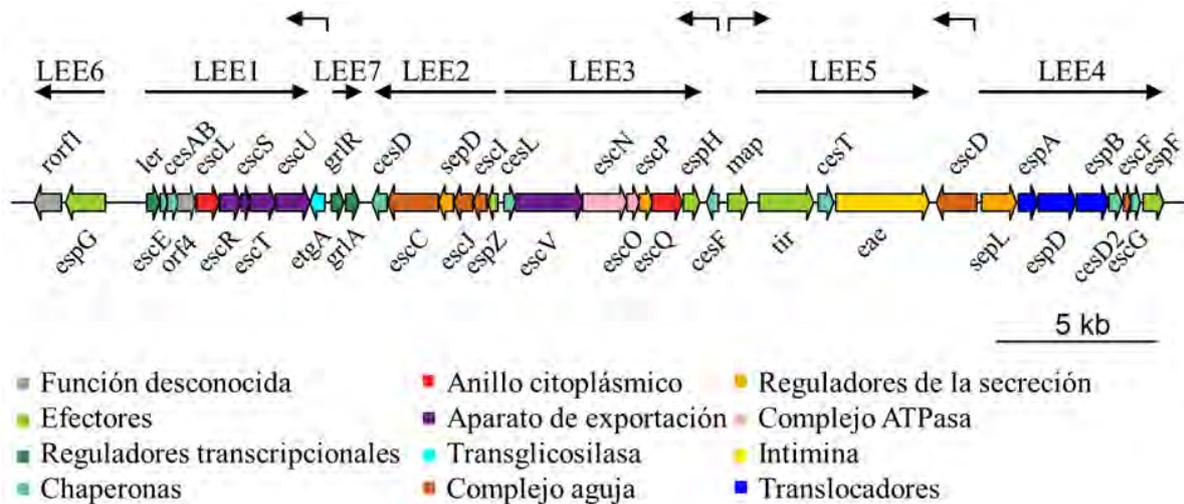


Figura 7. Diagrama esquemático de la isla cromosomal de patogenicidad LEE de EPEC E2348/69. Los 41 genes se encuentran representados como flechas y coloreados de acuerdo a su clasificación funcional. La representación se encuentra hecha a escala (barra de escala, 5 kb). Número de acceso en NCBI: AF022236.

Existe evidencia importante que muestra que la isla LEE fue adquirida mediante diversos eventos de transferencia horizontal en los patógenos A/E (Reid et al. 2000; Castillo, Eguiarte, & Souza 2005), como el hecho de tener un contenido atípico de G+C (~38%) muy distinto al contenido G+C promedio del genoma de EPEC (~50%). También, esta isla de patogenicidad se encuentra insertada en el cromosoma de los distintos patógenos A/E interrumpiendo genes de tRNA⁷ no esenciales (*seI*C en el caso de EPEC O127:H6 E2348/69 y de EHEC O157:H7) o redundantes (*pheU* en EPEC O111:H8/H- y *pheV* en STEC O103:H2) los cuales son sitios típicos de integración de elementos genéticos móviles (Hacker, Jörg, & Kaper 2000; Rumer et al. 2003).

A los genes codificados en el LEE se les ha nombrado de acuerdo a la nomenclatura estándar de los sistemas de secreción tipo III. Esta nomenclatura estándar fue propuesta por Hueck para unificar los nombres de las proteínas homólogas en distintos SST3 (Hueck 1998) (Tabla III). La nomenclatura unificada refleja la anotación funcional general y la relación evolutiva de cada componente con sus homólogos del SST3 de otras bacterias, facilitando así los estudios

⁷ Los genes de RNA de transferencia (tRNA) son sitios frecuentemente usados por las integrasas como sitios de inserción debido a que son loci altamente conservados. Esto facilita eventos futuros de recombinación. Se ha estimado que hasta el 75% de las islas de patogenicidad bacterianas se encuentran asociadas a tRNAs (Hacker, Jörg, and Kaper 2000).

comparativos entre SST3 de distintas especies bacterianas. Las primeras 3 letras de cada componente en esta nomenclatura son *sct* (del inglés *secretion and cellular translocation*) seguidas de una cuarta letra en mayúscula única para cada componente. Por su parte, en la nomenclatura de la isla LEE, las primeras 3 letras de cada gen indican su categoría funcional general. Los genes designados *esc* codifican componentes estructurales (del inglés *Escherichia coli secretion component*), *esp* codifican proteínas secretadas (*E. coli secreted proteins*) y los genes *ces* codifican chaperonas de proteínas secretadas (*chaperone of E. coli secretion*).

En el LEE de EPEC se encuentran codificadas todas las proteínas necesarias para ensamblar un SST3 funcional. De hecho se ha descrito que la expresión de la isla LEE de EPEC en una cepa de *E. coli* K12 es suficiente para conferir a esta bacteria no patógena la capacidad de formar la lesión A/E (McDaniel&Kaper 1997). De manera interesante, si la isla LEE de EHEC es expresada en este mismo fondo esto no es suficiente para causar la lesión A/E (Elliott, Yu, & Kaper 1999). Este resultado sugiere que existen diferencias, posiblemente regulatorias entre estas 2 islas LEE.

Tabla III. Nomenclatura de los componentes principales de los SST3 en distintas bacterias.

	Función	Nomenclatura Estándar	EPEC	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Yersinia</i>	Flagelo
Estructuras extracelulares	Tanslocón	-	EspD	SipB	IpaB	YopB	-
	Translocón	-	EspB	SipC	IpaC	YopD	-
	Translocón	-	EspA	SipD	IpaD	LcrV	FliC
	Aguja	SctF	EscF	PrgI	MxiH	YscF	-
Cuerpo basal	Anillo de ME	SctC	EscC	InvG	MxiD	YscC	-
	Anillo de MI	SctJ	EscJ	PrgK	MxiJ	YscJ	FliF
	Anillo de MI	SctD	EscD	PrgH	MxiG	YscD	FliF
	Eje interno	SctI	EscI	PrgJ	MxiI	YscI	-
Aparato de exportación y componentes citosólicos	Aparato de exportación	SctR	EscR	SpaP	Spa24	YscR	FliP
	Aparato de exportación	SctS	EscS	SpaQ	Spa9	YscS	FliQ
	Aparato de exportación	SctT	EscT	SpaR	Spa29	YscT	FliR
	Aparato de exportación	SctU	EscU	SpaS	Spa40	YscU	FliB
	Aparato de exportación	SctV	EscV	InvA	MxiA	YscV	FliA
	Plataforma de clasificación	SctQ	EscQ	SpaO	Spa33	YscQ	FliM/FliN
	Plataforma de clasificación	SctK	EscK	OrgA	MxiK	YscK	FliG
	Plataforma de clasificación	SctL	EscL	OrgB	MxiN	YscL	FliH
	ATPasa	SctN	EscN	InvC	Spa47	YscN	FliI
	Tallos central	SctO	EscO	InvI	Spa13	YscO	FliJ
Otro	Regla molecular	SctP	EscP	InvJ	Spa32	YscP	FliK
	Regulador de la secreción	SctW	SepL	InvE	MxiC	YopN	-

Estructura del SST3 de EPEC

El SST3 de EPEC puede ser dividido estructuralmente en 4 partes principales: el cuerpo basal, estructuras extracelulares, aparato de exportación y componentes citoplásmicos (Figura 8).

Cuerpo basal

El llamado cuerpo basal consta de una serie de 3 anillos embebidos en la membrana interna y externa de EPEC los cuales sirven como punto de anclaje para el dispositivo entero. Por esta razón, el cuerpo basal es esencial para el correcto ensamblado de los componentes del inyectisoma y, por ende, es crítico para el funcionamiento de esta maquinaria y para la virulencia de EPEC (Gauthier, Puente, & Finlay 2003; Deng et al. 2004; Valérie F. Crepin et al. 2005).

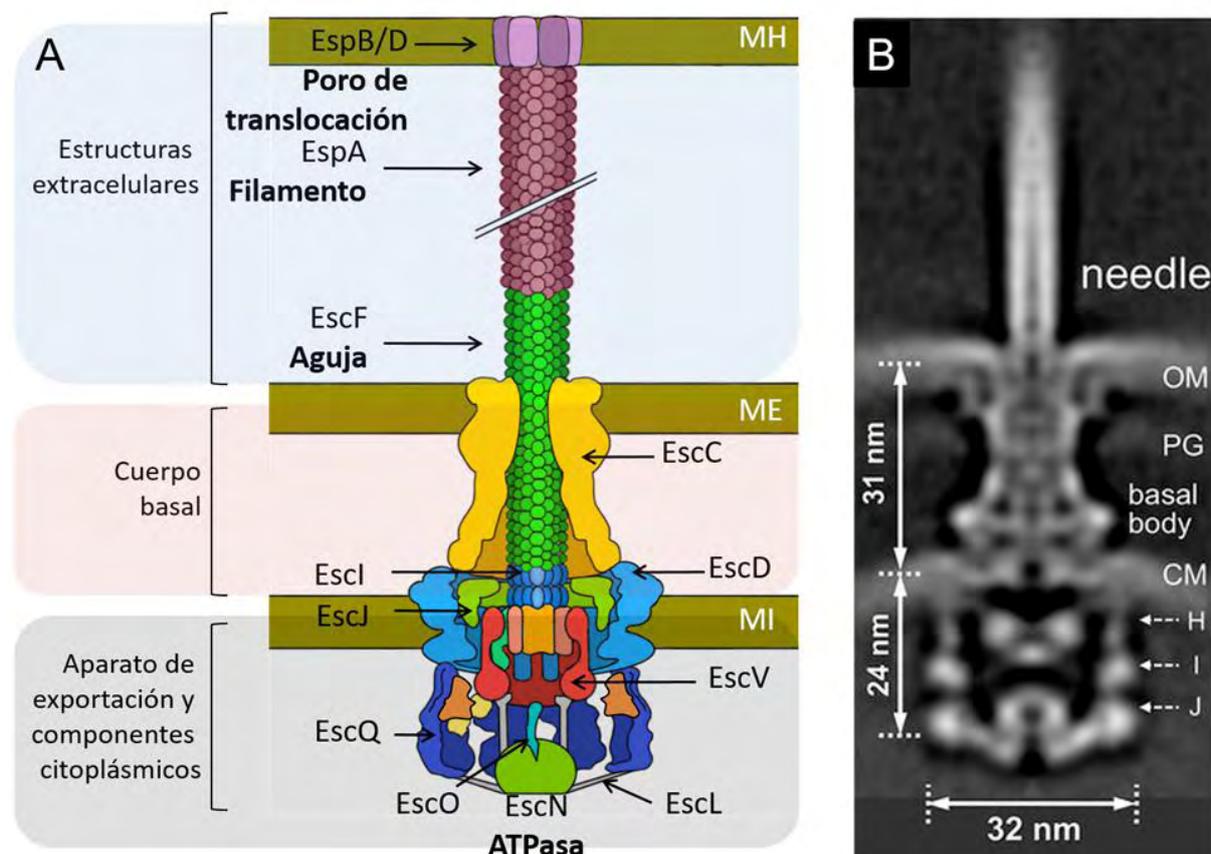


Figura 8. Estructura del SST3. (A) Diagrama esquemático donde se muestra la estructura del inyectisoma de EPEC. Se muestra la división conceptual de “estructuras extracelulares”, “cuerpo basal”, “aparato de exportación” y

“componentes citoplásmicos”. MH, membrana del hospedero; ME, membrana externa bacteriana; MI, membrana interna bacteriana. (B) Reconstrucción del inyectisoma de *S. flexneri* mediante imágenes *in situ* de crio-tomografía electrónica (Hu et al. 2015).

La proteína **EscC** forma el anillo en la membrana externa del cuerpo basal. Esta proteína pertenece a la familia de las secretinas, las cuales son proteínas que forman poros homomultiméricos en la membrana externa de bacterias didermas (Korotkov, Gonen, & Hol 2011). Se cuenta con la estructura resuelta de la región periplásmica de EscC (21-174) (PDB: 3GR5) y experimentos de modelado molecular mostraron que el anillo multimérico estaría formado por entre 12 y 14 subunidades de EscC (Spreter et al. 2009). Los homólogos de EscC pertenecientes a la familia de las secretinas SctC requieren la asistencia de una lipoproteína pequeña conocida como pilotina para ensamblar el multímero de secretina en la membrana (Burkinshaw&Strynadka 2014), sin embargo la secretina de los patógenos A/E carece tanto de pilotina identificada como de dominio de unión a pilotina (Gaytán et al. 2016).

Las proteínas **EscD** y **EscJ** forman un par de anillos concéntricos en la membrana interna. EscD, proteína que forma el anillo exterior, posee una hélice transmembranal, un dominio periplásmico de 260 aa en su C-terminal y un dominio citoplásmico de 120 aa en el N-terminal. Se ha propuesto que el dominio citoplásmico de EscD es importante para localizar a la maquinaria citoplásmica del inyectisoma (Ross&Plano 2011; Barison et al. 2012) mientras que el dominio periplásmico conecta al anillo de membrana interna con el dominio periplásmico de la secretina. Por su parte, EscJ forma sobre la cara periplásmica de la membrana interna un anillo concéntrico al formado por EscD. La estructura de la proteína EscJ de EPEC fue resuelta mediante cristalografía (PDB: 1YJ7) y mediante análisis del empaquetado cristalográfico se propuso que el anillo EscJ podría estar formado por 24 subunidades (Yip et al. 2005). Mientras que los miembros de la familia SctJ poseen un cruce transmembranal en su C-terminal para anclarse a la membrana, EscJ sólo conserva un dominio de lipidación en su N-terminal el cual le permite al anillo de EscJ anclarse a la cara periplásmica de la membrana interna (Gaytán et al.

2016). La secuencia de EscJ muestra similitud significativa con su contraparte flagelar, la proteína del anillo de membrana interna, FliF. Sin embargo, comparaciones estructurales recientes proponen que EscD podría ser también un descendiente evolutivo de FliF (Bergeron 2016).

Estructuras axiales y extracelulares

La aguja es una estructura extracelular formada por la oligomerización helicoidal de la proteína **EscF**. Ésta es una estructura hueca de 23 nm de longitud (Monjaras Feria et al. 2012) con un conducto interno de ~ 2 nm que sirve como canal para el transporte de las proteínas secretadas. Un eje periplásmico formado por la proteína **EscI** ancla la aguja al cuerpo basal (Sal-Man et al. 2012). En *S. enterica* se ha propuesto que 6 subunidades de PrgJ (EscI) forma una vuelta helicoidal para formar este eje (Zilkenat et al. 2016).

En patógenos A/E la aguja es extendida por una estructura filamentosa formada por múltiples subunidades de la proteína **EspA**⁸. Este filamento tiene una longitud promedio de 90 nm y un canal interno de aproximadamente 2.5 nm (Daniell et al. 2003; V. F. Crepin et al. 2005). Un complejo formado por las proteínas **EspB** y **EspD** se asocia en la punta del filamento para formar un poro de translocación. Este complejo hetero-multimérico se inserta en la membrana de la célula hospedera para permitir el paso de las proteínas inyectadas (Tina Ide et al. 2001).

El complejo formado por las proteínas EspA, EspB y EspD es conocido en su conjunto como translocón, ya que si bien en ausencia de este complejo el SST3 es capaz de secretar proteínas al medio, los efectores no pueden ser translocados al interior de la célula hospedera (T. Ide et al. 2001).

⁸Una estructura filamentosa similar a la formada por EspA en patógenos A/E ha sido descrita en otras bacterias como *Bordetella bronchiseptica* (Medhekar et al. 2009). Es de notar también que una búsqueda de homólogos de EspA mediante DELTA-BLAST arroja que otras bacterias con SST3, como *Chromobacterium violaceum* y *Vibrio coralliilyticus*, codifican una proteína similar a EspA. También la proteína SseB codificada en la isla de patogenicidad 2 de *S. enterica* presenta similitud significativa con EspA y, aunque se ha descrito como translocador (Nikolaus et al. 2001), no es claro aún si el inyectisoma codificado por esta isla de *Salmonella* presenta una estructura filamentosa.

Aparato de exportación

Embebido en la membrana interna en el centro del anillo EscD se encuentra el aparato exportación formado por las proteínas **EscU**, **EscV**, **EscR**, **EscS** y **EscT**. Esta serie de proteínas integrales de membrana interna es enteramente esencial para el proceso de secreción. De estas 5 proteínas, EscV y EscU cuentan con dominios citoplásmicos grandes que juegan papeles importantes en el reconocimiento de sustratos que serán secretados a través de esta maquinaria (Thomassin, He, & Thomas 2011). Por un lado, se ha descrito que el dominio citoplásmico de MxiA, homólogo de EscV en *S. flexneri* (Tabla III), forma una estructura toroidal con un total de nueve monómeros en la base del inyectisoma formando la llamada puerta de exportación (Abrusci et al. 2013). Se piensa que el complejo de EscV podría estar formando un canal de protones el cual estaría involucrado en convertir la fuerza protón motriz en trabajo de secreción⁹(Gaytán et al. 2016). En *Salmonella* se ha reportado recientemente la estequiometría de los tres componentes menores del aparato de exportación, el cual contiene 5 subunidades de SpaP (EscR), una subunidad de SpaQ (EscS), una de SpaR (EscT) y una de SpaS (EscU) (Zilkenat et al. 2016). Adicionalmente se ha propuesto que SpaP (EscR) forma un anillo pentamérico y que, junto con el resto de los componentes menores, se encuentra alojado dentro del homonómero formado por InvA (EscV) (Dietsche et al. 2016).

Componentes citoplásmicos

En la base de la puerta de exportación se encuentra el llamado **complejo ATPasa** formado por las proteínas EscN, EscO y EscL. Este complejo es homólogo al que se encuentra en el sistema flagelar formado por las proteínas FliI, FliJ y FliH. Se ha descrito que la hidrólisis de ATP por el complejo ATPasa es necesaria para disociar el complejo sustrato-chaperona permitiendo que la chaperona permanezca en el

⁹ Es notable el hecho de que en el inyectisoma la mayor contribución energética para realizar el trabajo de secreción proviene de la energía protón motriz y no de la hidrólisis de ATP. Tanto en el flagelo como en el SST3 de virulencia se ha demostrado que el abatimiento del gradiente electroquímico afecta drásticamente la secreción de sustratos (Lee et al. 2014; Paul et al. 2008; Minamino et al. 2011). En este mismo sentido, se ha demostrado también que la ATPasa flagelar no es enteramente esencial para la secreción flagelar cuando se elimina a su proteína reguladora FliH o cuando se aumenta la energía protón motriz asociada a la bacteria (Minamino and Namba 2008; Erhardt et al. 2014).

citoplasma y que se lleve a cabo la secreción de los sustratos en un estado semi-desplegado (Akeda&Galán 2005). Adicionalmente, en el sistema flagelar se ha propuesto que el complejo ATPasa funge como un acarreador, dirigiendo los sustratos sintetizados en el citoplasma bacteriano a la base del aparato de exportación flagelar (Bai et al. 2014). **EscN** es la ATPasa del SST3 de EPEC (Andrade et al. 2007; Zarivach et al. 2007) y su actividad catalítica está regulada negativamente por **EscL** y positivamente por **EscO** (Romo-Castillo et al., 2014). Se ha propuesto que esta regulación dual es necesaria para evitar la hidrólisis fútil de ATP antes de que la ATPasa se encuentre estructural y activamente adosada al aparato de exportación del inyectisoma (Bai et al., 2014; Romo-Castillo et al., 2014).

En el sistema flagelar se ha mostrado que la ATPasa FliI se ensambla en un homohexámero y que la formación de este complejo homotípico es estimulada por la proteína FliJ. FliJ se encontraría en el centro del hexámero de EscN posiblemente regulando también su actividad catalítica (Ibuki et al. 2011; Evans et al. 2006). En EPEC, estudios *in silico* permitieron obtener un modelo estructural del complejo EscN₆-EscO (Romo-Castillo et al. 2014) permitiendo visualizar el anillo formado por la ATPasa y el regulador central (Figura 9).

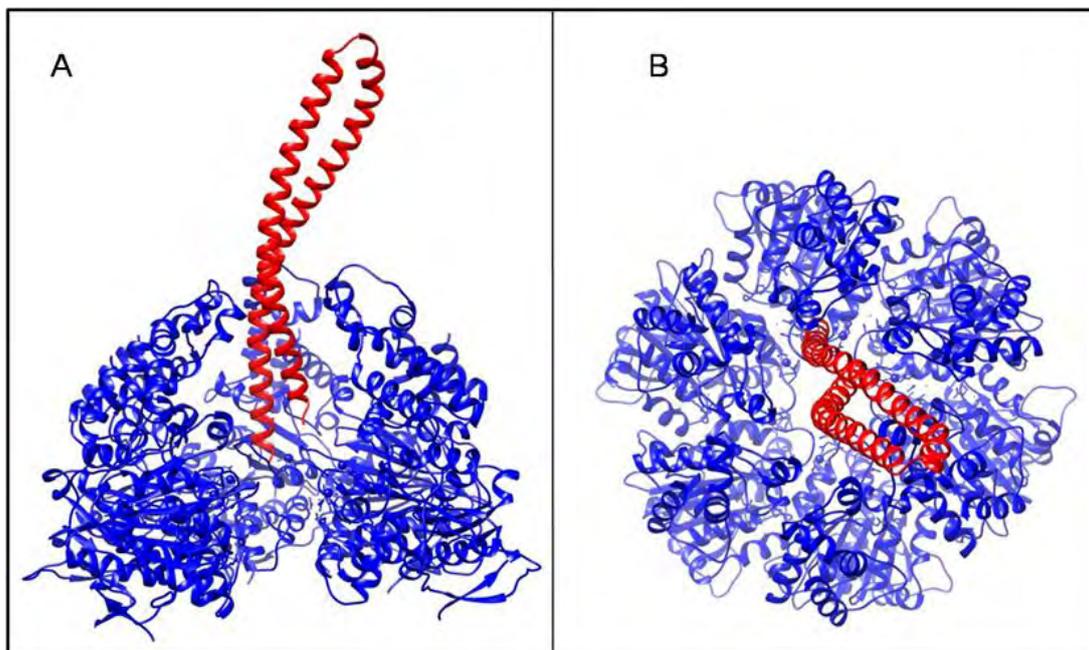


Figura 9. Modelo estructural propuesto de EscO en complejo con el hexámero de EscN. Se modeló el anillo correspondiente al homohexámero de EscN (PDB ID code 2OBL) usando como templado el hetero-hexámero formado por las

subunidades $\alpha 3/\beta 3$ de la F1-ATPasa de la mitocondria de bovino (PDB ID code 1E79). La localización de EscO fue ajustada a la región correspondiente de la subunidad γ de la F1-ATPasa. (A) vista frontal del modelo, (B) vista del modelo desde arriba. La superposición de las estructuras del SST3 de EPEC sobre el complejo de la F1-ATPasa se llevó a cabo usando el módulo MatchMaker de Chimera (Pettersen et al. 2004).

Asociado al cuerpo basal del inyectisoma se encuentra un **anillo citoplásmico (anillo C)** formado en EPEC por las proteínas **EscQ** y **EscL**. Se ha descrito en *Salmonella* que el anillo citoplásmico, además de estar constituido por SpaO y OrgB (homólogos de EscQ y EscL, respectivamente) está formado también por una tercera proteína denominada OrgA. El anillo citoplásmico se encuentra conectado con el cuerpo basal del inyectisoma a través de la interacción con la porción citoplásmica de EscD. Mediante técnicas de crio-tomografía *in situ* se pudo definir que en *Shigella* y en *Salmonella* el anillo consta de seis piezas simétricas arregladas de forma radial (Hu et al. 2015; Makino et al. 2016). El anillo citoplásmico estaría alojando y alineando al hexámero de la ATPasa justo debajo de la puerta de exportación (Figura 10). Los estudios publicados hasta el momento reportan que este anillo citoplásmico de los inyectisomas es esencial para el proceso de secreción (Morita-Ishihara et al. 2006; Lorenz, Hausner, & Büttner 2012; Biemans-Oldehinkel et al. 2011).

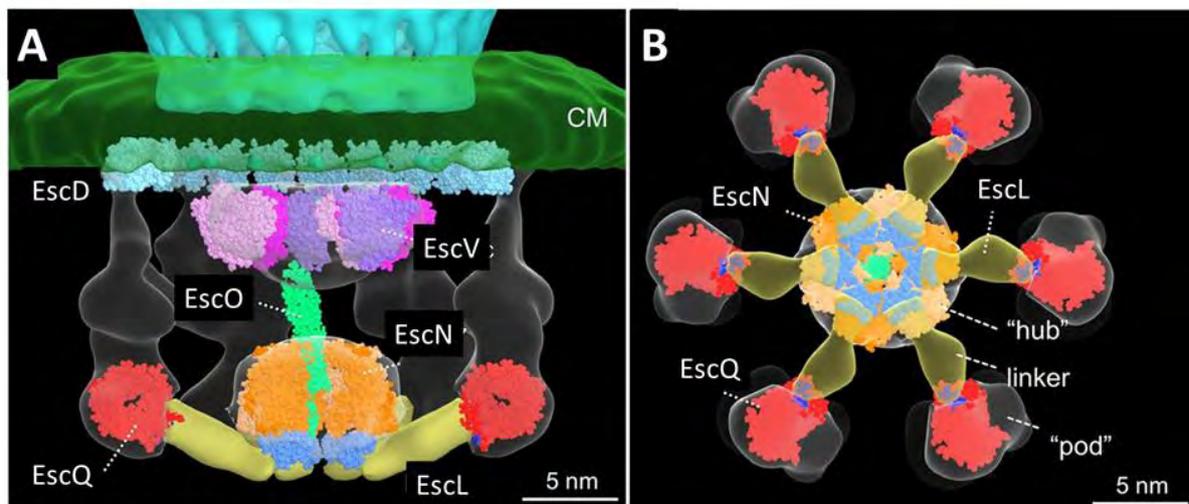


Figura 10. Arquitectura de los componentes citoplásmicos del SST3. Representación superficial de la porción citoplásmica del inyectisoma de *Shigella flexneri* reconstruido a partir de imágenes de crio-tomografía (Hu et al. 2015). Los modelos de distintas proteínas que fueron mapeados en la reconstrucción y se han

indicado con el nombre de sus homólogos en EPEC. (A) Vista frontal y (B) vista desde abajo de la reconstrucción.

En diversos SST3 se ha encontrado que el gen que codifica para el componente mayor del anillo C (la proteína SctQ), contiene un sitio alternativo de traducción por lo que el transcrito correspondiente da lugar a 2 polipéptidos: SctQ completo (SctQ-full) y una versión corta de SctQ que corresponde al carboxilo (SctQ-C). La traducción de ambos transcritos es importante para el ensamblado del inyectisoma en *Yersinia* (Bzymek, Hamaoka, & Ghosh 2012), *Shigella* (McDowell et al. 2016) y *Salmonella* (Notti et al. 2015). En contraste, en EPEC no se ha encontrado que exista un sitio interno de traducción alternativa en EscQ (Biemans-Oldehinkel et al. 2011).

En el flagelo, el anillo citoplásmico (anillo C) se encuentra formado por las proteínas FliG, FliM y FliN. Mientras que FliM y FliN son claramente homólogos a EscQ-full y a EscQ-C, respectivamente, no se ha determinado si existe un homólogo de FliG en el inyectisoma. El anillo C es importante tanto para la exportación de sustratos flagelares y el ensamblaje del flagelo como para la rotación del filamento al estar directamente involucrado en la generación del torque (Yamaguchi et al. 1986; Lloyd&Blair 1997; Gonzalez-Pedrajo et al. 2006). Además de estas dos funciones, se ha visto que el anillo C flagelar funciona como una “copa de afinidad” incrementando la concentración de sustratos alrededor de la base del flagelo. Esta función fue propuesta al observar que si se sobreproducen las proteínas codificadas en los operones flagelares (al expresar copias adicionales del regulador maestro FlhDC), los componentes del anillo C flagelar (FliG, FliM y FliN) dejan de ser necesarios para la secreción de sustratos flagelares (Erhardt&Hughes 2010).

Además de las piezas estructurales anteriormente mencionadas, en el LEE se encuentran codificados otros componentes auxiliares que son necesarios para el correcto ensamblaje y funcionamiento de la maquinaria. La proteína **EscP** funciona como una regla molecular que dictamina la longitud a la cual la aguja, formada por subunidades de EscF, debe de llegar (Monjarás Feria et al. 2012). Esta proteína también participa junto con EscU en el cambio de especificidad de sustratos

(Thomassin et al. 2011), ya que una vez que la aguja ha llegado a su tamaño determinado, se deja de secretar subunidades de EscF para secretar translocadores. También, un complejo heterotrimérico formado por las proteínas **SepL**, **SepD** y **CesL** funge como un interruptor molecular el cual, una vez que el inyectisoma ha hecho contacto con la célula hospedera a través del poro de translocación, deja de promover la salida de translocadores para permitir la salida de efectores (O'Connell et al. 2004).

ANTECEDENTES

El anillo citoplásmico funciona como una plataforma de clasificación

Los SST3 son dispositivos moleculares que se auto-ensamblan¹⁰. Ejemplo de esto es la estructura extracelular del inyectisoma, cuyos componentes axiales y extracelulares (**primero el eje y la aguja y, posteriormente, los translocadores**) requieren ser reconocidos y posteriormente secretados de manera secuencial por la maquinaria de secreción para ensamblarse en el espacio extracelular. Sólo una vez que la estructura extracelular se encuentra enteramente ensamblada, se dicta un **cambio de especificidad** y ahora la maquinaria de secreción reconoce y secreta a los **efectores** para ser translocados al interior del hospedero eucarionte. De hecho todos los sustratos que son reconocidos y secretados por los SST3 tienen una secuencia señal en el extremo N-terminal (comúnmente contenida dentro de los primeros 20 aa) la cual es reconocida por la maquinaria citoplásmica del inyectisoma y que distingue a las proteínas que lo portan como sustrato del SST3 (Munera et al. 2010; Deng et al. 2015).

Es por tanto evidente que debe de existir un mecanismo de control en la temporalidad de la secreción de los sustratos. En *Salmonella* se propuso que el

¹⁰ Auto-ensamblado es un proceso en el cual los componentes pre-existentes forman una supra-estructura organizada debido a las interacciones entre sus componentes sin necesidad de una dirección externa.

complejo heterotrimérico (SpaO/OrgA/OrgB) de alto peso molecular y que forma el anillo citoplásmico, participa directamente en esta labor (Lara-Tejero et al. 2011; Hu et al. 2015). Se propone que los componentes del anillo citoplásmico reconocen **primeramente** a los componentes **tempranos (eje y aguja)** para ser secretados y una vez que estas estructuras se ensamblaron, el anillo C reconoce a los sustratos **intermedios (translocadores)** para ser secretados y, nuevamente, sólo una vez que el translocón está totalmente formado, ahora el anillo C reconoce a los sustratos **tardíos (efectores)** para ser translocados a la célula eucarionte (Lara-Tejero et al. 2011) (Figura 11). Para denotar esta nueva función del **anillo C** descrita en los inyectisomas se le renombró como **plataforma de clasificación** (Lara-Tejero et al. 2011).

Es importante mencionar que en *Salmonella* se detectó que la asociación diferencial de las distintas categorías de sustratos (tempranos, intermedios y tardíos) a la plataforma de clasificación esta mediada por el interruptor molecular homólogo a SepL/SepD/CesL (Lara-Tejero et al. 2011).

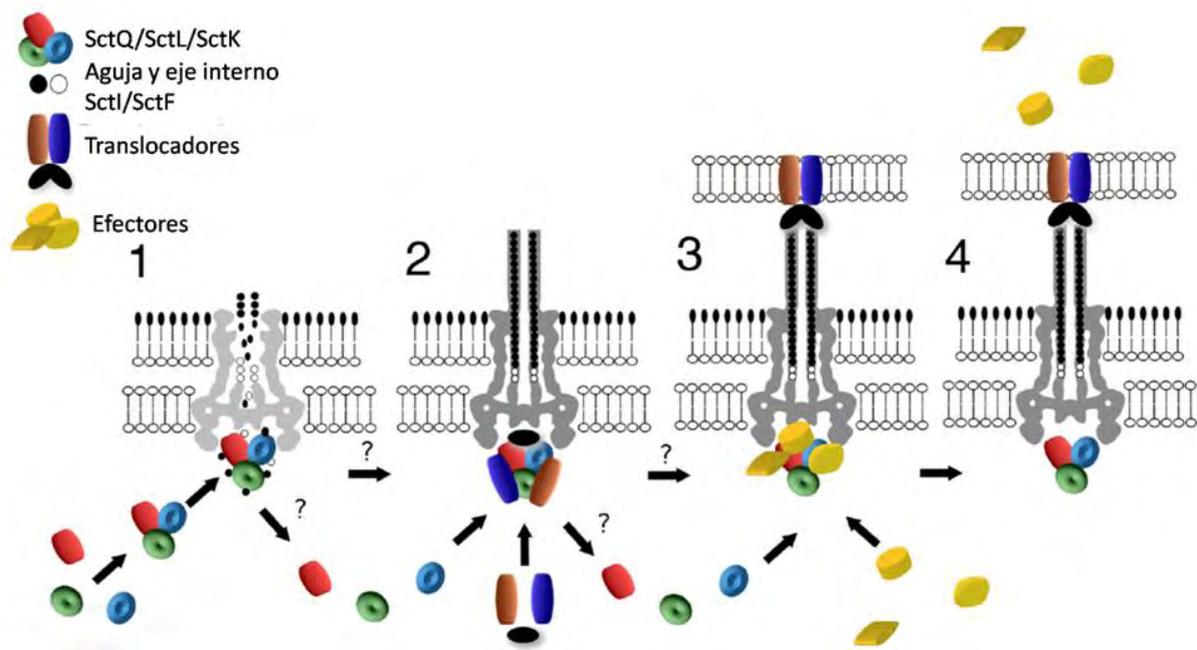


Figura 11. Papel de la plataforma de clasificación en el ensamblaje del inyectisoma. 1) Una vez que el cuerpo basal y el aparato de exportación se encuentran ensamblados en la membrana de la bacteria, el complejo de alto peso molecular formado por las proteínas de la familia SctQ/SctL/SctK se ensamblan en la base del inyectisoma para formar la plataforma de clasificación. Esta estructura es

inicialmente cargada con los sustratos tempranos (eje y aguja) para promover su secreción y posterior ensamblaje en el espacio extracelular. 2) Cuando el eje y la aguja han sido ensamblados, los sustratos intermedios (translocadores) se unen a la plataforma de clasificación para ser la siguiente categoría de sustratos secretada. 3) Una vez que el translocón se ha ensamblado, los sustratos tardíos se asocian con la plataforma en espera de ser secretados. 4) Una vez que se establece el contacto directo con la célula hospedera se da la señal para que los sustratos posados en la plataforma sean translocados a la célula eucarionte. Modificado de (Lara-Tejero et al. 2011).

Las proteínas del anillo C/plataforma de clasificación han sido de los componentes menos estudiados en los inyectisomas bacterianos. En *S. flexneri* se encontró que Spa33 (Tabla III) interacciona con MxiK y MxiN y que a su vez éstos interaccionan con la ATPasa Spa47 (Jouihri et al. 2004). En este mismo trabajo se reportó que MxiK y MxiN son esenciales para la secreción de proteínas vía SST3 pero que la sobre-producción del eje y de la aguja restauran parcialmente la secreción de sustratos en los fondos $\Delta mxiK$ o $\Delta mxiN$, respectivamente (Jouihri et al. 2004). En *Y. pestis*, YscQ, YscL y YscK forman un complejo heterotrimérico que estaría interaccionando a su vez con la ATPasa YscN (Jouihri et al. 2004; Jackson&Plano 2000).

En fechas recientes, la revaloración del anillo citoplásmico como actor importante en la jerarquización de sustratos, ha despertado el interés de varios grupos para desentrañar la importancia de este complejo en el proceso de secreción. Recientemente se reportó en *Y. enterocolitica* que *in vivo*, la proteína YscQ, el componente mayoritario del anillo C, se encuentra en dos poblaciones distintas: una poza citoplásmica y una población adosada a la base del inyectisoma (Diepold et al. 2015). Se encontró que existe un intercambio altamente dinámico entre estas dos poblaciones de YscQ y que la tasa de intercambio entre éstas es significativamente mayor en condiciones de secreción (Figura 12). Esto último sugiere una relación funcional entre la dinámica del anillo C y el proceso de exportación de sustratos vía SST3.

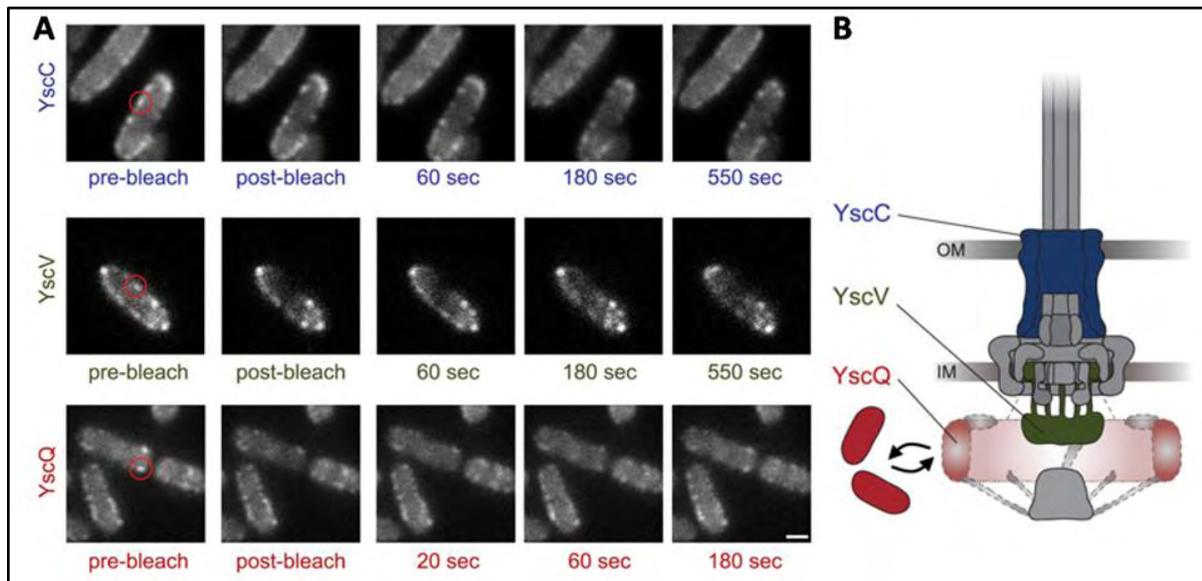


Figura 12. El anillo C es un complejo dinámico. (A) La proteína YscC (EscC en EPEC) del cuerpo basal, YscV (EscV) del aparato de exportación y YscQ (EscQ) del anillo C fueron etiquetadas con un reportero fluorescente. Se seleccionaron puntos fluorescentes de cada estructura, que representan a los complejos ensamblados, y fueron fotoblanqueados para seguir la recuperación de la fluorescencia a través del tiempo. Mientras que no se observa recuperación para YscC ni para YscV, para YscQ se observa que se recupera la intensidad fluorescente justo en el punto donde se fotoblanqueó. (B) Esto indica que mientras YscC y YscV son componentes más bien estáticos de la estructura del inyectisoma, YscQ es un componente dinámico en constante intercambio de subunidades con una poza citoplásmica (Diepold et al. 2015).

El LEE contiene marcos de lectura sin función asignada

Si bien prácticamente todos los marcos de lectura contenidos dentro del LEE tienen una función asignada, ya sea por extrapolación funcional (Deng et al. 2004) o por caracterización individual, a la fecha no se ha determinado la función específica que tanto el gen *rorf1* del LEE6 como el gen *orf4* del LEE1 (Figura 7) desempeñan en el inyectisoma de EPEC.

La proteína codificada por el gen *orf4* no tiene anotación funcional

La proteína codificada por el gen *orf4* consta de 199 aminoácidos con una masa molecular predicha de 23.4 kDa y un punto isoeléctrico de 7.64. No se predice secuencia señal típica de translocación vía Sec o Tat, ni cruces transmembranales

dentro de esta proteína. La región 3' del gen *orf4* se encuentra traslapada con el inicio del gen *escL*, lo que podría sugerir una relación funcional entre las proteínas codificadas por estos genes (Johnson&Chisholm 2004).

En un estudio donde se buscaba detectar genes importantes para la virulencia de *C. rodentium* en ratón, mediante inserción de transposones etiquetados, se encontró que al interrumpir el gen *orf4* de la isla LEE de *C. rodentium*, la virulencia de este patógeno se veía fuertemente atenuada (Mundy et al. 2003). Posteriormente, en otro estudio donde de manera sistemática se eliminó a cada uno de los 41 genes de la isla LEE de *C. rodentium* (Deng et al. 2004), se encontró que la mutante $\Delta orf4$ de *C. rodentium* tiene un defecto general en la secreción de sustratos vía SST3, por lo que se propuso que la proteína codificada por este gen podría ser un componente estructural del SST3.

A pesar de que estos antecedentes indican que la proteína codificada por el gen *orf4* es un componente crítico para el SST3 -y por ende para la virulencia de los patógenos A/E-, no existe más información acerca del papel que esta proteína desempeña en la biogénesis o funcionamiento del SST3. Es por esto que en este trabajo proponemos dilucidar la función que esta proteína lleva a cabo en los mecanismos de virulencia de EPEC.

JUSTIFICACIÓN

Hoy en día los patógenos bacterianos siguen siendo una importante causa de morbilidad y mortalidad, sobretodo en países no industrializados. Se prevé en que en el año 2050 las infecciones microbianas van a ocasionar más muertes en humanos que las derivadas por cáncer, en gran parte debido al surgimiento de bacterias patógenas multiresistentes a los antibióticos existentes (Review on Antimicrobial Resistance 2014). En este sentido, a principios del 2017 la Organización Mundial de la Salud publicó una lista de 10 familias de bacterias para las cuales se requieren nuevos antibióticos de manera urgente (Vogel 2017). De esta lista, 4 grupos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*¹¹, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) cuentan con SST3.

El SST3 es clave para la virulencia de numerosos patógenos bacterianos. Mientras que el cuerpo basal y las estructuras extracelulares de estas maquinarias son componentes ampliamente estudiados, la función y estructura de los componentes citoplásmicos han sido poco estudiadas. Aunado a esto, para aspirar a desarticular los mecanismos de virulencia bacterianos es de vital importancia entender la función precisa de cada una de las piezas que los conforman.

En este trabajo caracterizamos la función de la proteína EscK, un componente crítico del SST3 de EPEC del que hasta la fecha se desconoce su papel específico.

¹¹ Entre las especies bacterianas de la familia *Enterobacteriaceae* incluidas en la lista de la OMS se encuentran *Klebsiella pneumonia*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., y *Morganella* spp.

HIPÓTESIS

La proteína codificada por el gen *orf4* de la isla de patogenicidad LEE desempeña un papel importante en el funcionamiento o ensamblaje del SST3 de EPEC, probablemente fungiendo como un componente de la plataforma de clasificación.

OBJETIVO GENERAL

Dilucidar el rol funcional que tiene de la proteína Orf4 en el ensamblaje y funcionamiento del SST3 de EPEC.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar la contribución directa de Orf4 al funcionamiento del SST3 de EPEC.
- Definir si existen interacciones proteína-proteína entre Orf4 y algún otro componente del SST3.
- Determinar la sub-localización celular de Orf4 en EPEC.
- Identificar residuos importantes para la función de esta proteína.

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento de cepas bacterianas. Las distintas cepas de bacterias empleadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 1 y se crecieron en LB (10 g/l de triptona de caseína, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl) a 37 °C y 250 rpm de agitación. Para los ensayos de secreción, las cepas de EPEC se crecieron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) a 37 °C en estático bajo un atmósfera de 5% de CO₂. Cuando se requirió se usaron los siguientes antibióticos: ampicilina (Ap, 100 µg/ml), cloranfenicol (Cm, 25 µg/ml), estreptomycin (Sm, 25 µg/ml), kanamicina (Km, 50 µg/ml) o tetraciclina (Tc, 25 µg/ml).

Tabla 1. Cepas y plásmidos usados en este estudio

Cepa o plásmido	Descripción	Fuente o referencia
EPEC		
E2348/69	Cepa silvestre de EPEC O127:H6 E2348/69; Sm ^r	(Levine 1978)
$\Delta escN$	E2348/69 con eliminación en marco del gen <i>escN</i> ; Sm ^r	(Gauthier, Puente, & Finlay 2003)
$\Delta escU$	E2348/69 con eliminación en marco del gen <i>escU</i> ; Sm ^r	Norma Espinosa
$\Delta escK$	E2348/69 con eliminación en marco del gen <i>escK</i> ; Sm ^r Km ^r	Miguel Díaz
$\Delta escQ$	E2348/69 con eliminación en marco del gen <i>escQ</i> ; Sm ^r Km ^r	Norma Espinosa
$\Delta escL$	E2348/69 con eliminación en marco del gen <i>escL</i> ; Sm ^r Km ^r	Norma Espinosa
$\Delta escK\Delta escL$	E2348/69 doble mutante con eliminación en marco de los genes <i>escK</i> y <i>escL</i> ; Sm ^r Km ^r	Este estudio
$\Delta escK\Delta escQ$	E2348/69 doble mutante con eliminación en marco de los genes <i>escK</i> y <i>escQ</i> ; Sm ^r Km ^r	Norma Espinosa
$\Delta escN\Delta escK$	E2348/69 doble mutante con eliminación en marco de los genes <i>escN</i> y <i>escK</i> ; Sm ^r Km ^r	Norma Espinosa
Δler	E2348/69 con eliminación en marco del gen <i>ler</i> ; Sm ^r Km ^r	(Bustamante et al. 2011)
<i>escQ</i> ::3xFLAG	E2348/69 expresando EscQ etiquetado con 3xFLAG-tagged en cromosoma; Sm ^r Km ^r	Este estudio
$\Delta escKescQ$::3xFLAG	E2348/69 $\Delta escK$ expresando EscQ etiquetado con 3xFLAG-tagged en cromosoma; Sm ^r Km ^r	Este estudio

<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)/pLysS (BDP)	Cepa de expresión de proteínas; Cm ^r	Novagen
XL1-Blue	Cepa para clonación; Tc ^r	Stratagene
Top10	Cepa para clonación; Sm ^r	Invitrogen
<i>S. cerevisiae</i>		
PJ69-4a/α	<i>MATa/α trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4D gal80D LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	(MacDonald 2001)
Plásmidos		
pET19b	Vector de expresión, que bajo el promotor T7 expresa proteínas con una etiqueta de 10 histidinas en el N-terminal; Ap ^r	Novagen
pTrc99A	Vector de expresión bajo el promotor <i>trc</i> ; Ap ^r	Amersham-Pharmacia
pTrc99AFF4	Vector de expresión modificado de pTrc99A; Ap ^r	(Ohnishi et al. 1997)
pMAL-c2x	Vector de expresión, que bajo el promotor <i>tac</i> expresa proteínas con una etiqueta de MBP en el N-terminal; Ap ^r	New England Biolabs
pGEX-4T-2	Vector de expresión, que bajo el promotor <i>tac</i> expresa proteínas con una etiqueta de GST en el N-terminal; Ap ^r	GE Healthcare
pTOPO-2HA	Vector derivado del pCR2.1-TOPO que contiene clonado el gen <i>espG</i> de <i>C. rodentium</i> fusionado a dos epítopes de HA en el C-terminal; Ap ^r Km ^r	(Deng et al. 2004)
pBAD/myc-His A	Vector de expresión, que bajo el promotor <i>araBAD</i> expresa proteínas con una etiqueta híbrida de Myc-His en el C-terminal; Ap ^r	Invitrogen
pGBKT7	Vector de doble híbrido en levadura que contiene el dominio de unión a DNA de GAL4; <i>TRP1</i> ; Km ^r	Clontech
pGADT7	Vector de doble híbrido en levadura que contiene el dominio de activación de GAL4; <i>LEU1</i> ; Ap ^r	Clontech
pKD46	Plásmido termosensible de expresión de la recombinasa Red, promotor <i>araBAD</i> ; Ap ^r	(Datsenko&Wanner 2000)
pKD4	Plásmido usado como templado para amplificar el casete de kanamicina para la generación de mutantes nulas; Ap ^r	(Datsenko&Wanner 2000)
pFLP2	Vector del sistema de expresión de la recombinasa Fip; Ap ^r	(Hoang et al. 1998)
pSUB11	Plásmido usado como templado para amplificar el casete de kanamicina para etiquetar con el epítipo de 3FLAG; Ap ^r	(Uzzau et al. 2001)
pAEo4	<i>His-escK</i> clonado en pET19b, sitios de restricción NdeI-BamHI	Este estudio
pAEo4-W26A	<i>His-escK</i> W26A clonado en pET19b	Este estudio
pAEo4-L93A	<i>His-escK</i> L93A clonado en pET19b	Este estudio

pAEo4-D100A	<i>His-escK</i> D100A clonado en pET19b	Este estudio
pAEo4-Y101A	<i>His-escK</i> Y101A clonado en pET19b	Este estudio
pAEo4-F103A	<i>His-escK</i> F103A clonado en pET19b	Este estudio
pAEo4-S104A	<i>His-escK</i> S104A clonado en pET19b	Este estudio
pAEo4-Y107A	<i>His-escK</i> Y107A clonado en pET19b	Este estudio
pAEo4-R108A	<i>His-escK</i> R108A clonado en pET19b	Este estudio
pAEo4-Q122A	<i>His-escK</i> Q122A clonado en pET19b	Este estudio
pAEo4-P171A	<i>His-escK</i> P171A clonado en pET19b	Este estudio
pMTHo4	<i>His-escK</i> clonado en pTrc99A, sitios de restricción Ndel-BamHI	Este estudio
pMTHo4-W26A	<i>His-escK</i> W26A clonado en pTrc99A	Este estudio
pMTHo4-L93A	<i>His-escK</i> L93A clonado en pTrc99A	Este estudio
pMTHo4-D100A	<i>His-escK</i> D100A clonado en pTrc99A	Este estudio
pMTHo4-Y101A	<i>His-escK</i> Y101A clonado en pTrc99A	Este estudio
pMTHo4-F103A	<i>His-escK</i> F103A clonado en pTrc99A	Este estudio
pMTHo4-S104A	<i>His-escK</i> S104A clonado en pTrc99A	Este estudio
pMTHo4-Y107A	<i>His-escK</i> Y107A clonado en pTrc99A	Este estudio
pMTHo4-R108A	<i>His-escK</i> R108A clonado en pTrc99A	Este estudio
pMTHo4-Q122A	<i>His-escK</i> Q122A clonado en pTrc99A	Este estudio
pMTHo4-P171A	<i>His-escK</i> P171A clonado en pTrc99A	Este estudio
pSLo4	<i>MBP-escK</i> clonado en pMAL-c2x, sitios de restricción BamHI-HindIII	Este estudio
pSLo4-D100A	<i>MBP-escK</i> D100A clonado en pMAL-c2x	Este estudio
pSLo4-Y101A	<i>MBP-escK</i> Y101A clonado en pMAL-c2x	Este estudio
pSLo4-Y107A	<i>MBP-escK</i> Y107A clonado en pMAL-c2x	Este estudio
pSLo4-R108A	<i>MBP-escK</i> R108A clonado en pMAL-c2x	Este estudio
pArGsQ	<i>GST-escQ</i> clonado en pGEX-4T-2	Arianne
pJHnD	<i>nleD-HA</i> clonado en pTOPO-2HA con su RBS nativo	(Monjarás Feria et al. 2012)
pJHmap	<i>map-HA</i> clonado en pTOPO-2HA con su RBS nativo	(Monjarás Feria et al. 2012)
pJHtir	<i>tir-HA</i> clonado en pTOPO-2HA con su RBS nativo	(Monjarás Feria et al. 2012)
pJHeH	<i>espH-HA</i> clonado en pTOPO-2HA con su RBS nativo	(Monjarás Feria et al. 2012)
pJHnC	<i>nleC-HA</i> clonado en pTOPO-2HA con su RBS nativo	(Monjarás Feria et al. 2012)
pSHeA	<i>espA-HA</i> clonado en pTOPO-2HA con su RBS nativo	Este estudio
pSHo4	<i>escK-HA</i> clonado en pTOPO-2HA con su RBS nativo	Este estudio
pGBKT7-LAM	Dominio de unión de GAL4 fusionado a la laminina C de humano	Clontech
pGBKT7-53	Dominio de unión de GAL4 fusionado a p53 de ratón	Clontech
pGADT-T7	Dominio de activación de GAL4 fusionado al antígeno SV40	Clontech
pSGBKo4	<i>escK</i> clonado en pGBKT7, sitios de restricción Ndel-BamHI	Este estudio
pSGBKo4-D100A	<i>escK</i> D100A clonado en pGBKT7	Este estudio
pSGBKo4-Y101A	<i>escK</i> Y101A clonado en pGBKT7	Este estudio
pSGBKo4-Y107A	<i>escK</i> Y107A clonado en pGBKT7	Este estudio
pSGBKo4-R108A	<i>escK</i> R108A clonado en pGBKT7	Este estudio
pSGADeQ	<i>escQ</i> clonado en pGADT7	Este estudio

pBT263	Plásmido usado como templado para amplificar el gen <i>sfgfp</i> (super folder green fluorescent protein)	(Uehara, Dinh,&Bernhardt 2009)
pVBeK	<i>escK</i> clonado en pBAD/myc-His A	Este estudio
pVBeQ	<i>escQ</i> clonado en pBAD/myc-His A	Este estudio
pVBeL	<i>escL</i> clonado en pBAD/myc-His A	Este estudio
pSBeK-GFP	<i>escK-sfGFP</i> clonado en pBAD/myc-His A	Este estudio
pSBeQ-GFP	<i>escQ-sfGFP</i> clonado en pBAD/myc-His A	Este estudio
pSBeL-GFP	<i>escL-sfGFP</i> clonado en pBAD/myc-His A	Este estudio

Manipulación de DNA. Los genes se amplificaron mediante PCR de DNA cromosomal. Los productos amplificados se purificaron con estuches comerciales, se digirieron con las enzimas indicadas y se ligaron en vectores digeridos con las mismas enzimas. Todas las enzimas se utilizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Todas las construcciones generadas se secuenciaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Mutagénesis sitio dirigida. Para la generación de las mutaciones puntuales se siguieron las instrucciones proporcionadas en el estuche QuikChange. Se diseñaron oligonucleótidos complementarios con la mutación deseada de manera que se empalmaran en la zona donde se desea la mutación. Cuando fue posible, se introdujo un sitio de restricción silencioso al diseñar los oligonucleótidos mutagénicos con el software SDM-assist (Karnik, Karnik,&Grefen 2013). Esta estrategia permite una identificación rápida de las construcciones con las mutaciones. Como templado para el PCR se usaron las construcciones pAEo4 y pSLo4. Las reacciones de PCR se incubaron con la enzima DpnI a 37°C durante 2 h para digerir el plásmido parental metilado y las reacciones se transformaron en células competentes de *E. coli* XL1 recién preparadas. Todas las mutaciones puntuales se verificaron por secuenciación.

Generación de mutantes nulas y cepas etiquetadas en el cromosoma. Las mutantes no polares de EPEC se generaron usando el sistema de recombinación homóloga del fago λ (Datsenko&Wanner 2000). Brevemente, un fragmento de PCR que contiene el casete de resistencia a kanamicina se amplificó usando como templado el plásmido pKD4 y un par de oligonucleótidos que se encuentran flanqueados por secuencias homólogas a los extremos del gen que se desea eliminar. Los productos de PCR amplificados se purificaron con el estuche comercial “PCR purification” de Qiagen. De manera paralela, se transformó el plásmido pKD46 en la cepa de EPEC sobre la cual se quiere hacer la interrupción del gen

deseado. En esta cepa se indujo la expresión del sistema de recombinación codificado en pKD46 con 0.1 M de arabinosa y se hicieron electrocompetentes con estas células. Los fragmentos del casete purificado se electroporaron en estas electrocompetentes y después de recuperarse a 37 °C se sembraron en cajas de medio LB adicionado con kanamicina e incubadas a 37 °C durante 12 h. Las mutantes se seleccionaron por su resistencia a kanamicina (indicando que el casete se había integrado al cromosoma) y por su sensibilidad a ampicilina (indicando que el plásmido pKD46 había sido perdido). Para la obtención de las dobles mutantes, se escindió el casete de kanamicina de la mutante sencilla correspondiente usando el plásmido auxiliar pFLP2, el cual expresa la recombinasa FLP (Hoang et al. 1998). El segundo intercambio alélico se llevó a cabo como se describió anteriormente. Las cepas etiquetadas en cromosoma se obtuvieron mediante una variación del método de recombinación homóloga del fago λ usando el plásmido pSUB11 como templado (Uzzau et al. 2001).

Tanto las mutantes nulas como las cepas etiquetadas en cromosoma se verificaron mediante PCR. Es importante mencionar que todas las mutantes usadas en este estudio son mutantes no polares¹² ya que al introducir una construcción que expresa el gen eliminado correspondiente, se restaura la secreción silvestre de la cepa en cuestión.

Ensayos de secreción. Se inoculó un precultivo de 2 ml de LB con los antibióticos correspondientes y la cepa deseada. El inóculo se dejó crecer a 37 °C en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon 6 ml de DMEM (el medio fue previamente equilibrado a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂) con una dilución 1:50 del precultivo y se dejó crecer este cultivo en estático a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ hasta alcanzar una DO₆₀₀ de entre 0.8 y 1. Se tomó una muestra de 4 ml del cultivo. Cada muestra se centrifugó a 12 000 x g durante 5 min y se recuperó el sobrenadante, mientras que la pastilla celular resultante se resuspendió en 200 μ l x la DO₆₀₀ de amortiguador de carga SDS y se guardó para su análisis posterior. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron con 10% de ácido tricloroacético (TCA, 10% v/v) toda la noche a 4 °C. Al día siguiente las proteínas precipitadas del sobrenadante se concentraron centrifugando la muestra a 16 863 x g durante 30 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla de proteínas se resuspendió en 40 μ l x la DO₆₀₀ de amortiguador de carga adicionado con 2 μ l de Tris-HCl saturado para neutralizar los residuos de TCA sobrantes en la muestra.

Para los experimentos de dominancia negativa, los precultivos de las cepas de EPEC silvestre transformadas con el plásmido correspondiente fueron diluidos 1:50 en DMEM tal

¹² Una mutación polar es aquella que afecta a los genes río abajo del gen mutado.

como se indica arriba. Cuando los cultivos llegaron a una DO_{600} de 0.4 se añadió 0.02 mM de IPTG a todas las cepas. El experimento continuó como se describe arriba.

Ensayos de hemólisis. Se obtuvieron 6 ml de sangre de voluntarios humanos. La sangre se trató con 1% EDTA (w/v) pH 7.5 para evitar su coagulación. La muestra de sangre se centrifugó (3 500 g, 15 min) a temperatura ambiente (TA) para concentrar a los eritrocitos. Después, la muestra de eritrocitos se lavó 3 veces con un volumen de solución salina NaCl 0.9% (w/v) centrifugando a 1 000 x g por 10 min a TA. Con esta muestra se preparó una solución de eritrocitos diluidos al 4% en DMEM.

Un día previo, se puso un precultivo en LB con antibiótico con la cepas correspondiente de EPEC. Al día siguiente se inocularon 4 ml de DMEM con el precultivo con una relación 1:50. Se crecieron la cepas de EPEC en DMEM hasta una $DO_{600} \sim 0.4$ para permitir el ensamblaje del inyectisoma. Posteriormente se mezclaron 0.5 ml de la solución de 4% eritrocitos con 0.5 ml de los cultivos de EPEC. Esta mezcla se centrifugó a 2 500 xg por 1 min para favorecer el contacto bacteria-glóbulo rojo y se incubó a 37 °C durante 4 horas adicionales. Posteriormente, la mezcla se centrifugó nuevamente a 12 000 x g durante 1 min y la pastilla de células se resuspendió suavemente para favorecer la liberación de hemoglobina. La hemoglobina liberada al medio se cuantificó mediante espectrofotometría midiendo la DO_{450} del sobrenadante. Para sustraer la hemólisis de fondo de la cuantificación, se usó como blanco una muestra de eritrocitos tratada de la misma manera pero incubada con células BL21 no patogénicas. Los resultados mostrados se llevaron a cabo en duplicado en al menos 3 ocasiones independientes.

Ensayo de interacción de proteínas mediante doble híbrido en levadura. Este sistema se basa en la modularidad del factor de transcripción GAL4 el cual posee dos módulos funcionales, uno de unión a DNA y otro de activación, que necesariamente deben de estar espacialmente cercanos para que GAL4 sea funcional. La estrategia consiste en separar los dominios funcionales de este factor de transcripción y fusionarlos a las proteínas de interés "X" y "Y" respectivamente. Sólo si "X" y "Y" interaccionan de manera directa, los dominios individuales de unión y activación se encontrarán cercanos y se reconstituye la actividad del factor GAL4 (Figura 13). Esta reconstitución se aprovecha para activar la transcripción de genes reporteros (*ADE*, *HIS3*, *lacZ*, *MEL1*).

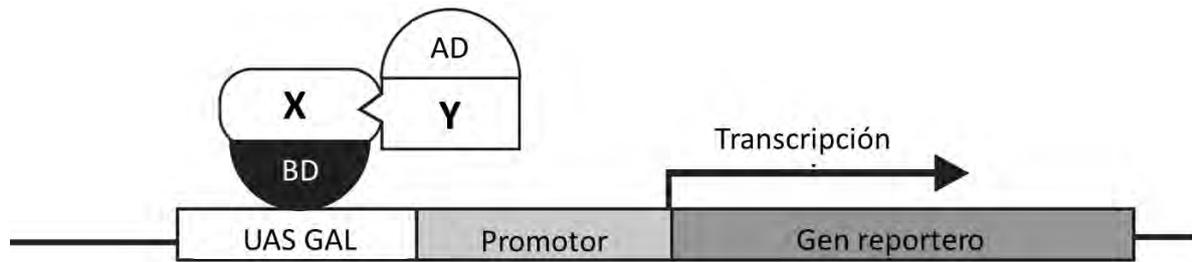


Figura 13. Diagrama que esquematiza el principio básico del sistema de doble híbrido de levadura para probar interacción entre dos proteínas. Para que GAL4 sea funcional, el dominio de unión y el de activación deben de estar espacialmente cercanos. BD, dominio de unión a DNA; AD, dominio de activación, UAS, secuencia río arriba activadora (del inglés *upstream activation sequence*).

Para estos ensayos las construcciones basadas en los plásmidos pGBKT7 y pGADT7 (ver Tabla 1) se transformaron en las cepas de levadura PJ69-4 α (MAT- α) y PJ69-4a (Mat-a) siguiendo el protocolo de transformación con acetato de litio (Sherman, Fink, & Hicks 1986). Brevemente, se creció un pre-cultivo de cada levadura en medio YPD (20 g/l de triptona de caseína, 10 g/l extracto de levadura, 2% glucosa) durante toda la noche a 30°C. Al día siguiente con este pre-cultivo se inoculó 1:50 un cultivo más grande de 20 ml de YPD y se creció a 30°C en agitación hasta una DO₆₀₀ de 1. Por cada transformación se tomaron 1.5 ml del cultivo y se centrifugaron para cosechar las levaduras. Se lavaron las células con 1 ml de H₂O estéril y se resuspendieron en 1 ml de acetato de litio (LiAc) 0.1 M para dejar incubando a TA durante 10 min. Posteriormente las células se cosecharon por centrifugación y se les agregó a las células la siguiente mezcla:

- 240 μ l PEG 3500 50% w/v
- 36 μ l de LiAc 1 M
- 7 μ l de esperma de salmón
- 2 μ l de plásmido
- 80 μ l de H₂O

La mezcla se incubó durante 45 min a 42°C y posteriormente se cosecharon las células por centrifugación, se desechó el sobrenadante y las levaduras resultantes se resuspendieron en 500 μ l de H₂O estéril de los cuales 150 μ l se sembraron en cajas de medio SD -Leu (cepas transformadas con pGADT7) o SD -Trp (cepas transformadas con pGBKT7). Las levaduras se dejaron crecer en estas cajas a 30°C durante 3 días. Una vez obtenidas las colonias correspondientes, se realizó el apareamiento para obtener células diploides, para

esto se transfirieron un par de colonias de las cepas con la construcción pGADT7 y pGBKT7 de interés en medio YPD líquido y se dejaron crecer a 30°C en agitación (250 rpm) por 4 h. Para seleccionar células diploides co-transformadas con ambas construcciones se tomó 1 ml del cultivo, se cosecharon las levaduras mediante centrifugación, se lavaron con 1 ml de H₂O estéril y se resuspendieron en 500 µl de H₂O, de lo cual se tomaron 200 µl para sembrar en cajas -Leu-Trp y se dejaron crecer a 30°C durante 3 días. Una vez obtenidas las células diploides co-transformadas, se picó una colonia de la co-transformación de interés en medio SD -Leu -Trp líquido y se creció toda la noche a 30°C. Al día siguiente, se tomó 1 ml del cultivo, se cosecharon las levaduras por centrifugación, se lavaron con 1 ml de H₂O estéril y se resuspendieron en 1 ml ajustando por la DO₆₀₀ de cada cultivo. Se realizaron diluciones seriadas con un factor de 10 de la cepa de interés colocando una gota de 3 µl sucesivamente en cajas SD -Leu -Trp (sin leucina y sin triptófano) para verificar la presencia de ambas construcciones, o en cajas SD -Leu -Trp -His -Ade (sin leucina, triptófano, histidina y sin adenina) para probar la actividad de los genes reporteros. Las cajas con las diluciones seriadas se dejaron crecer a 30°C durante 5-7 días.

Ensayos de co-purificación. Las plásmidos que codifican para las proteínas MBP-EscK (codificada en el plásmido pSLo4), MBP (pMAL-c2x), GST-EscQ (pArGsQ) y GST (pGEX-4T-2) se transformaron en la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3)pLysS (BDP). Para la inducción de proteínas se inoculó un cultivo de 200 ml de LB con un precultivo de cada cepa en una relación 1:50 y se dejó crecer cada cultivo a 37°C en agitación hasta una DO₆₀₀ de entre 0.6 y 0.8. La producción de proteínas se indujo entonces con 0.2 mM de IPTG y se creció el cultivo por 4 h más. Las células se cultivaron mediante centrifugación y se congelaron hasta su uso posterior. Las células se resuspendieron en 10 ml de amortiguador fosfato salino frío (PBS, pH 7.3) adicionado con 1 mM de PMSF como inhibidor de proteasas de serina. Las células se lisaron por sonicación y los lisados se clarificaron por centrifugación 23 708 x g por 30 min a 4°C para obtener la fracción soluble. La fracción soluble con las proteínas recombinantes etiquetadas con GST se incubó con 160 µl de resina *glutathione Sepharose* 4B (GE Healthcare) por 3 h a 4°C. La mezcla se cargó en una columna vertical, se dejó fluir la fracción no unida y posteriormente se lavó la columna con 20 ml de PBS con 5 mM de ditioneitol¹³ (DTT). A través de la columna empacada se dejó pasar la fracción soluble de los lisados que contenía las proteínas etiquetadas con MBP y se lavó la columna con 50 ml de PBS frío. Las proteínas unidas se eluyeron con amortiguador de elución (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM de glutatión reducido) (Figura 14).

¹³ El ditioneitol es un agente reductor que previene la formación de enlaces disulfuro entre proteínas aumentando la eficiencia de pegado de la fusión de GST a la resina.

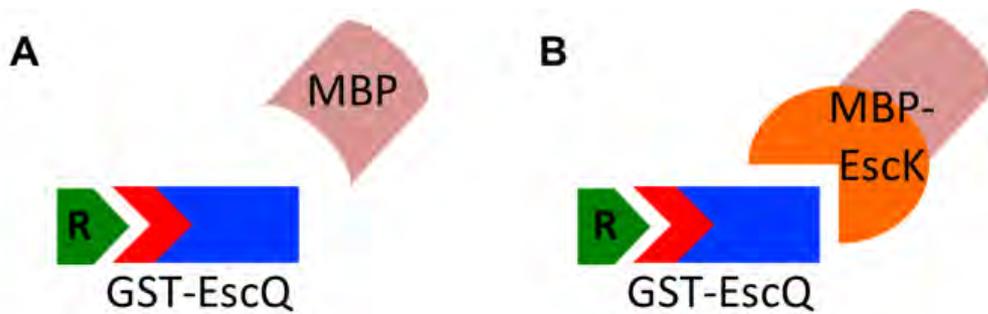


Figura 14. Esquema general del ensayo de co-purificación. La proteína de interés etiquetada GST-EscQ se inmoviliza en una resina de afinidad (R) que en este caso fue de glutatión-sefarosa. (A) Posteriormente la otra proteína de interés MBP, que funge como control negativo o (B) la prueba de interacción MBP-EscK se mezcla con GST-EscQ. Después de los lavados correspondientes, los complejos son selectivamente eluidos y analizados mediante inmunodetección.

Subfraccionamiento celular. Los distintos compartimentos celulares de la bacteria se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Gauthier (Gauthier, Puente, & Finlay 2003). Brevemente, precultivos de la cepa de EPEC de interés se diluyeron (1:50) en 100 ml de DMEM previamente equilibrado. Los cultivos se crecieron a 37°C en 5% de CO₂ hasta una DO₆₀₀ de entre 0.4 y 0.5. La producción de la proteína His-EscK se indujo con 0.1 mM de IPTG en aquellas cepas transformadas con el plásmido pMTHo4. El crecimiento bacteriano se continuó hasta alcanzar una DO₆₀₀ de entre 0.8 y 1. Las células bacterianas se colectaron mediante centrifugación y se lavaron una vez con PBS. Para generar los esferoplastos¹⁴, las células bacterianas se resuspendieron cuidadosamente en 1 ml de amortiguador hiperosmótico (50 mM Tris-HCl, pH 7.0, sacarosa al 20% [wt/vol], 1 mM PMSF) adicionado con 10 mM de EDTA y 100 µg/ml de lisozima y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. La suspensión se centrifugó a 8 000 x g por 10 min y el sobrenadante, que contiene la fracción periplásmica se colectó. La pastilla de esferoplastos se resuspendió en 10 ml de amortiguador de sonicación (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM PMSF), se lisó por sonicación y la muestra se centrifugó a 8 200 x g durante 10 min para remover las células no rotas. El lisado celular que contiene tanto la fracción citoplásmica como membranal se ultra-centrifugó a 90 000 x g durante 60 min (usando un rotor 60Ti en una ultra-centrífuga Beckman XL-90) para separar las fracciones citoplásmica y membranal. Se colectó la pastilla que corresponde a la fracción membranal y el sobrenadante, que contiene la fracción citoplásmica, se ultracentrifugó nuevamente para

¹⁴ Los esferoplastos son células bacterianas desprovistas de pared celular.

remover restos de membrana. La pastilla membranal se lavó una vez más y se resuspendió posteriormente en 1 ml de amortiguador de sonicación. Adicionalmente, para separar la membrana interna de la externa, la fracción membranal se incubó en agitación con 0.5 % de *N*-lauroylsarcosine durante 30 min y la muestra se ultra-centrifugó a 50 000 x *g* por 30 min. El sobrenadante, que contiene la membrana interna, se recuperó. La pastilla, que corresponde a la membrana externa, se lavó nuevamente con 0.5 % de *N*-lauroylsarcosine, se resuspendió con 250 μ l de amortiguador de sonicación adicionado con 0.5 % *N*-lauroylsarcosine. La concentración total de proteínas de cada muestra se cuantificó con el estuche "DC protein assay" (Bio-Rad) para estandarizar la cantidad de proteína total a comprar en cada fracción.

Ensayos de estabilidad. Las cepas de EPEC silvestre *escQ::3xFLAG* o EPEC Δ *escK escQ::3xFLAG* se crecieron en medio LB líquido con Sm y Km por 12 h. Al día siguiente estos precultivos se diluyeron 1:50 en 10 ml de DMEM adicionado con km y los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 1 se tomó una muestra de 1 ml (t=0) para su análisis posterior y se añadió al cultivo principal cloranfenicol¹⁵ a una concentración final de 50 μ g/ml y se continuó el crecimiento. Se tomó 1 ml de muestra del cultivo cada 45 min y se centrifugaron inmediatamente. Las muestras de pastillas de bacteria se resuspendieron en 100 μ l de amortiguador de carga normalizados por la DO₆₀₀ alcanzada por cada cultivo. La presencia de las proteínas de interés se analizó mediante inmunodetección.

Inmunodetección. Las muestras de proteínas fueron sometidas electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en cámaras verticales con amortiguador Tris-Glicina. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa o de polifluoruro de vinilideno (PVDF) en una cámara de transferencia húmeda con amortiguador de transferencia. La membrana obtenida se bloqueó toda la noche con TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween) + 5% de leche descremada en polvo. Al día siguiente la membrana se lavó 3 veces con TBS-T y se incubó con el anticuerpo correspondiente diluido en 10 ml de TBS-T. En caso de ser necesario, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente. La detección de la señal se realizó utilizando el estuche de quimioluminiscencia Immobilon Western (Millipore).

Ensayos de nado bacteriano. Colonias de EPEC recién transformadas con el plásmido de interés se picaron con un palillo estéril en cajas de agar triptona suave (13 g triptona, 7 g

¹⁵ El cloranfenicol es un compuesto bacteriostático que inhibe la síntesis *de novo* de proteínas al interferir con la actividad peptidil transferasa del ribosoma.

NaCl y 2.5 g bacto-agar por litro) que fueron adicionadas con 0.2 mM de IPTG. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 7 h después de lo cual se tomaron imágenes representativas de las cajas.

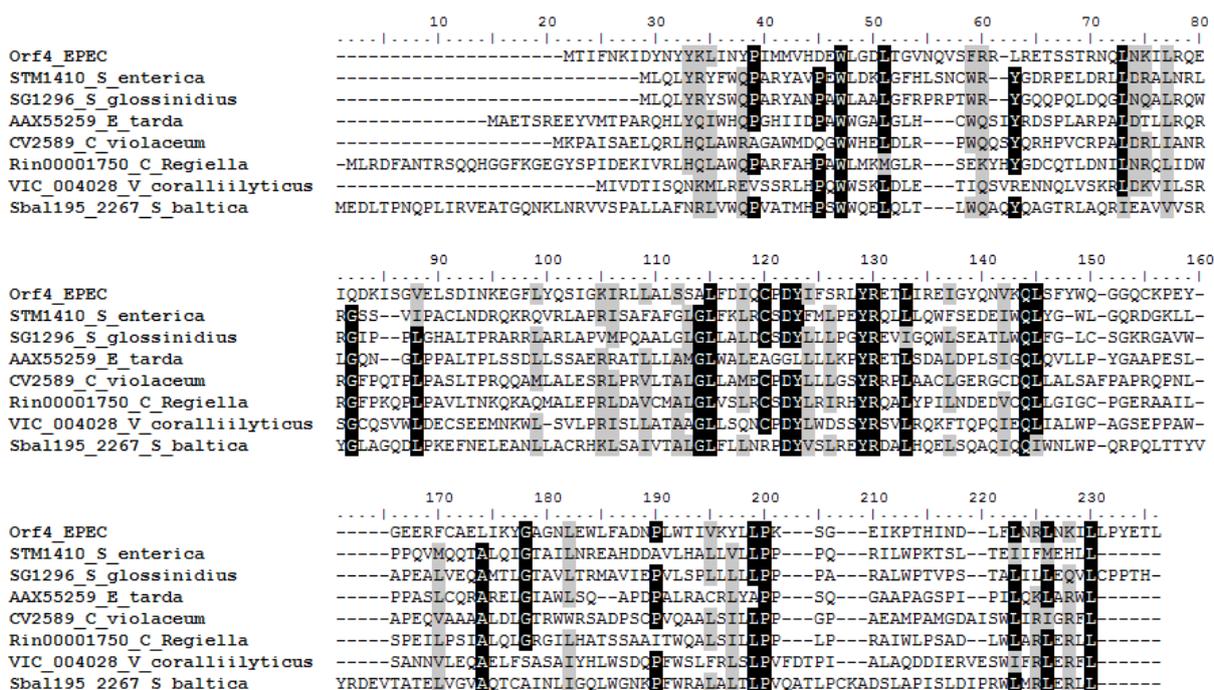
Microscopía de fluorescencia. La secuencia codificante de la proteína verde fluorescente súper plegada (superfolder green fluorescent protein o sfGFP) junto con la región linker N-terminal (Pédelacq et al. 2006) se amplificó mediante PCR usando el plásmido pTB263 (Uehara, Dinh, & Bernhardt 2009) como templado con oligonucleótidos que contienen el sitio de restricción HindIII. El producto de PCR se purificó y se digirió con HindIII y nuevamente se purificó. Simultáneamente, las construcciones pVBescK, pVBescQ y pVBescL, que codifican a EscK, EsQ y EscL, respectivamente, fusionados a una etiqueta de *myc-his* en el carboxilo terminal se digirieron con la enzima HindIII para linearizarlos. Para evitar la re-circularización del vector, se eliminó el fosfato 5' del vector con fosfatasa alcalina. El inserto de sfGFP digerido se ligó en cada una de las 3 construcciones y se extrajo el DNA plasmídico de las colonias candidatas. Mediante análisis de restricción se verificó que el inserto de sfGFP estuviera insertado en la orientación deseada. Los plásmidos obtenidos dieron lugar a las construcciones pSBeK-GFP, pSBeQ-GFP y pSBeL-GFP.

Las cepas de EPEC transformadas con la construcción de interés se crecieron en medio DMEM hasta una DO_{600} cercana a 1. Se tomó una alícuota de 500 μ l de cada cultivo y las células bacterianas se lavaron con PBS. La muestra bacteriana se colocó en un portaobjetos con una cama de agarosa. Las imágenes de epifluorescencia se tomaron en un microscopio Nikon Eclipse 600 acoplado a una cámara Hamamatsu Orca-ER.

RESULTADOS

Orf4 es un homólogo distante de la familia YscK/OrgA/MxiK

Como una primera aproximación para obtener información acerca del rol funcional de la proteína Orf4 en el SST3 de EPEC se realizó una búsqueda de homólogos de esta proteína en bases de datos biológicas. La secuencia de aminoácidos de Orf4 se usó como proteína problema en una búsqueda mediante DELTA-BLAST¹⁶ (Boratyn et al. 2012). La búsqueda arrojó que existen proteínas codificadas por otras bacterias con una similitud estadísticamente significativa a Orf4, por lo que probablemente se traten de homólogos de esta proteína. Como ninguna de las proteínas recabadas en esta búsqueda se encuentra funcionalmente caracterizada, no se pudo extrapolar información funcional de éstas a Orf4. Sin embargo, un alineamiento múltiple entre Orf4 y un subconjunto de las secuencias homólogas encontradas por DELTA-BLAST reveló que existen sitios altamente conservados entre esta familia de proteínas (Figura 15).



¹⁶ El DELTA-BLAST es una implementación de la herramienta BLAST el cual tiene la particularidad de alinear la secuencia pregunta a una base de datos pre-construida de la base de datos de NCBI de dominios conservados (CDD, del inglés *Conserved Domain Database*). Con esta primera búsqueda se construye una matriz de pesos la cual se usará para hacer una búsqueda iterada de similitud con la base de datos de secuencias conocidas. El DELTA-BLAST ofrece una mayor sensibilidad que otros algoritmos de comparación de secuencias.

Figura 15. Alineamiento múltiple entre EscK y proteínas ortólogas codificadas en otros SST3. Se realizó una búsqueda mediante DELTA-BLAST usando a Orf4 como “proteína pregunta” y un sub-conjunto representativo de los homólogos encontrados se alinearon con Orf4 usando el programa Muscle (Edgar 2004). El alineamiento mostrado se visualizó con BioEdit 7.2.0. Los sitios se encuentran sombreados con negro o con gris si son idénticos o similares, respectivamente, en al menos 80% de las secuencias. Las secuencias alineadas son: Orf4 de EPEC (CAS11513.1), STM1410 de *Salmonella enterica* (NP_460375.1), SG1296 de *Sodalis glossinidius* (WP_011411125.1), AAX55259 de *Edwardsiella tarda* (AAX55259.1), CV2589 de *Chromobacterium violaceum* (WP_011136136.1), Rin_00001750 de *Candidatus Regiella insecticola* (WP_006705808.1), VIC_004028 de *Vibrio coralliilyticus* (WP_006962219.1) y Sbal195_2267 de *Shewanella baltica* (WP_012197149.1).

El gen *orf4* se encuentra río abajo del gen *cesAB*, que codifica para una chaperona de proteínas translocadoras (Boratyn et al. 2012; Creasey et al. 2003) y río arriba de *escL*, que codifica para un regulador negativo de la actividad catalítica de la ATPasa (Romo-Castillo et al. 2014) (Figura 16A). De manera similar, los homólogos de Orf4 detectados por DELTA-BLAST se encuentran consistentemente río arriba del gen que codifica a un homólogo de EscL pero río abajo de un homólogo de EscJ, proteína que forma el anillo de membrana interna del inyectisoma (Figura 16A). De manera interesante, cuando examinamos esta misma región genómica pero de organismos modelo cuyos SST3 han sido ampliamente estudiados (*Y. pestis*, *S. flexneri* y *S. enterica*), encontramos que un miembro de la familia SctK se encuentra codificado en este mismo contexto genómico. Como se observa en la Figura 16B, *yscK* de *Y. pestis*, *orgA* de *S. enterica* SPI-1 y *mxiK* de *S. flexneri* se encuentran flanqueados por los mismos genes que los homólogos de Orf4. Es importante mencionar que ninguno de los algoritmos de comparación de secuencias que se probaron (BLAST, HMM) encontró similitud estadísticamente significativa entre Orf4 y las proteínas OrgA, YscK o MxiK.

En otros genomas que codifican SST3, se ha observado que proteínas del SST3 funcionalmente relacionadas se encuentran codificadas en un contexto genómico similar a pesar de no compartir similitud significativa en su secuencia. Dado que el gen *orf4* conserva el mismo contexto genómico que las proteínas arquetípicas de la familia SctK (YscK, OrgA y MxiK) y las proteínas codificadas por estos genes poseen características fisicoquímicas similares (Figura 16), junto con el hecho de

que se encontraron paralelismos en la función de EscK con miembros de esta familia (ver adelante) proponemos que Orf4 es un homólogo remoto de YscK, OrgA y MxiK y por lo tanto es un miembro de la familia SctK. Por esta razón y siguiendo la nomenclatura estándar para los componentes del SST3 (Tabla II) decidimos renombrar a la proteína Orf4 como EscK.

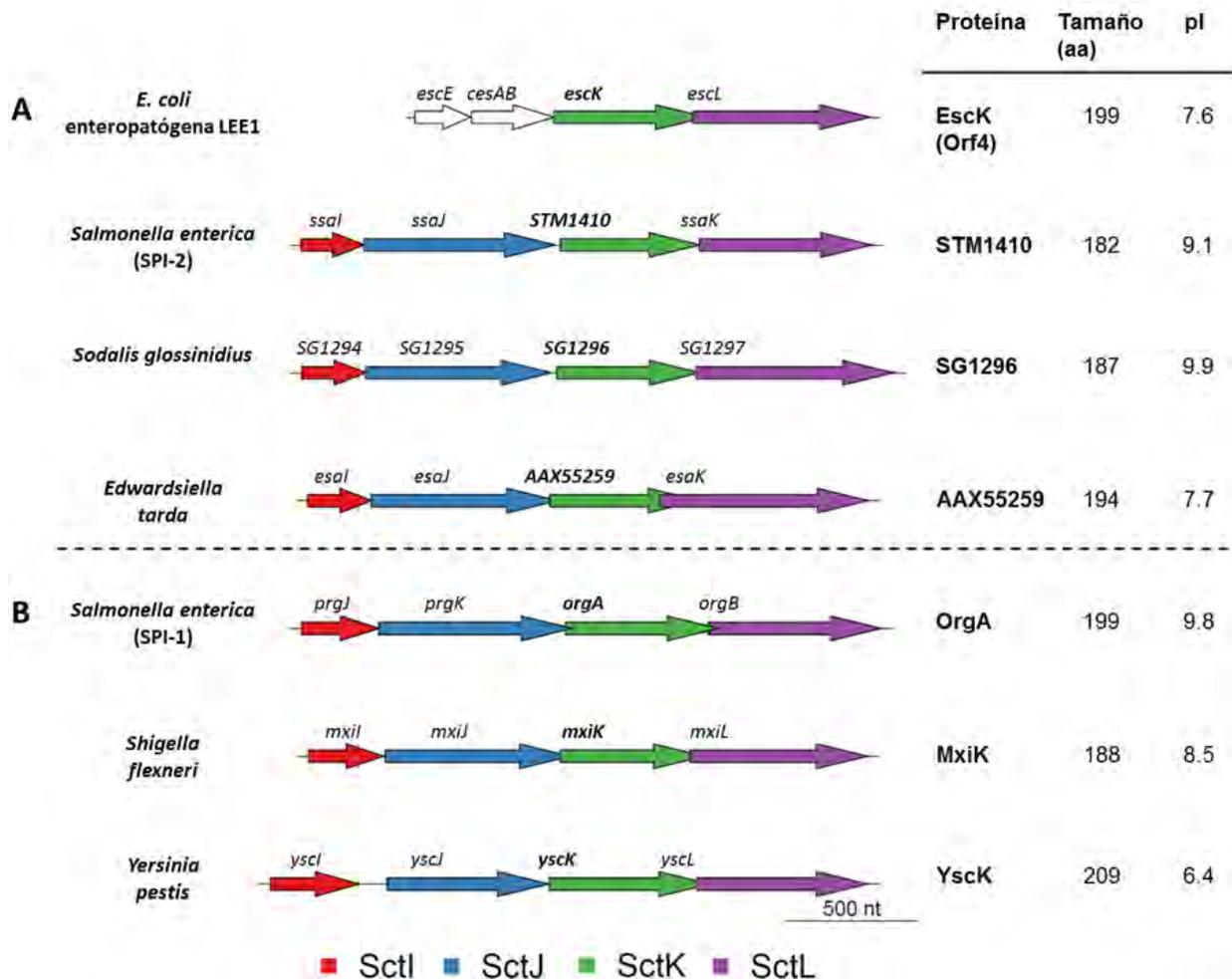


Figura 16. Conservación del contexto genómico entre el gen *escK* (antes *orf4*) y los miembros de la familia *sctK*. (A) Representación esquemática de la vecindad genómica de los genes que codifican para proteínas homólogas de EscK encontrados por DELTA-BLAST. (B) Representación esquemática de la vecindad genómica de los genes que codifican para proteínas miembros de la familia SctK (OrgA, MxiK, YscK). Se muestra en columnas a la derecha características similares (número de aminoácidos y punto isoeléctrico) entre este grupo de proteínas.

EscK es un componente importante del SST3 de EPEC

Con el fin de evaluar la contribución directa de la proteína EscK al funcionamiento y ensamblaje del SST3 de EPEC, se generó una mutante nula del gen *escK* en EPEC y se evaluó *in vitro* su fenotipo de secreción. Se comparó la secreción de proteínas al medio extracelular a través del SST3 de una cepa de EPEC silvestre (WT), una mutante nula en el gen que codifica para la ATPasa EscN ($\Delta escN$) y la mutante nula del gen *escK* ($\Delta escK$). Como se observa en la Figura 17 la cepa de EPEC silvestre secreta tanto translocadores (EspD, EspB y EspA) como efectores (Tir y EspF). En el sobrenadante de la mutante $\Delta escN$ -cuyo SST3 no es funcional por lo que funge como control negativo de secreción-, sólo se detecta al autotransportador EspC¹⁷. La mutante $\Delta escK$ no secreta al medio ni translocadores ni efectores, comportándose como el control negativo de secreción $\Delta escN$ (Figura 17A). El defecto en la secreción de la mutante $\Delta escK$ no se puede atribuir a una deficiencia en la producción de sustratos ya que se detectaron los mismos niveles intracelulares de sustratos en todas las cepas (Figura 17A, panel P). La secreción de proteínas vía SST3 en la cepa mutante $\Delta escK$ se restauró a niveles silvestres al expresar *in trans* la versión recombinante His-EscK, lo que indica que el fenotipo de no secreción de la cepa $\Delta escK$ se debe únicamente a la ausencia de la proteína EscK y que la proteína recombinante His-EscK es enteramente funcional.

En EPEC y en otras bacterias patógenas, el ensamblaje de un SST3 completo y funcional se ha correlacionado con la capacidad de causar lisis en glóbulos rojos (Warawa, Finlay, & Kenny 1999; Blocker et al. 1999; Shaw et al. 2001). Por esta razón, los llamados ensayos de hemólisis se han usado para evaluar el estado de ensamblaje de los inyectisomas. Para evaluar si EscK, además de ser necesario para el funcionamiento de la maquinaria de secreción, es importante también para el ensamblaje *per se* del SST3 se comparó la capacidad de este mismo conjunto de cepas para causar hemólisis en glóbulos rojos mediante su SST3.

¹⁷ La proteína EspC es un autotransportador de 110 kDa con actividad de serina proteasa (Navarro-García et al. 2014). EspC es secretado al medio extracelular a través del sistema de secreción tipo V aunque su translocación a las células epiteliales es auxiliada por el SST3 y su transcripción se encuentra co-regulada con la isla LEE (Elliott et al. 2000; Vidal and Navarro-García 2008). Debido a que la secreción de EspC es independiente del SST3, la presencia de este autotransportador en el medio extracelular es usado como control de carga de los sobrenadantes en los ensayos de secreción.

Las cepas EPEC WT, $\Delta escN$, $\Delta escK$ y $\Delta escK$ complementada con His-EscK ($\Delta escK$ /His-EscK) se incubaron con una solución de glóbulos rojos de humano (ver Materiales y métodos) y se midió la hemoglobina liberada al medio como una medida indirecta de la capacidad hemolítica de estas cepas. Los resultados mostraron que mientras que EPEC silvestre es capaz de ocasionar lisis celular en eritrocitos humanos, la cepa mutante $\Delta escK$ sólo presenta niveles basales de hemólisis similares a los de la cepa $\Delta escN$ (Figura 17B). La capacidad hemolítica de la cepa $\Delta escK$ se restaura al expresar *in trans* a la proteína His-EscK, confirmando que EscK es necesario para el ensamblaje del inyectisoma y que el defecto de la mutante $\Delta escK$ en este ensamblaje se debe sólo a la ausencia de la proteína EscK.

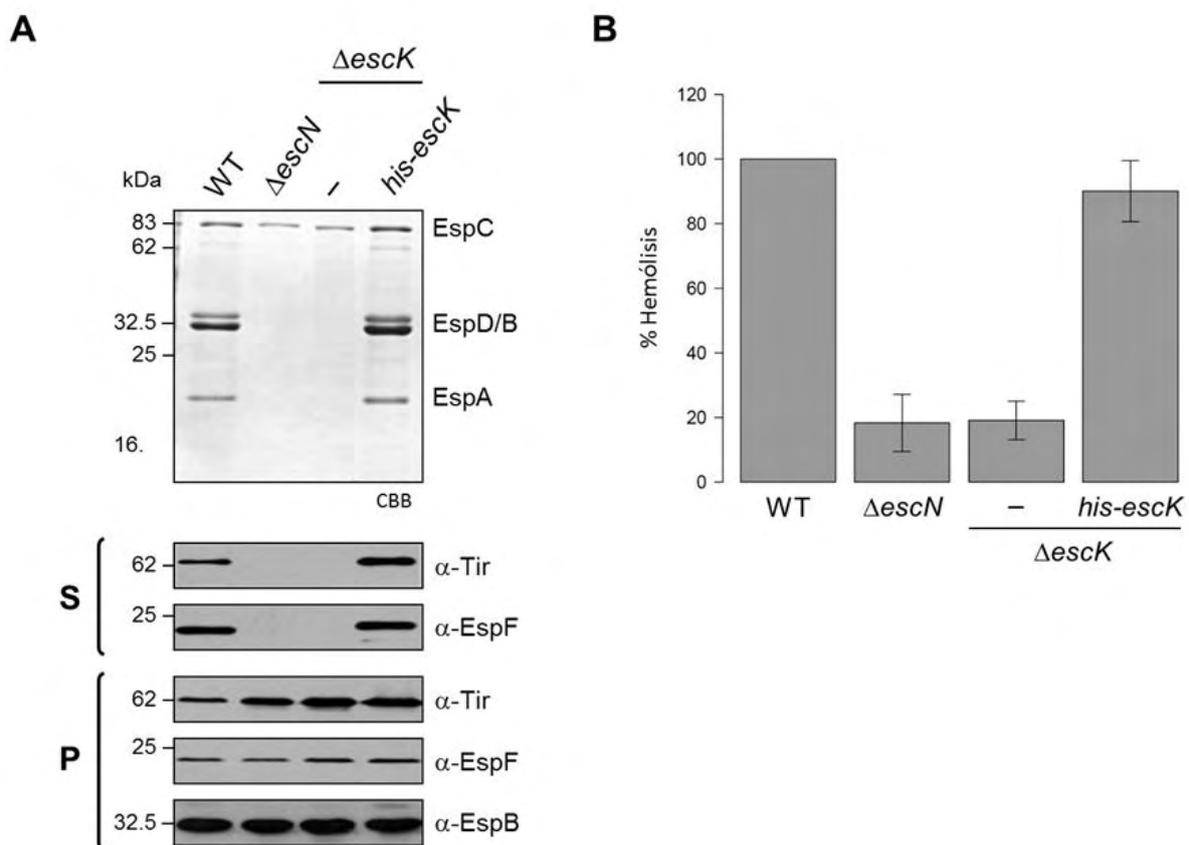


Figura 17. EscK es un componente central para el funcionamiento del SST3 de EPEC. (A) Las cepas de EPEC silvestre (wild-type, WT), $\Delta escN$, $\Delta escK$ y la cepa $\Delta escK$ complementada con el plásmido que expresa a His-EscK se crecieron en DMEM para inducir la secreción de proteínas del SST3. Las proteínas secretadas se analizaron mediante 15% SDS-PAGE y tinción de Coomassie (CBB) (panel

superior). La presencia de los efectores Tir y EspF en el sobrenadante (S) y de Tir, EspF y del translocador EspB en la pastilla celular (P) se examinó mediante inmunodetección. (B) La capacidad de hemólisis de estas mismas cepas bacterianas se midió incubando a las cepas bacterianas correspondientes con glóbulos rojos. El porcentaje relativo de hemólisis se midió relativo a la hemólisis causada por EPEC WT. Las barras representan el promedio de al menos tres experimentos independientes. Las barras de error muestran las desviaciones estándar.

El fenotipo de secreción de la mutante Δ escK junto con la pérdida de la capacidad hemolítica de esta cepa demuestra que la proteína EscK es un componente importante tanto para el ensamblaje como para el funcionamiento del SST3 de EPEC.

STM1410, homólogo de EscK, no restaura la secreción de la cepa mutante Δ escK

La proteína EscK comparte similitud estadísticamente significativa con otras proteínas de SST3 de otras bacterias (Figura 15). Uno de estos homólogos de especial interés es la proteína STM1410 codificada en la isla 2 (SPI-2) de patogenicidad de *S. enterica*, ya que esta bacteria es una causa común de enfermedades gastrointestinales en países industrializados y no industrializados (Bryan Coburn, Grassl,&Finlay 2007; Eng et al. 2015). Además de esto, la SPI-2 se encuentra filogenéticamente cercana a la isla LEE (Troisfontaines&Cornelis 2005). Por esta razón investigamos si STM1410, proteína con una similitud en secuencia del 33% y con una identidad del 19% con EscK¹⁸ (Figura 18), es capaz de reemplazar la función de la proteína EscK.

¹⁸Calculado con stretcher de EMBOSS (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/).

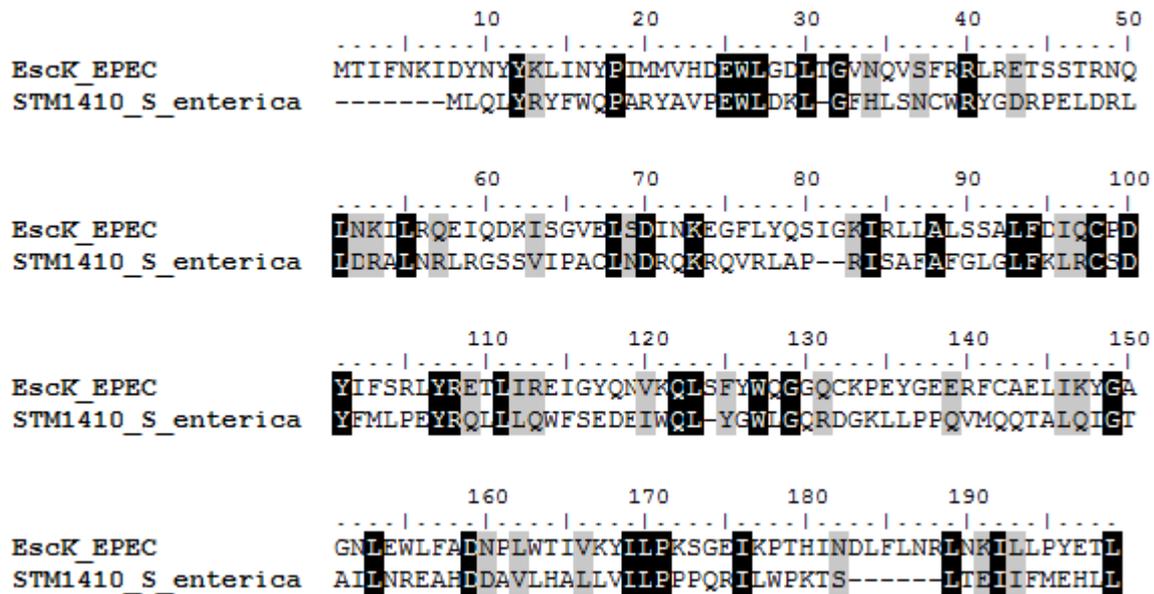


Figura 18. Alineamiento pareado entre EscK de EPEC y la proteína STM1410 codificada en la SPI-2 de *Salmonella enterica*. El alineamiento se realizó con Muscle y se visualizó con BioEdit 7.2.0. Los sitios se encuentran sombreados con negro o con gris si son idénticos o similares, respectivamente.

Se clonó al gen *STM1410* en el vector de expresión pET19b para subsecuentemente clonarlo como fragmento *his-STM1410* en el vector de expresión pTrc99A. Se transformó la cepa Δ *escK* con el vector pTrc99A vacío, con la construcción basada en este mismo vector que expresa a *his-escK* o a *his-STM1410*. Como se observa en la Figura 19, *his-escK* pero no *his-STM1410* es capaz de restaurar la secreción de proteínas vía SST3 en la cepa Δ *escK* aunque ambas proteínas se expresan a niveles similares dentro de EPEC a juzgar por la inmunodetección de la etiqueta de histidinas (Figura 19, panel P). Estos resultados indican que, a pesar de la similitud en secuencia entre EscK y STM1410, esta última proteína no es capaz de suplir la función de EscK en EPEC.

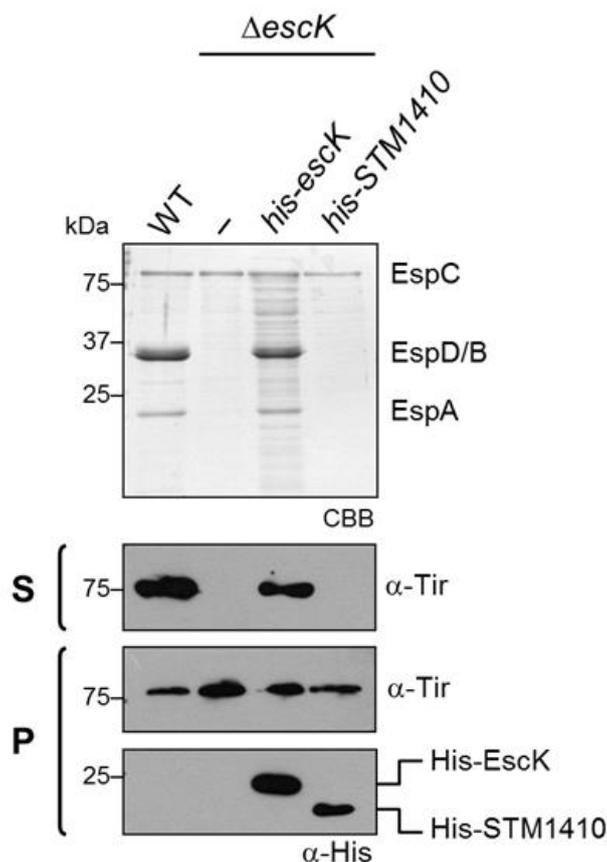


Figura 19. La expresión de la proteína STM1410 no restaura la secreción de proteínas del SST3 de la mutante $\Delta escK$. Las cepas de EPEC silvestre (WT), la mutante $\Delta escK$ transformada con el vector pTrc99A vacío (-), pTrc99A expresando a *his-escK* o *his-STM1410* se crecieron en condiciones de inducción del SST3 y las proteínas del sobrenadante (S) y de la pastilla bacteriana (P) se recuperaron y se analizaron en SDS-PAGE mediante tinción con Coomassie (CBB) o por inmunodetección. La producción de His-EscK y His-STM1410 se probó por inmunodetección usando anticuerpos anti-His.

EscK interacciona directamente con EscQ

Con el fin de obtener información adicional acerca de la posible función que desempeña la proteína EscK en el SST3 de EPEC se buscaron interacciones proteína-proteína con otros componentes del inyectisoma de EPEC usando el sistema de doble híbrido en levadura. A grandes rasgos, si las proteínas de interés interaccionan se activan genes reporteros que rescatan a la cepa de levadura usada de una auxotrofia en la vía de histidina y adenina (ver materiales y métodos).

Mediante este sistema de doble híbrido en levadura se probó la interacción directa entre EscK y distintos componentes estructurales del inyectisoma como EscL, EscQ, con la misma EscK, EscN, EscJ, EscU, EscF, EscV y EscD¹⁹, que son componentes cuya expresión, al igual que EscK, es importante para la secreción de proteínas vía SST3. Mediante esta estrategia se pudo encontrar que EscK interacciona con EscQ, la proteína que forma el anillo citoplásmico en el inyectisoma de EPEC. Las diluciones seriadas en medio estricto (en ausencia de histidina y adenina), que nos permiten tener una medida cualitativa de la fuerza de la interacción, reflejan que la interacción EscK-EscQ parece tener una afinidad tan alta como la del control positivo de la proteína p53 al antígeno T. (Figura 20).

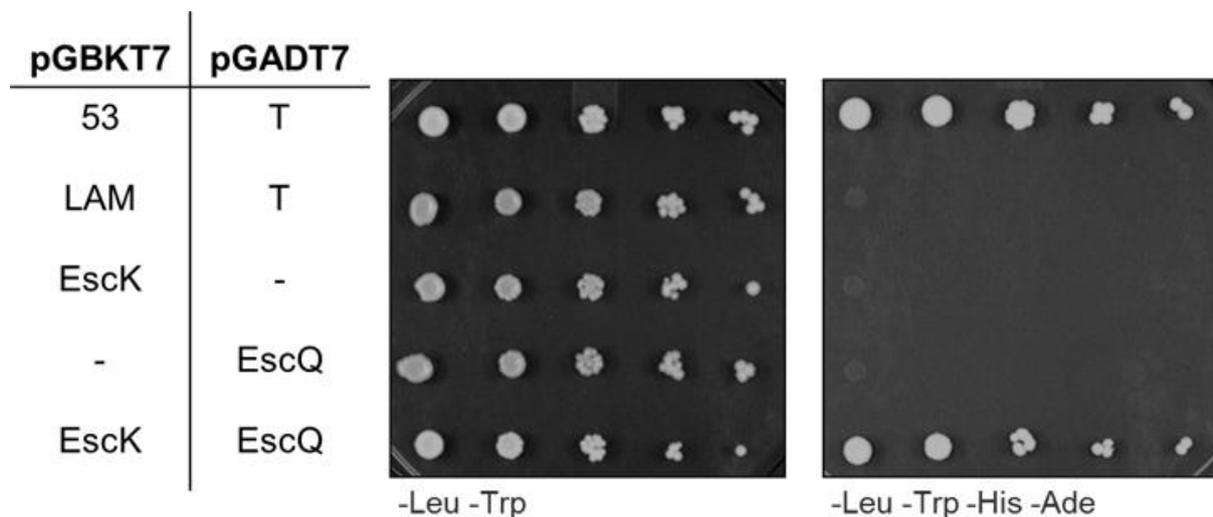


Figura 20. EscK interacciona de manera directa con EscQ. Imagen representativa de los experimentos de doble híbrido de levadura para probar la interacción de EscK con EscQ. Las cepas de levadura diploides co-transformadas con las construcciones indicadas basadas en pGADT7 y pGBKT7 se diluyeron de manera seriada y se gotearon en cajas sin leucina y sin triptófano (-Leu-Trp) para confirmar la presencia de ambos vectores y en cajas sin leucina, triptófano, histidina y adenina (-Leu-Trp-His-Ade) para detectar la activación de los reporteros correspondientes.

Para corroborar que las proteínas EscK y EscQ interaccionan de manera directa se realizaron ensayos de co-purificación. De manera general, el ensayo de co-purificación consiste en capturar una proteína A de interés en una resina de afinidad

¹⁹ La interacción directa entre EscK y las proteínas EscD y EscV fue probada por Karen Mojica tanto por doble híbrido en levadura como por co-purificación. Aunque estos dos componentes son candidatos fuertes, no se encontró interacción directa con EscK mediante estos métodos.

inmovilizada para generar un segundo punto de afinidad. Una vez hecho esto, la segunda proteína B de interés se incubó con la resina que tiene a la proteína A unida, se lava la resina para eliminar las interacciones inespecíficas y se eluyen las proteínas que fueron unidas específicamente. Si las proteínas interactúan de manera específica, la proteína B co-purificará con A.

Para este experimento, la proteína recombinante GST-EscQ se sobre-expresó en la cepa de expresión BDP (Tabla 1) y posteriormente se inmovilizó en una resina de glutatión-sefarosa. La resina con GST-EscQ unida se empacó en una columna y se lavó para eliminar a las proteínas unidas de manera no específica (ver Materiales y métodos). Posteriormente, se pasó a través de la columna un lisado clarificado de células BDP donde se sobre-expresó a la proteína recombinante MBP-EscK. Nuevamente se lavó la resina y las proteínas unidas se eluyeron y se analizaron. Como se observa en la Figura 21, MBP-EscK pero no la proteína MBP sola co-eluyó con GST-EscQ.

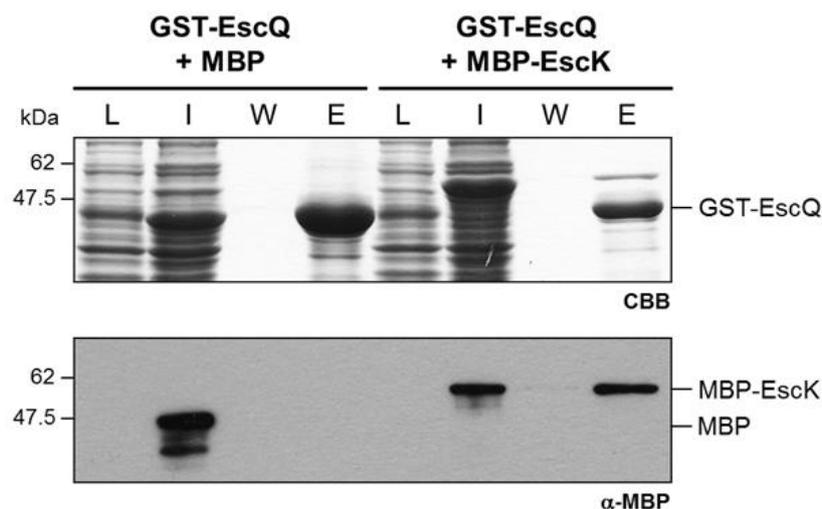


Figura 21. EscK interactúa de manera directa con EscQ. Ensayo de co-purificación que confirma la interacción EscK-EscQ. La proteína recombinante GST-EscQ proveniente de un lisado clarificado (L) se inmovilizó en una columna empacada con resina de glutatión-sefarosa. Subsecuentemente, lisados clarificados de células BDP que sobre-expresaron a las proteínas recombinantes MBP o MBP-EscK (I) se cargaron en la columna. Después de lavados extensivos (W), las proteínas retenidas fueron eluidas (E). Todas las fracciones se analizaron mediante 12% SDS-PAGE y tinción de Coomassie o inmunodetección usando anticuerpos anti-MBP.

Adicionalmente, se probó que la proteína GST sola pegada a la resina no es capaz de retener a MBP-EscK demostrando así la especificidad de la interacción EscK-EscQ detectada por co-purificación (Figura 22).

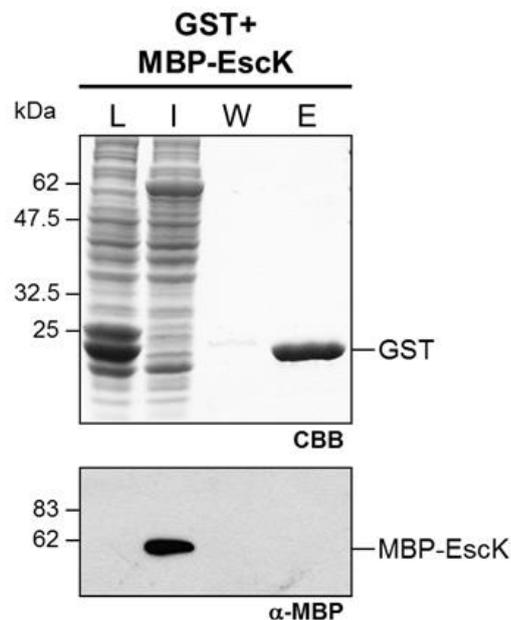


Figura 22. MBP-EscK no co-purifica con GST. La proteína recombinante GST proveniente de un lisado clarificado (L) se inmovilizó en una columna empacada con resina de glutatión-sefarosa. Posteriormente, un lisado clarificado de células BDP donde se sobre-expresó a las proteína recombinante MBP-EscK (I) se cargó en la columna. Después de lavados extensivos (W), las proteínas retenidas se eluyeron (E). Todas las fracciones fueron analizadas mediante 12% SDS-PAGE y tinción de Coomassie e inmunodetección usando anticuerpos anti-MBP.

En su conjunto, estos datos demuestran que EscK interacciona de manera específica y directa con EscQ, el componente principal del anillo citoplásmico del inyectisoma de EPEC.

Localización subcelular de EscK

La interacción directa entre EscK y EscQ sugieren una misma localización celular de estas dos proteínas en EPEC. Se ha reportado previamente que EscQ es un componente que se encuentra en la fracción soluble y membranal de EPEC (Biemans-Oldehinkel et al. 2011). Para EscK no se predicen cruces transmembranales (TMHMM Server, v. 2.0) ni tampoco una secuencia señal tipo

Sec (SignalP 4.1 Server) o Tat (TatP 1.0 Server). Por lo tanto, para dilucidar la localización subcelular de EscK, células de la cepa ΔescK complementadas con el plásmido pTrc99A que expresa a His-EscK se fraccionaron en periplasma, citoplasma y membrana siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos (Gauthier, Puente, & Finlay 2003). La pureza de cada fracción se evaluó por inmunodetección de la proteína periplásmica MBP, de la chaperona citoplásmica DnaK y de la proteína de membrana interna EscJ. Los resultados mostraron que EscK se detecta tanto en la fracción citoplásmica como en la fracción membranal de EPEC (Figura 23A). Adicionalmente, la fracción membranal se separó en membrana externa e interna usando el detergente N-lauroylsarcosine (ver materiales y métodos). La pureza de ambas fracciones se evaluó mediante la inmunodetección de la secretina de membrana externa EscC y de EscJ en la membrana interna. Se encontró que EscK se encuentra enriquecida en la membrana interna de EPEC (Figura 23B).

Debido a que EscK interacciona de manera directa con EscQ, nos preguntamos si la sub-localización celular de EscK depende de la proteína EscQ. Para responder esto, se fraccionó una cepa doble mutante $\Delta\text{escK}\Delta\text{escQ}$ que expresa a His-EscK usando el mismo protocolo de fraccionamiento celular descrito. Se encontró que la distribución sub-celular detectada de His-EscK no cambia en ausencia de la proteína EscQ, ya que esta proteína se sigue localizando en el citoplasma y en la membrana de EPEC (Figura 23C). Adicional a esto, encontramos que EscK no requiere de ningún otro componente del SST3 para asociarse a la membrana ya que cuando se realizó el mismo experimento de fraccionamiento celular pero en un fondo Δler^{20} , activador transcripcional maestro de la isla LEE, EscK se sigue localizando tanto en el citoplasma como en la membrana celular (Figura 23C).

²⁰ La proteína Ler (del inglés, *LEE-encoded regulator*) es un activador transcripcional central de la isla LEE. Ler activa la expresión de los genes del LEE aliviando la represión sobre los operones ejercida por el regulador negativo global H-NS (Víctor H. Bustamante et al. 2001; Umanski, Rosenshine, and Friedberg 2002). Sin Ler, la expresión de los genes de la isla LEE no se activa, aún en condiciones de inducción.

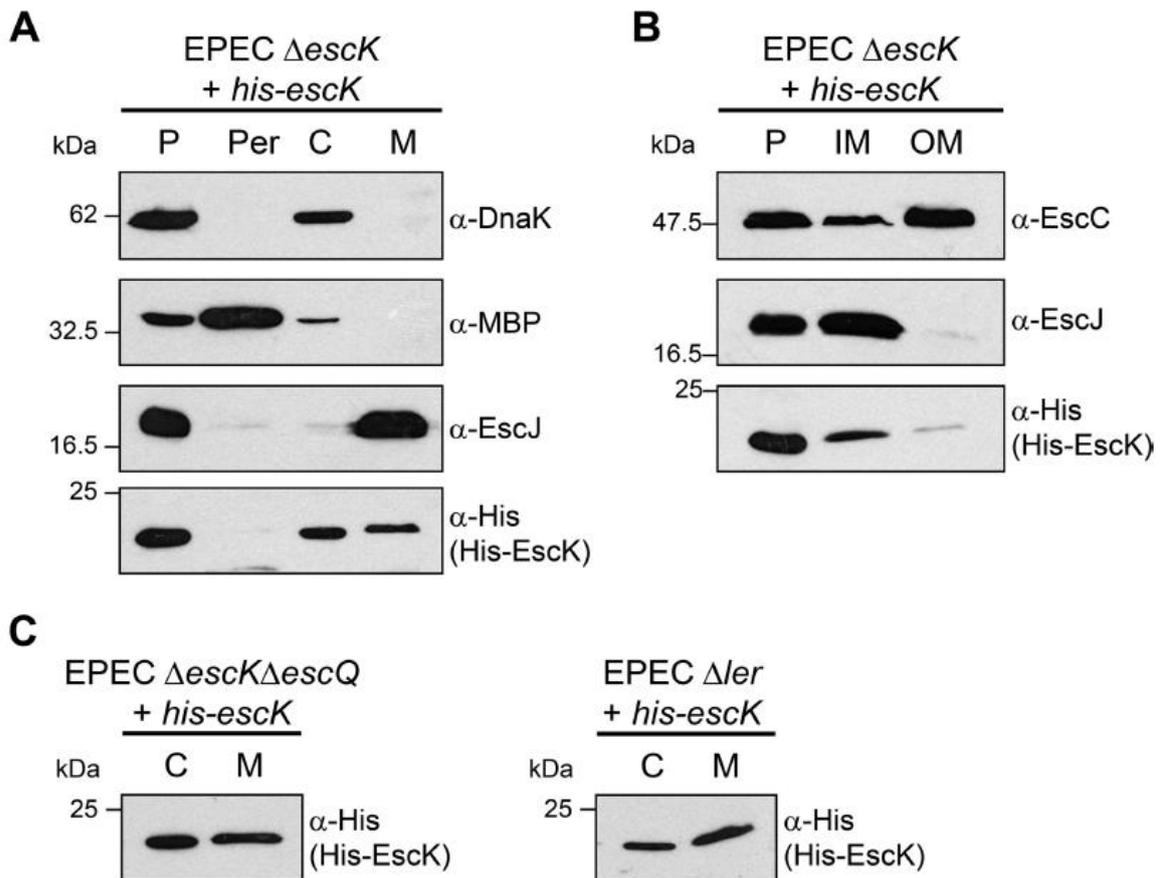


Figura 23. EscK se localiza de manera intrínseca tanto en el citoplasma como en la membrana interna de EPEC. Cepas de EPEC que expresan la versión recombinante de His-EscK se separaron en periplasma (Per), citoplasma (C) y membrana (M). Cantidades iguales de proteína correspondientes a cada fracción junto con una muestra de la pastilla celular (P) correspondiente se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunodetección usando anticuerpos anti-His. La presencia del marcador citoplásmico (DnaK), periplásmico (MBP) y membranal (EscJ) en cada fracción se verificó igualmente mediante inmunodetección. (A) Fraccionamiento bacteriano de la mutante de EPEC $\Delta escK$ complementada con el vector que expresa a His-EscK. (B) Sub-fraccionamiento mediante solubilización con detergente de la fracción membranal en membrana interna y externa. (C) El experimento de fraccionamiento bacteriano se realizó también en un fondo doble mutante $\Delta escK\Delta escQ$ y en un fondo Δler para determinar si la localización de EscK depende de otros componentes del injectisoma de EPEC.

Adicionalmente probamos si en un fondo genético distinto a EPEC, EscK presentaba la misma distribución de localización. En una cepa de *E. coli* no patogénica, que no codifica para un SST3 en su genoma, se expresó *in trans* a la proteína His-EscK y se prosiguió con el mismo protocolo de fraccionamiento celular. Se encontró que His-EscK se localiza tanto en la fracción citoplásmica como en

lafracción membranal de BDP (Figura 24). Estos datos muestran que EscK tiene una preferencia intrínseca por la membrana citoplásmica bacteriana y que esta preferencia no depende de la presencia de ningún otro componente del SST3 de EPEC. Esta preferencia intrínseca por la membrana ha sido observada en otros componentes de distintos SST3 (Evans et al. 2006; Auvray et al. 2002; Biemans-Oldehinkel et al. 2011).

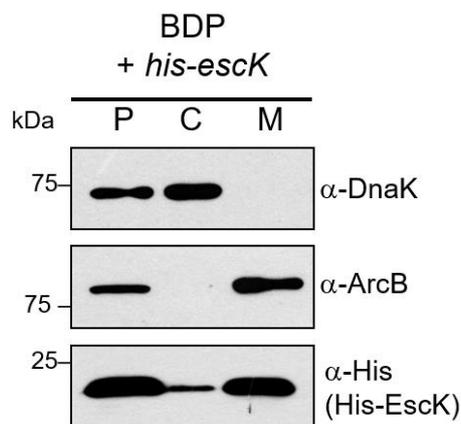


Figura 24. EscK se localiza en citoplasma y en membrana aún en un fondo bacteriano sin SST3. La cepa de *E. coli* no patógena BDP se transformó con la construcción de pTrc99A que expresa a His-EscK. Las bacterias completas se separaron en fracción citoplásmica (C) y membranal (M). Cantidades iguales de proteína correspondientes a cada fracción junto con una muestra de la pastilla celular (P) se analizaron mediante inmunodetección usando anticuerpos anti-His. La presencia del marcador citoplásmico (DnaK) y membranal (ArcB²¹) en cada fracción se verificó igualmente mediante inmunodetección.

Para probar si EscK, además de ser un componente intracelular, es un sustrato secretado a través del SST3 de EPEC se clonó el gen *escK* en el vector pTOPO-2HA el cual fusiona dos etiquetas de hemaglutinina en el extremo C-terminal. Se usó esta versión recombinante de EscK etiquetada en el carboxilo para no interferir con la posible secuencia señal que los sustratos del SST3 poseen en el N-terminal. Esta construcción se transformó en la cepas de EPEC WT, Δ *escN* y Δ *escK* y se evaluó la presencia de EscK-HA en el sobrenadante y en la pastilla celular de estas

²¹ Debido a que la cepa BDP no contiene en su genoma a la isla LEE, no fue posible usar a EscJ (que se encuentra codificado en el LEE) como marcador membranal. En su lugar usamos anticuerpos que reconocen específicamente a la cinasa sensora ArcB de membrana. ArcB es una proteína de 778 aa que se ancla a la membrana interna de *E. coli* y que forma parte del sistema de dos componentes que regula una multiplicidad de genes en respuesta al estado redox celular.

cepas mediante inmunodetección con el anticuerpo HA. Se encontró que aunque la versión EscK-HA se produce en todas las células y es funcional ya que restaura la secreción de la cepa mutante $\Delta escK$ a niveles silvestres, EscK-HA no se encuentra secretado en el medio extracelular (Figura 25) lo que sugiere que EscK sólo desempeña un papel como componente intracelular de la maquinaria del SST3.

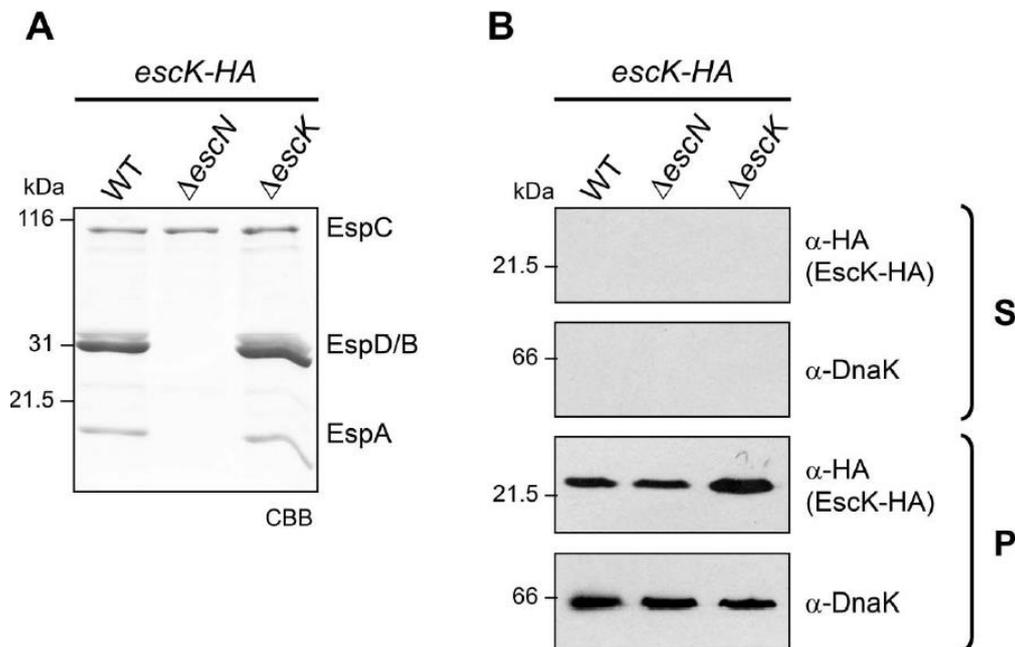


Figura 25. EscK es un componente intracelular del inyectisoma de EPEC. Las cepas de EPEC wild-type (WT), $\Delta escN$ y $\Delta escK$ transformadas con el plásmido que expresa EscK etiquetado con HA en el C-terminal se crecieron bajo condiciones de inducción del SST3. (A) Las proteínas del sobrenadante fueron analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie (CBB). (B) La presencia de EscK-HA y del marcador citoplásmico DnaK se examinó mediante inmunodetección en los sobrenadantes (S) y en pastillas celulares (P) usando los anticuerpos anti-HA y anti-DnaK.

En su conjunto, estos datos de localización son consistentes con el rol propuesto para EscK como parte de una plataforma intracelular y citoplásmica que se encuentra asociada a la membrana en la base del inyectisoma.

La estabilidad y la localización de EscQ no se ven afectadas en ausencia de EscK

El hecho de encontrar que EscK y EscQ interactúan de manera directa nos llevó a preguntarnos la relevancia biológica de esta interacción. Para estudiar las implicaciones funcionales potenciales de dicha interacción decidimos comparar los niveles de producción de EscQ en presencia y en ausencia de EscK. Debido a que los anticuerpos policlonales anti-EscQ que se generaron en el laboratorio no reconocieron los niveles de producción endógenos de EscQ (dato no mostrado), se decidió etiquetar con tres epítopos de FLAG a EscQ en su contexto cromosomal tanto en un fondo EPEC silvestre como en un fondo $\Delta escK$. Esta estrategia nos permitió monitorear los niveles endógenos de producción de la proteína de interés marcada. Para la obtención de las cepas con la proteína EscQ marcada se siguió el protocolo descrito en materiales y métodos (Uzzau et al. 2001).

El casete de resistencia con la etiqueta de 3xFLAG se electroporó en las cepas de EPEC silvestre y en la $\Delta escK^{22}$, las cuales fueron previamente transformadas con el plásmido pKD46 que expresa la recombinasa Red del fago λ . En las colonias resultantes candidatas se verificó la presencia del casete en la locación cromosomal deseada mediante PCR (Figura 26).

²² Es importante notar que para poder etiquetar a *escQ* en la cepa $\Delta escK$ con este método fue necesario primero escindir el casete de kanamicina previamente insertado en esta cepa mutante usando el plásmido pFLP2 como se indica en materiales y métodos.

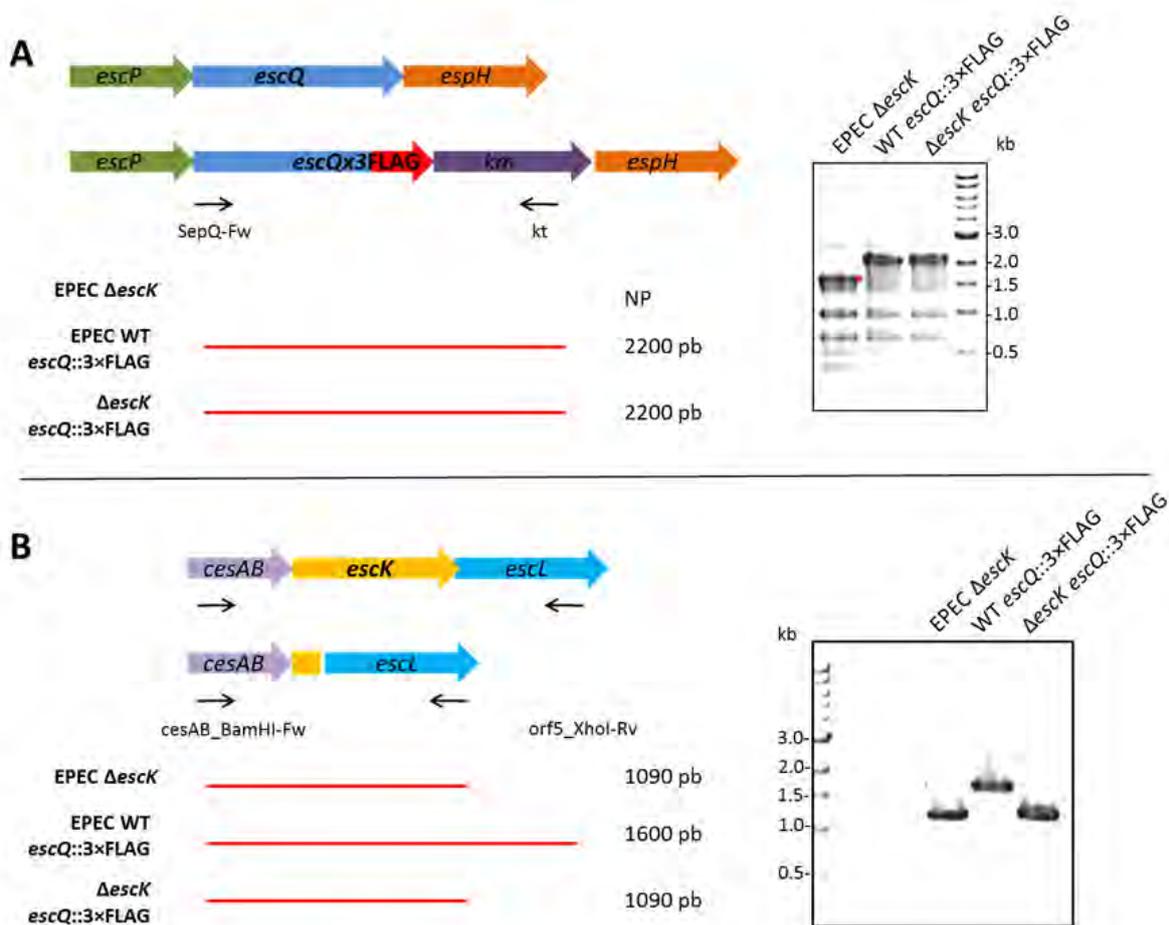


Figura 26. Comprobación de la inserción del casete de kanamicina para etiquetar en el cromosoma a *escQ*. (A) Se compara el contexto genético cromosomal de *escQ* silvestre contra el contexto esperado si el casete se insertó en el sitio deseado. Usando el par de oligonucleótidos SepQ-Fw y kt se espera un producto de PCR de 2200 pb si el casete se insertó en el extremo 3' del gen *escQ*, mientras que en la cepa silvestre no se espera producto amplificado ya que el oligo kt se ancla en un sitio interno del casete de resistencia. El asterisco rojo denota una banda amplificada inespecífica. (B) Para corroborar la presencia o ausencia del gen *escK* en cada una de las cepas se hizo una amplificación mediante PCR usando el par de oligonucleótidos cesAB-Fw y orf5-Rv. Se espera un producto amplificado de 1600 pb en el contexto silvestre de *escK* mientras que en la mutante Δ *escK* sin casete se espera un producto de 1090 pb.

Una vez que se corroboró la presencia del casete, se verificó que el perfil de secreción de las cepas no se hubiera visto afectado por la introducción del casete ni por la etiqueta en el carboxilo de EscQ. Además, se caracterizó la producción de EscQ usando anticuerpos anti-FLAG. Las cepas candidatas de EPEC con *escQ* marcado con 3 epítopos de FLAG en cromosoma se crecieron en DMEM para

inducir la expresión de los genes de la isla y las proteínas intracelulares y las secretadas se analizaron. Como se observa en la Figura 27, el perfil de secreción de las cepas de EPEC silvestre y de la $\Delta escK$ con EscQ etiquetado no se ve alterado, la primera muestra el perfil de proteínas secretadas típico de EPEC silvestre y en la segunda sólo se observa el autotransportador EspC como ya se había visto anteriormente para la cepa no marcada. Cuando se analizaron las proteínas de la pastilla celular mediante inmunodetección con anticuerpos anti-FLAG se detectó una banda en el peso molecular esperado para EscQ-3FLAG (37 kDa) (Figura 27, panel P). Estos resultados nos indican que se logró exitosamente etiquetar a EscQ en cromosoma con 3 epítopes de FLAG y que esta modificación no afectó la secreción de proteínas vía SST3.

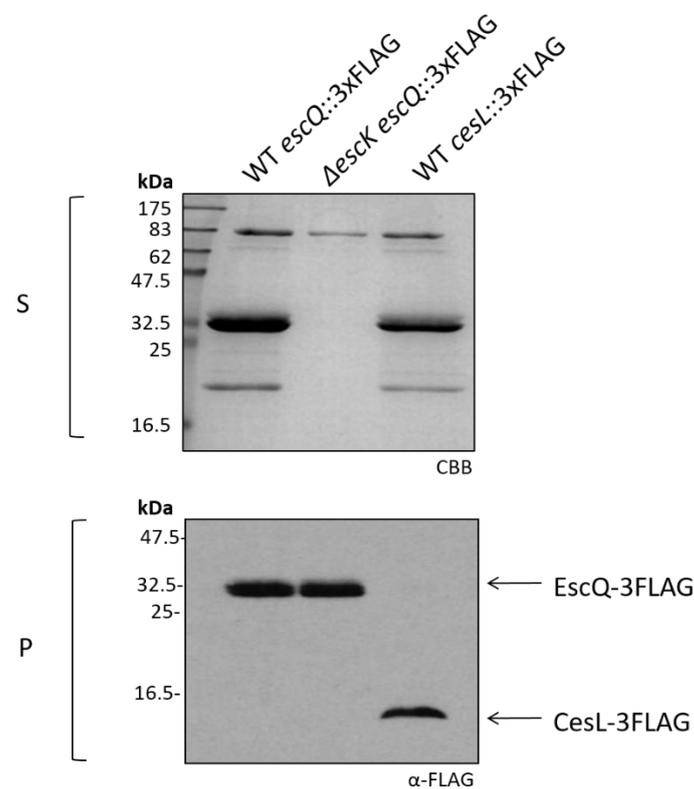


Figura 27. Caracterización de las cepas marcadas de *escQ* con FLAG en el cromosoma. La cepa de EPEC silvestre y $\Delta escK$ con *escQ* marcada en cromosoma se crecieron en condiciones de inducción del SST3 para realizar ensayos de secreción. El perfil de secreción (S) de cada cepa se analizó mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie (CBB). Se analizó la presencia de la proteína EscQ fusionada a 3FLAG en la pastilla celular (P) mediante inmunodetección usando anticuerpos anti-FLAG. Como control positivo de la inmunodetección paralelamente se analizó la cepa de EPEC silvestre con la proteína CesL etiquetada en cromosoma con 3FLAG.

Dado que EscQ interacciona con EscK nos preguntamos si EscK participa como chaperona de EscQ, confiriéndole estabilidad y evitando su degradación prematura en el citoplasma. Las cepas de EPEC WT *escQ::3xFLAG* y Δ *escK* *escQ::3xFLAG* se crecieron en DMEM hasta una DO_{600} de 1 y en este punto se añadió cloranfenicol al cultivo para bloquear la traducción de proteínas. Se tomaron muestras de las cepas a lo largo del tiempo después de añadir el antibiótico para monitorear la producción de EscQ3FLAG. Se encontró que EscQ3FLAG se mantiene constante a lo largo del tiempo tanto en la cepa silvestre como en la mutante Δ *escK* (Figura 28) indicando que en ausencia de EscK la integridad de EscQ no se ve comprometida.

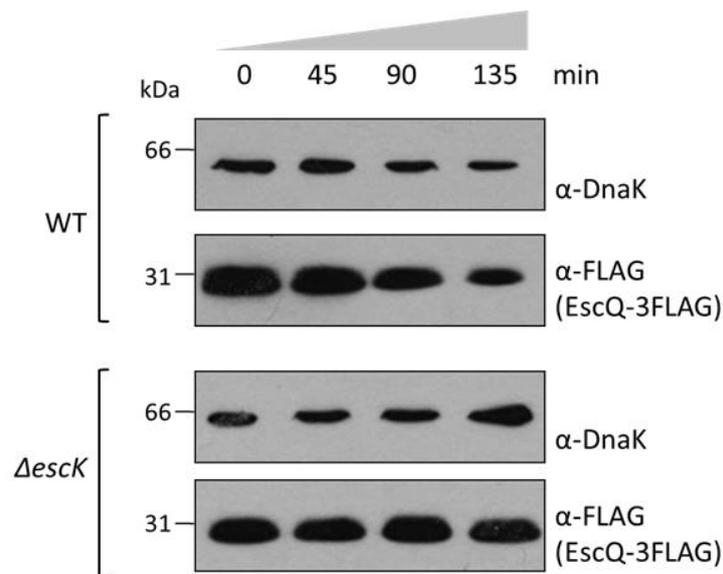


Figura 28. Estabilidad de EscQ en ausencia de EscK. Las cepas de EPEC silvestre (WT) o Δ *escK* que expresan niveles silvestres de EscQ etiquetado en cromosoma con 3 etiquetas de FLAG en el C-terminal se crecieron en medio DMEM a 37 °C para inducir la expresión de la isla LEE. En el tiempo 0 se añadió cloranfenicol para inhibir la síntesis *de novo* de proteínas. Se tomaron muestras del cultivo cada 45 min después de añadir el antibiótico y la cantidad de EscQ-3FLAG se monitoreó usando anticuerpos anti-FLAG. Como control de carga se detectó a la chaperona citoplásmica DnaK.

Por otro lado, para definir si la localización sub-celular de EscQ depende de la presencia de su compañero de interacción EscK, se llevaron a cabo experimentos de fraccionamiento celular en las cepas EPEC WT *escQ::3xFLAG* y Δ *escK* *escQ::3xFLAG* para contrastar la localización de EscQ. Como se observa en la Figura 29, EscQ3FLAG se localiza mayoritariamente en el citoplasma de EPEC

silvestre, aunque también se detecta en la fracción membranal. Esta distribución de EscQ en EPEC coincide con la que se reportó en un trabajo donde la cepa $\Delta escQ$ complementada con *escQ-HA* expresada desde un vector de alto número de copias fue separada en fracción soluble y membranal (Biemans-Oldehinkel et al. 2011). Adicionalmente, nosotros encontramos que la localización en membrana de EscQ no requiere de la presencia de EscK (Figura 29).

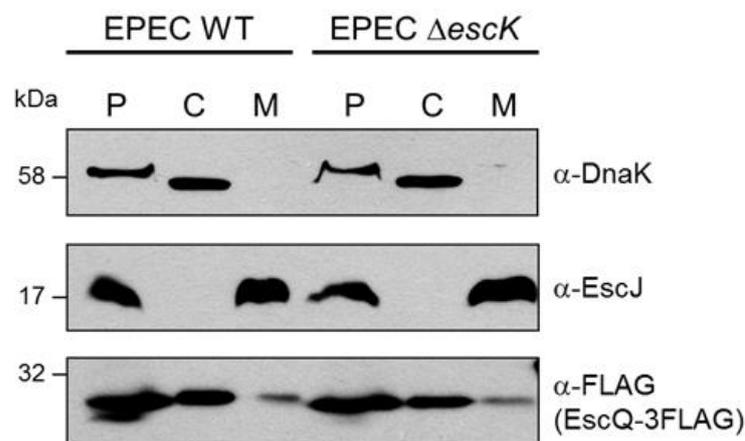


Figura 29. La localización celular de EscQ no cambia en ausencia de EscK. Las cepas de EPEC WT *escQ::3xFLAG* y $\Delta escK$ *escQ::3xFLAG* expresando a niveles silvestres a EscQ etiquetado con 3 epítopes de FLAG fueron separadas en fracción citoplásmica (C) y membranal (M). Cantidades iguales de proteína correspondientes a cada fracción junto con una muestra de la pastilla celular (P) correspondiente se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunodetección usando anticuerpos anti-FLAG. La presencia del marcador citoplásmico (DnaK) y membranal (EscJ) en cada fracción se verificó igualmente mediante inmunodetección.

Si bien EscQ y EscK se encuentran funcional y físicamente relacionadas, su localización en la membrana no depende una de la otra y la estabilidad de EscQ es independiente de EscK.

Disección molecular de EscK

Como se mencionó previamente, mediante una búsqueda de homólogos remotos usando DELTA-BLAST se encontraron varios homólogos de EscK. Aunque ninguno de los homólogos detectados se encuentra funcionalmente caracterizado, un

alineamiento múltiple reveló diversos residuos altamente conservados entre esta familia de proteínas (Figura 15). Para evaluar la importancia de estos residuos para la función de EscK se seleccionaron algunos residuos altamente conservados y otros aminoácidos aledaños a estos y se sustituyeron por alanina²³ mediante mutagénesis sitio dirigida para probar la capacidad de estas proteínas con mutaciones puntuales de restaurar la secreción de proteínas en un fondo $\Delta escK$. Las sustituciones que se generaron en EscK fueron W26A, L93A, D100A, Y101A, F103A, S104A, Y107A, R108A, Q122A y P171A. Los resultados muestran que cuando las versiones mutantes de His-EscK son expresadas desde un plásmido derivado de pET19b en la cepa $\Delta escK$, las mutaciones L93A y S104A no tienen efecto alguno sobre la función de EscK pues complementan la secreción de proteínas al mismo nivel que el alelo EscK silvestre. Las versiones de His-EscK W26A, F103A, Q122A y P171A aunque restauran la secreción de proteínas, lo hacen sólo parcialmente. Por su parte, las versiones mutantes EscK D100A, Y101A, Y107A y R108A pierden del todo su capacidad de complementar a la mutante $\Delta escK$ (Figura 30).

²³ La alanina es ampliamente usada en mutagénesis sitio dirigida ya que es un aminoácido químicamente inerte, no voluminoso y que no altera radicalmente la estructura de la proteína de interés (Cunningham and Wells 1989).

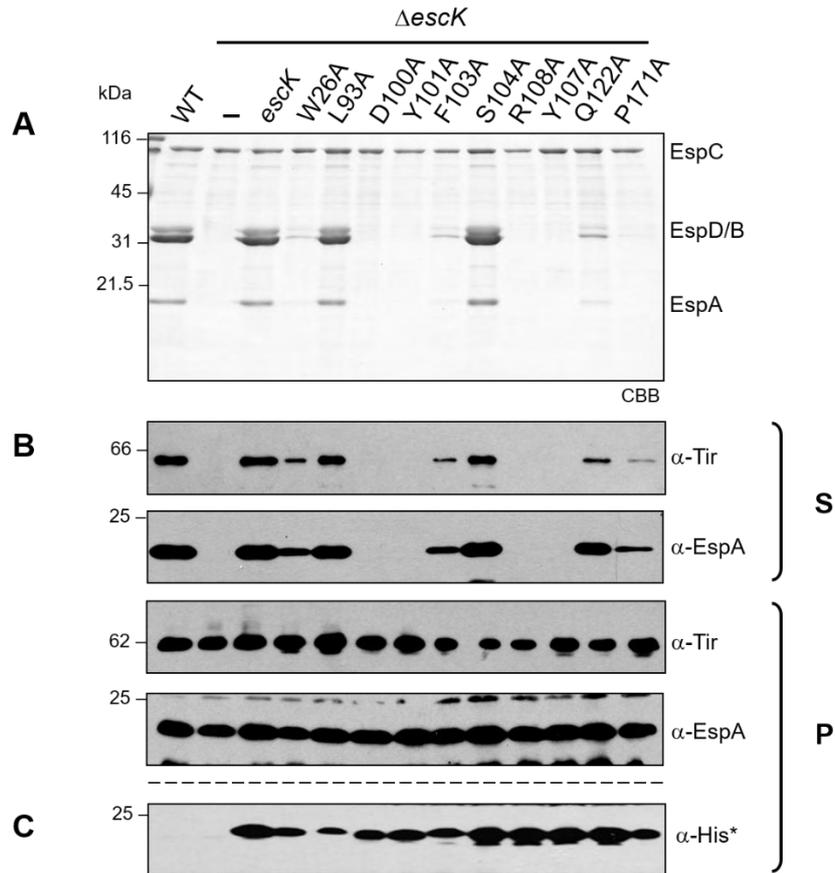


Figura 30. Identificación de residuos importantes para la función de EscK mediante mutagénesis sitio dirigida. Perfil de secreción de proteínas de las cepas EPEC silvestre (WT) y las cepas $\Delta escK$ transformadas con el vector pET19b vacío (-) o la construcción basada en pET19b que expresa His-EscK o sus versiones con las mutaciones puntuales. (A) Las proteínas secretadas se recuperaron del sobrenadante y se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie. (B) La presencia del efector Tir y del translocador EspA tanto en el sobrenadante (S) como en la pastilla celular (P) se examinó con anticuerpos policlonales anti-Tir y anti-EspA. (C) La producción de las distintas versiones de His-EscK se analizó en un ensayo de secreción idéntico pero con construcciones basadas en el vector pTrc99A, que permite niveles de producción de la proteína de interés en EPEC suficientes para ser detectado por el anticuerpo anti-His.

Debido a que EscK interacciona directamente con EscQ, nos preguntamos si el defecto en la función de las versiones mutantes puntuales EscK D100A, Y101A, Y107A y R108A se debía a la pérdida de interacción con EscQ. Los 4 alelos de EscK que perdieron la función se clonaron en el vector pGBKT7 y mediante el sistema de doble híbrido en levadura se probó si cada una de estas versiones mutantes interaccionan con EscQ. Los resultados mostraron que las mutaciones puntuales EscK Y101A y Y107A perdieron su capacidad para interaccionar con EscQ mientras

que las versiones EscK D100A y R108A aún son capaces de interactuar con esta proteína (Figura 31A).

Los resultados de interacción se verificaron mediante ensayos de co-purificación. A través de un nuevo ciclo de mutagénesis dirigida se generaron las 4 mutaciones puntuales no funcionales de la versión recombinante MBP-EscK. Es importante mencionar que estas 4 versiones de MBP-EscK tampoco son funcionales ya que a diferencia de la versión recombinante silvestre MBP-EscK, éstas no pudieron restaurar la secreción de la cepa Δ escK (dato no mostrado). Una vez obtenidas las versiones mutantes de MBP-EscK se procedió a realizar ensayos de interacción mediante co-purificación de la misma manera como se hizo para detectar la interacción entre GST-EscQ y MBP-EscK silvestre (Figura 21). Se observó que mientras que las versiones MBP-EscK D100A y R108A fueron retenidas por GST-EscQ (aunque en menor medida que MBP-EscK silvestre), las versiones puntuales MBP-EscK Y101A y Y107A pierden del todo su afinidad por GST-EscQ (Figura 31B).

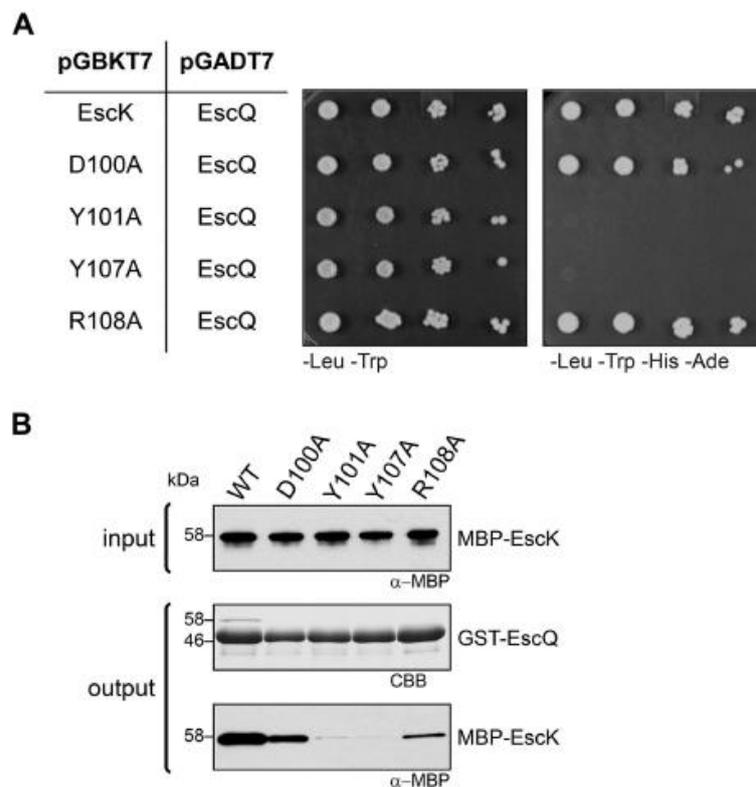


Figura 31. Identificación de los aminoácidos de EscK involucrados en la interacción con EscQ. (A) Las mutantes de EscK no funcionales (D100A, Y101A,

Y107 y R108A) se sub-clonaron en el vector pGBKT7 y se probó su interacción con EscQ. (B) La interacción de cada una de las mutantes puntuales no funcionales de EscK con GST-EscQ se corroboró mediante ensayos de co-purificación.

En conjunto, estos resultados muestran que los residuos D100, Y101, Y107 y R108 de EscK son críticos para su función en el SST3. También se concluye que las tirosinas 101 y 107 de EscK se encuentran directamente involucradas en la interfase de interacción con EscQ. También se infiere que el defecto de las mutantes puntuales D100A y R108A se debe a una razón distinta a su interacción con EscQ.

Dominancia negativa de EscK sobre el SST3

Se ha visto que la expresión de versiones mutantes de componentes estructurales del SST3 que no son funcionales puede llevar a un mal funcionamiento del inyectisoma en un fondo silvestre (Okabe et al. 2009; Davis, De Jesús Díaz, & Mecsas 2010; Gamez et al. 2012). A este efecto donde una proteína mutante no funcional se expresa y compite con la proteína silvestre funcional se le conoce como dominancia negativa (Herskowitz 1987; Veitia 2007). Para probar si las mutaciones puntuales de EscK con pérdida de función (D100A, Y101A, Y107A y R108A) ejercen un efecto negativo sobre la secreción de EPEC, las 4 versiones puntuales se sub-clonaron en el vector de expresión pTrc99A, se transformaron en EPEC silvestre y se hicieron ensayos de secreción con estas cepas. Los resultados mostraron que la expresión de las versiones puntuales Y101A y Y107A no tiene efecto sobre la secreción de EPEC silvestre, en cambio la producción de las variantes D100A y R108A que, aunque no son funcionales, retuvieron la capacidad de interactuar con EscQ, afecta la secreción de proteínas por el SST3 (Figura 32). Como control, se muestra que ni la presencia del vector vacío pTrc99A ni la expresión de His-EscK tienen un efecto sobre la secreción de proteínas en EPEC silvestre (Figura 32).

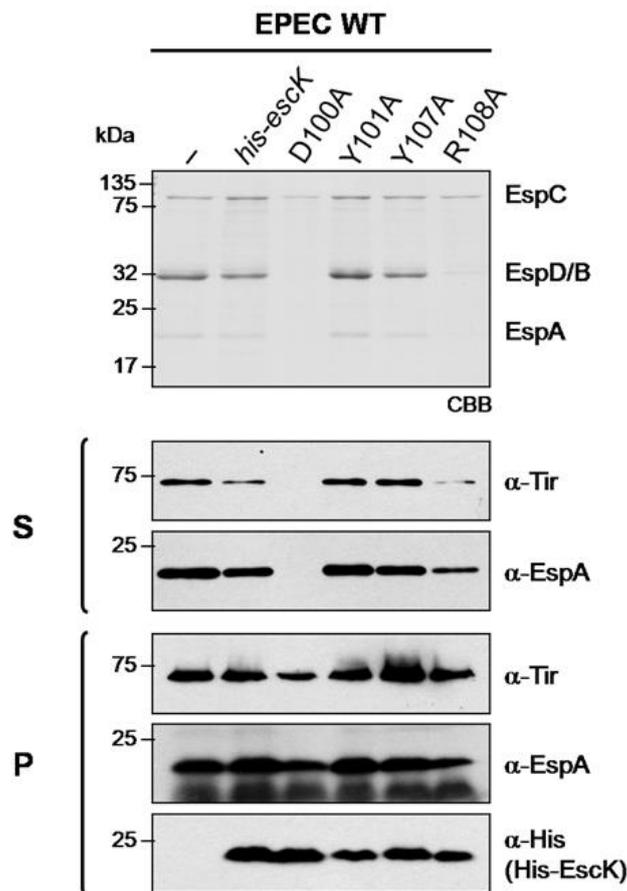


Figura 32. Dominancia negativa de las versiones mutantes no funcionales de EscK sobre el SST3 de EPEC silvestre. Ensayos de secreción de EPEC silvestre (WT) transformada con el plásmido vacío pTrc99A (-), con el mismo plásmido expresando His-EscK o expresando sus variantes puntuales indicadas. Las proteínas recuperadas del sobrenadante se analizaron mediante tinción con Coomassie (CBB) y la presencia de Tir y EspA en el sobrenadante (S) y en la pastilla celular (P) se examinó mediante inmunodetección. También se corroboró la expresión de His-EscK y sus variantes puntuales en cada una de las cepas mediante inmunodetección usando anticuerpos anti-His.

Estos resultados sugieren que las variantes no funcionales que aún son capaces de formar complejo con EscQ están siendo incorporadas al aparato de exportación a través de esta interacción y una vez ahí estarían obstaculizando el correcto funcionamiento de la maquinaria de secreción.

Recientemente se reportó que la motilidad de *E. coli* se ve drásticamente reducida cuando el operón *LEE1* de EPEC se sobre-expresa en este fondo (Ruano-Gallego, Álvarez, & Fernández 2015), lo que sugirió que alguna proteína codificada en este operón podría estar interviniendo en el funcionamiento o ensamblaje del flagelo.

Tomando en cuenta este antecedente y considerando que el flagelo y el inyector son sistemas parálogos (ver introducción), se investigó si la proteína EscK, codificada por el cuarto gen del operón *LEE1*, podría ser la responsable de este efecto inhibitorio en el flagelo bacteriano. Colonias de EPEC silvestre recién transformadas con el vector vacío (pTrc99A) o con su derivado que expresa a His-EscK se picaron en cajas con agar suave (ver materiales y métodos) para probar la capacidad motriz de las bacterias. Como se muestra en la Figura 33, la sobreproducción de His-EscK inhibe drásticamente el nado bacteriano. Del mismo modo, se probó el efecto de la sobre-expresión de las versiones puntuales no funcionales sobre el nado bacteriano. En concordancia con los resultados de dominancia negativa en la secreción de EPEC, encontramos que las variantes de EscK D100A y R108A inhiben el sistema flagelar de esta bacteria mientras que las mutantes Y101A y Y107A no tienen efecto alguno sobre este aparato de motilidad.

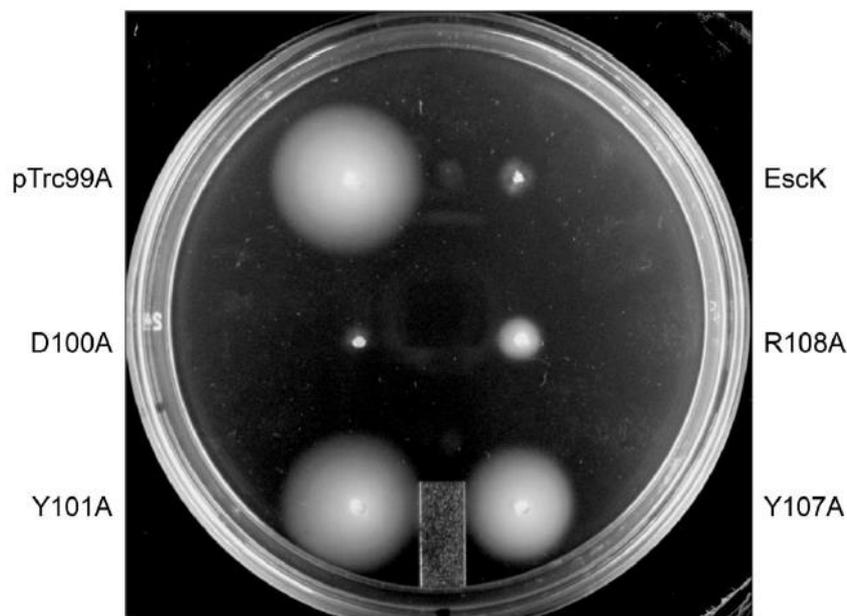


Figura 33. La expresión de EscK interfiere con el funcionamiento del flagelo de EPEC. Ensayos de motilidad bacteriana de la cepa EPEC silvestre transformada con el vector pTrc99A o las construcciones basadas en pTrc99A expresando His-EscK o sus mutantes puntuales correspondientes. Se muestra una imagen representativa de al menos tres experimentos independientes. Las cajas de agar semi-sólido se incubaron por 7 h a 37 °C.

La sobre-producción de sustratos compensa parcialmente la ausencia de componentes de la plataforma de clasificación

En el sistema flagelar se ha reportado que el anillo C, la contraparte evolutiva de la plataforma de clasificación del inyectisoma, no es necesario si se sobre-produce a la ATPasa flagelar Flil (Konishi et al. 2009) o si se sobre-expresan los operones flagelares mediante el regulador maestro FlhDC (Erhardt&Hughes 2010). Estos antecedentes dieron pie a proponer un modelo donde el anillo C, además de localizar a la ATPasa, estaría realizando un papel activo o pasivo directamente relacionado con el reconocimiento de sustratos que serán secretados (Erhardt&Hughes 2010).

Con estos antecedentes en mente, generamos la hipótesis de que quizá la plataforma de clasificación de los inyectisomas estaría cumpliendo una función de reclutamiento de sustratos. Para probar esta hipótesis, se sobre-produjeron distintos sustratos del sistema en mutantes nulas no polares. Para esto usamos construcciones basadas en el vector de alto número de copias pTOPO-2HA que fusiona dos epítomos de HA a genes que codifican proteínas translocadoras o efectoras, sustratos del SST3 de EPEC. Las cepas transformadas con estas construcciones se crecieron en condiciones donde la expresión de los genes del SST3 se encuentra inducida y se recuperaron las proteínas del sobrenadante.

Los resultados mostraron que todos los sustratos probados fueron eficientemente secretados al sobrenadante de la cepa de EPEC silvestre pero no en las cepas $\Delta escN$ o $\Delta escU$ (la proteína EscU es un componente del aparato de exportación, esencial para el proceso de secreción de proteínas vía inyectisoma) las cuales sirvieron como control negativo del experimento (Figura 34, panel S). Sin embargo, de manera sorpresiva, todos los sustratos que se probaron fueron consistentemente detectados en el sobrenadante de la cepa mutante $\Delta escK$ aunque en niveles mucho menores en comparación con la cepa EPEC silvestre (Figura 34, panel S).

Este resultado nos llevó a explorar si se producía este mismo fenotipo en ausencia de EscQ y EscL, los otros dos componentes de la plataforma de clasificación de EPEC. Encontramos que la cepa mutante $\Delta escL$ se comportaba de manera idéntica

a la mutante ΔescK secretando consistentemente todos los sustratos probados, aunque en niveles reducidos en comparación con EPEC silvestre. En cambio, en la mutante ΔescQ sólo se observó secreción del translocador EspA-HA en el sobrenadante cuando este translocador fue sobre-producido (Figura 34, panel S).

El hecho de que en este experimento detectáramos secreción en ausencia de EscK o de EscL nos llevó a preguntarnos si aún en ausencia de EscK y de EscL los sustratos podían ser secretados. Para probar esto, se generó la doble mutante no polar $\Delta\text{escK}\Delta\text{escL}$ y se realizó el mismo experimento de sobre-producción de sustratos en condiciones de secreción. Como se observa en la Figura 34, todos los sustratos probados se detectaron en el sobrenadante de la cepa $\Delta\text{escK}\Delta\text{escL}$, comportándose de manera idéntica a las mutantes sencillas.

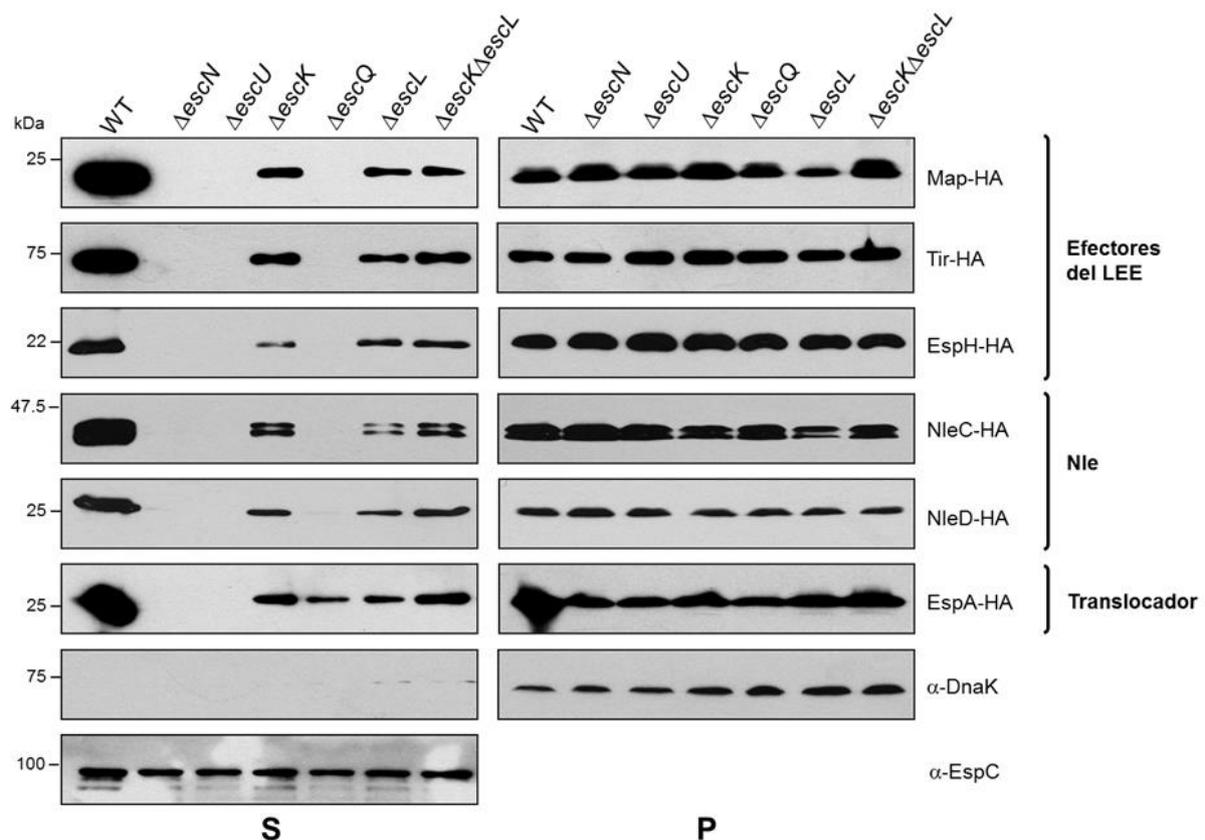


Figura 34. La integridad de la plataforma de clasificación no es esencial para la secreción si se sobre-producen los sustratos. Las cepas indicadas en la parte superior se transformaron con construcciones que expresan diversos sustratos clonados en el vector pTOPO-2HA. Las cepas se crecieron en condiciones de inducción del SST3 y la presencia de los sustratos etiquetados con HA en el sobrenadante (S) y en la pastilla celular (P) se analizó mediante inmunodetección

usando anticuerpos anti-HA. Se muestra también la inmunodetección de DnaK como control de lisis celular en el sobrenadante y como control de carga en la pastilla celular, respectivamente. También se muestra la detección del autotransportador EspC como control de carga en el sobrenadante para mostrar que se cargaron cantidades equivalentes de muestra de las distintas cepas.

Es importante notar que todos los sustratos probados se produjeron a los mismos niveles en las distintas cepas probadas (Figura 34, panel P).

Para determinar si los sustratos sobre-producidos detectados en el sobrenadante de la cepa $\Delta escK$ se secretaron específicamente a través del SST3 se generó la cepa doble mutante $\Delta escN\Delta escK$. Si los sustratos son secretados específicamente a través del SST3, entonces en esta doble mutante no se debería detectar señal de sustratos en el sobrenadante ya que, como se observa en la Figura 34, la ATPasa EscN es esencial para la salida de sustratos aun cuando éstos son sobre-producidos. Si los sustratos detectados en la cepa $\Delta escK$ fueron secretados por una vía distinta al injectisoma, entonces la ausencia de EscN en la cepa $\Delta escN\Delta escK$ no afectaría la secreción en esta mutante. Como se observa en la Figura 35, los sustratos probados únicamente se detectaron en la mutante sencilla $\Delta escK$ pero no en el sobrenadante de la doble mutante $\Delta escN\Delta escK$ demostrando que los sustratos detectados en el sobrenadante de la cepa $\Delta escK$ son específicamente secretados a través del SST3 de EPEC.

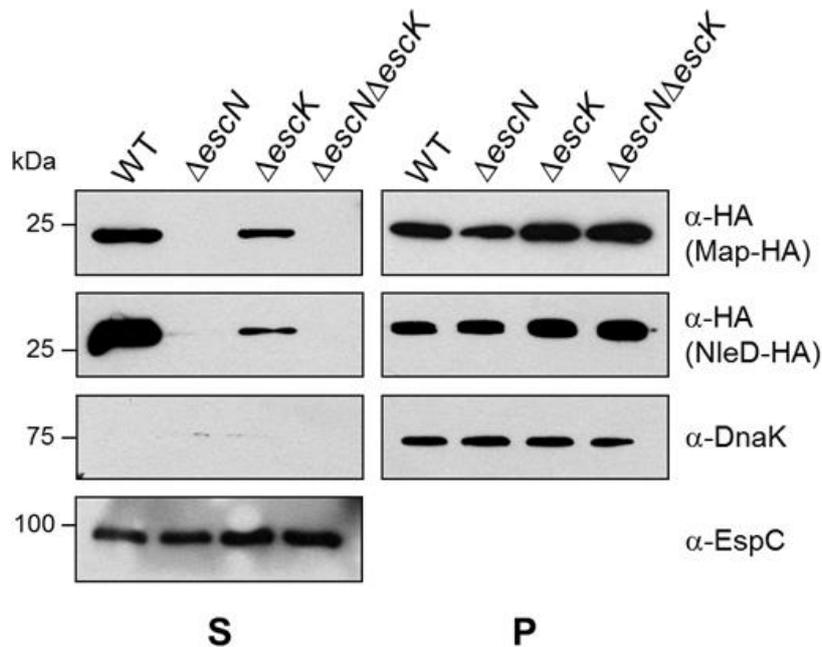


Figura 35. Los sustratos detectados en el sobrenadante de la cepa Δ escK son secretados específicamente a través del SST3 de EPEC. Las cepas indicadas se transformaron con la construcción en pTOPO-2HA que sobre-expresa al sustrato Map-HA o NleD-HA y se hicieron ensayos de secreción. La presencia de los sustratos en el sobrenadante (S) y en la pastilla celular (P) se evaluó mediante inmunodetección usando anticuerpos anti-HA. Se muestra la inmunodetección de la chaperona intracelular DnaK como control de lisis celular en el sobrenadante y como control de carga en la pastilla celular respectivamente. También se muestra la detección del autotransportador EspC como control de carga en el sobrenadante para mostrar que se cargaron cantidades equivalentes de muestra en el sobrenadante de las distintas cepas.

Estos resultados demuestran, por primera vez en los SST3, que aún en ausencia de componentes de la plataforma de secreción, el injectisoma de EPEC es funcional y puede secretar sustratos cuando hay un exceso de éstos.

El ensamblado de los componentes de la plataforma de clasificación puede ser monitoreado con proteínas fluorescentes

Se ha propuesto que EscK, junto con EscQ y EscL, forma un ensamblado anular de alto peso molecular en la cara citoplásmica de la base del injectisoma (Lara-Tejero et al. 2011, Hu et al. 2017). La vía de ensamblaje y la dinámica intracelular del anillo

formado por YscQ, homólogo de EscQ en *Y. enterocolitica*, han sido descifradas exitosamente fusionando la proteína YscQ a proteínas fluorescentes (ver Antecedentes) (Diepold et al. 2010; Diepold et al. 2015) sin embargo, poco se conoce del proceso de ensamblaje de los componentes EscK y de EscL. Para comenzar a estudiar estos aspectos de los componentes de la plataforma de clasificación se decidió generar construcciones de los componentes de la plataforma de clasificación fusionados a marcadores fluorescentes.

Previamente en el laboratorio, se habían generado construcciones donde los genes *escK*, *escL* y *escQ* se clonaron en el sitio de multiclonación del vector pBAD. Debido a que este vector permite una regulación fina de los niveles de transcripción del gen de interés al estar controlado por el promotor de arabinosa (pBAD), se aprovecharon estas construcciones para fusionar el gen sfGFP al carboxilo de los 3 genes que codifican a la plataforma de clasificación que se encuentran clonados en este vector (Figura 36).

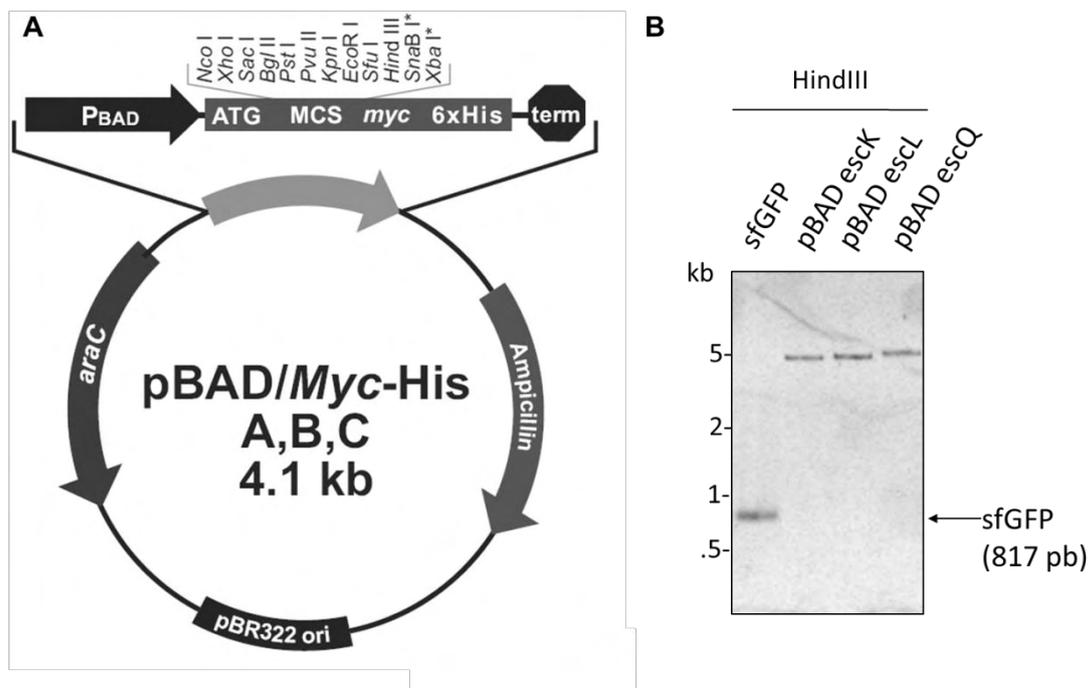


Figura 36. (A) Diagrama esquemático del vector de expresión pBAD/Myc-His. (B) Electroforesis en gel donde se muestran el producto de PCR de sfGFP y las construcciones purificadas que expresan a los componentes de la plataforma de secreción. Previamente, tanto el producto de PCR como las construcciones se digirieron con la enzima HindIII y se purificaron.

Una vez obtenidas y verificadas las construcciones candidatas (ver materiales y métodos) se procedió a examinar la expresión y funcionalidad de las fusiones fluorescentes de las proteínas de la plataforma de clasificación. Las construcciones que expresan a EscK-sfGFP, EscQ-sfGFP y EscL-sfGFP se introdujeron en la cepa XL1 y la expresión de dichas proteínas se indujo con 0.1% de arabinosa. Como se observa en la Figura 37, al analizar el perfil intracelular de proteínas de estas cepas inducidas se detectó claramente cada una de las bandas que corresponden a las fusiones fluorescentes de EscQ, EscL y EscK. Adicional a esto, cabe mencionar que los cultivos bacterianos de estas cepas tenían un aspecto verde a simple vista (dato no mostrado). Posteriormente se evaluó la funcionalidad de cada una de las fusiones fluorescentes de las proteínas de la plataforma examinando la capacidad para restaurar la secreción de su respectiva cepa mutante nula. Las construcciones que codifican para EscQ o EscQ-GFP, para EscL o EscL-GFP y EscK o EscK-GFP se transformaron en las cepas mutantes $\Delta escQ$, $\Delta escL$ o $\Delta escK$, respectivamente, y se crecieron en DMEM para examinar las proteínas secretadas al medio. Se encontró que las 3 proteínas fluorescentes, EscQ-GFP, EscL-GFP y EscK-GFP, a pesar de estar fusionadas sfGFP (27 kDa), restauran la secreción de su respectiva mutante a niveles silvestres (Figura 37).

Estos resultados indican que las fusiones fluorescentes de la plataforma de clasificación son enteramente funcionales por lo que podemos obtener datos biológicamente relevantes a partir de estas herramientas moleculares.

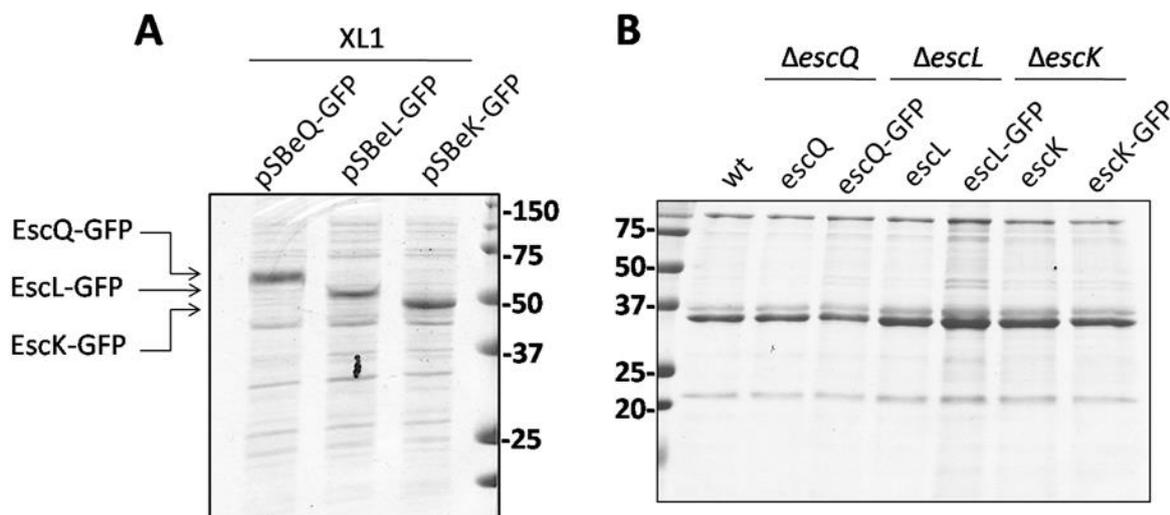


Figura 37. Expresión de las fusiones fluorescentes EscQ-GFP, EscL-GFP y EscK-GFP y complementación de las cepas mutantes. (A) Las construcciones pSBeQ-GFP, pSBeL-GFP y pSBeK-GFP se transformaron en la cepa de *E. coli* XL1 y su expresión se indujo al adicionar 0.1% de arabinosa al medio de cultivo. Las proteínas expresadas se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie. Los pesos esperados aproximados de las proteínas recombinantes son: EscQ-sfGFP, 63 kDa; EscL-sfGFP, 54 kDa; EscK-sfGFP, 50 kDa. (B) Las cepas mutantes $\Delta escQ$, $\Delta escL$ y $\Delta escK$ se transformaron con los plásmidos de pBAD que expresan a EscQ, EscL, EscK o a las fusiones fluorescentes de éstas. Con dichas cepas transformadas se hicieron ensayos de secreción y las proteínas del sobrenadante se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie.

Para determinar si las fusiones fluorescentes son capaces de reportar el estado de ensamblaje de la plataforma de clasificación, la cepa mutante $\Delta escQ$ transformada con la construcción pSBeQ-GFP se creció en condiciones de inducción del SST3 y se analizó el patrón de fluorescencia de las proteínas en las células bajo el microscopio de fluorescencia. En la cepa $\Delta escQ$, se observaron puntos discretos fluorescentes en la periferia membranal de EPEC que muy posiblemente reflejan el ensamblado oligomérico de EscQ en los inyectosomas (Figura 38). Como control negativo usamos a la cepa $\Delta escD$ ya que se ha reportado que el anillo de membrana interna formado por EscD es esencial para la formación del cuerpo basal y, por ende, para la formación de toda la estructura citoplásmica del inyectisoma (Diepold et al. 2010). Como se observa en la figura 39, la expresión de EscQ-GFP en esta cepa no forma puntos fluorescentes sino que la señal se ve distribuida a través de todo el citoplasma de la bacteria, lo que corrobora que los puntos

observados en la cepa $\Delta escQ$ corresponden a oligómeros de EscQ-sfGFP adosados a la base del SST3 de EPEC.

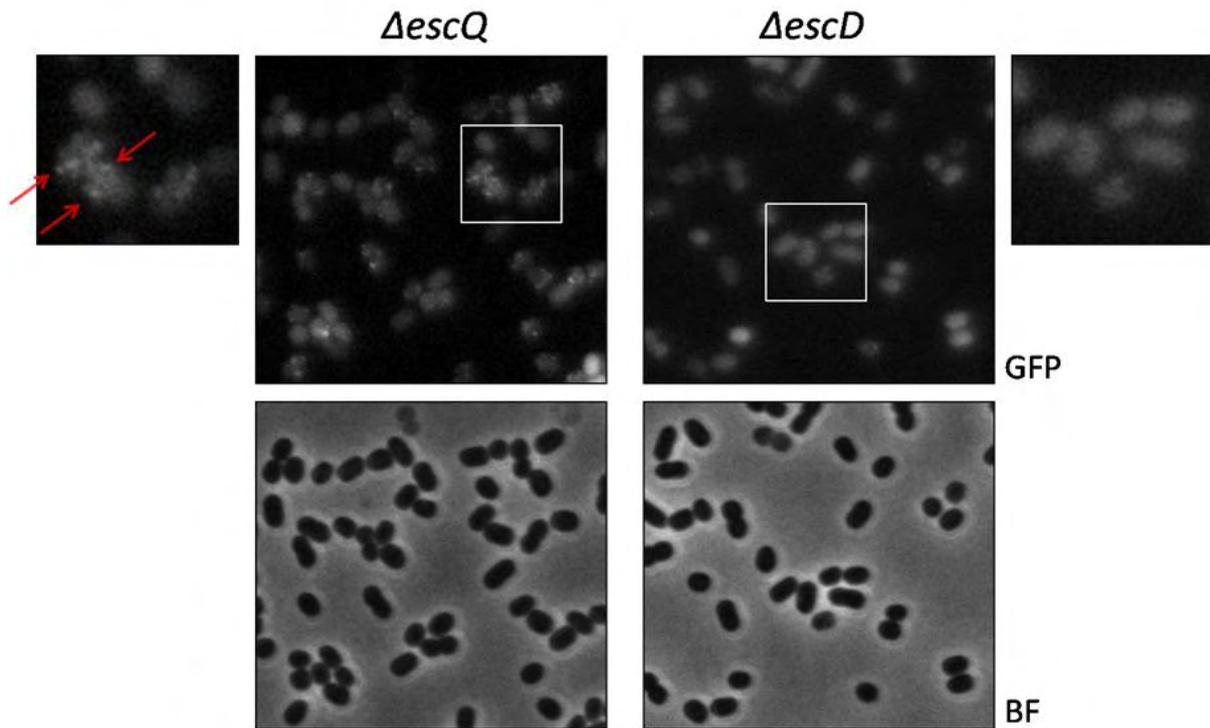


Figura 38. EscQ-GFP forma puntos fluorescentes discretos cuando se complementa a la cepa $\Delta escQ$ pero no cuando se expresa en la cepa carente de cuerpo basal $\Delta escD$. Las cepas de EPEC $\Delta escQ$ y $\Delta escD$ se transformaron con la construcción que expresa EscQ-GFP y se crecieron en condiciones de inducción del SST3. Las células se observaron en el microscopio de epifluorescencia y se muestran las imágenes obtenidas de fluorescencia y de campo claro. En los extremos de la figura se muestran las ampliaciones de los recuadros blancos. Las flechas rojas indican la localización de los puntos de fluorescencia de EscQ-GFP.

DISCUSIÓN

Dada la importancia médica del SST3, han existido numerosos esfuerzos internacionales por entender a fondo el funcionamiento de este dispositivo bacteriano. A pesar de esto, existen aún preguntas sin resolver acerca del ensamblaje, la estructura y el papel de los componentes del inyectisoma. Uno de estos grandes vacíos de información es que aún hoy en día hay proteínas asociadas al SST3 cuya función en el inyectisoma se desconoce.

Debido a que la proteína EscK no presenta similitud de secuencia con ninguna otra proteína caracterizada, no es posible atribuirle una función probable mediante extrapolación con alguna proteína homóloga de otro SST3. Sin embargo, se ha visto que proteínas del SST3 que pertenecen a la misma familia funcional no necesariamente presentan similitud estadísticamente significativa en su secuencia de aminoácidos. Asimismo, se ha observado que los genes que codifican para las proteínas de una misma familia frecuentemente se encuentran asociados al mismo contexto genómico (Monjarás Feria et al. 2012; Romo-Castillo et al. 2014; H. J. Betts et al. 2008; Morello&Collmer 2009). ¿Esto refleja que la presión selectiva para conservar el orden en el que se encuentran los genes en las distintas bacterias con SST3 es mayor que la presión para conservar la estructura primaria de las proteínas? Recientemente se encontró que, en los operones bacterianos que codifican para ensamblajes multiméricos, el orden en el que se encuentran los genes que codifican para las subunidades de estos complejos refleja el orden de ensamblado (Wells, Therese Bergendahl, & Marsh 2016). Esta optimización de la ruta de ensamblaje puede ser la responsable de la fuerte presión evolutiva que existe para conservar la sintenia de los genes en los operones que codifican para los componentes del SST3 de los diversos procariontes. En nuestro caso, el análisis de contexto genómico (Figura 16) fue la pista inicial para proponer que la proteína codificada por el gen *orf4* podría pertenecer a la familia SctK.

Por otro lado, tomando en cuenta que el inyectisoma se originó a partir de un flagelo ancestral, nos dimos a la tarea de comparar el contexto genómico de la familia StcK con el contexto de los operones flagelares. Encontramos que el gen *fliG* se

encuentra río abajo de *fliF* (homólogo de *sctJ*) y río arriba de *fliH* (homólogo de *sctL*), el cual es un contexto idéntico al de los genes que codifican para integrantes de la familia SctK (Figura 16). Este dato, aunado al hecho de que, en el flagelo, FliG interacciona directamente con FliM (homólogo de SctQ) nos invita a pensar que FliG es un homólogo remoto de la familia SctK. Esta hipótesis ha sido sugerida con anterioridad (S. Johnson&Blocker 2008), sin embargo, dado que la huella filogenética (de haber existido) no se conservó en la estructura primaria de estas proteínas, no es posible deducir homología con base en la secuencia de aminoácidos. No obstante, futuros estudios estructurales de proteínas de la familia SctK podrían ayudar a develar similitudes conservadas entre los miembros remotos de esta familia e incluso con FliG. Cabe mencionar que la estructura de FliG de distintos organismos ya ha sido resuelta (códigos de PDB: 3HJL, 3AJC, 1QC7, 4QRM) por lo que sólo sería necesario determinar la estructura de un miembro de la familia SctK para esclarecer esta posible similitud.

A pesar de ser un componente crucial de la maquinaria de los inyectisomas, la familia SctK es posiblemente el grupo de proteínas menos estudiado de los SST3 bacterianos. Previamente, sólo se había reportado que las proteínas pertenecientes a la familia SctK son esenciales para el proceso de secreción de sustratos vía SST3 y que interaccionan con integrantes de la familia SctQ y SctL que conforman la plataforma de clasificación y con la ATPasa SctN (Jouihri et al. 2004; Morita-Ishihara et al. 2006; Jackson&Plano 2000).

El fenotipo de secreción y de hemólisis de la cepa mutante Δ escK mostró que la proteína EscK juega un rol central en el proceso tanto de ensamblaje como de funcionamiento del SST3 de EPEC. Tomando en cuenta sólo estos resultados, este fenotipo es idéntico al reportado para las mutantes Δ yscK de *Y. pestis* (Fowler et al. 2009), Δ mxik de *S. flexneri* (Jouihri et al. 2004) y Δ orgA de *S. enterica* (Klein, Fahlen, & Jones 2000). Sin embargo, un análisis más detallado del fenotipo de secreción mostró que el componente EscK no es esencial cuando existe una poza excedente de sustratos en el interior de la bacteria (Figura 35). Como nuestros datos mostraban que EscK se encuentra funcionalmente relacionada con EscQ y que estas dos proteínas junto con EscL forman la llamada plataforma de clasificación en EPEC, extendimos este mismo análisis a las mutantes Δ escQ y

ΔescL . Sorpresivamente encontramos que al igual que la cepa ΔescK , la mutante ΔescL puede secretar proteínas de virulencia cuando éstas se encuentran en exceso. Nos preguntamos entonces si este fenotipo idéntico de las mutantes ΔescK y ΔescL podría indicar redundancia funcional de estos dos componentes. Para probar esta hipótesis se generó la doble mutante no polar $\Delta\text{escK}\Delta\text{escL}$ y se probó si el exceso de sustratos podía compensar la ausencia de ambos componentes. Encontramos que en esta doble mutante, aunque no con la misma eficiencia que el inyectisoma silvestre, los sustratos pueden ser secretados (Figura 35). El hecho de que el fenotipo de la doble mutante no sea aditivo en comparación con las mutantes sencillas sugiere que los componentes EscK y EscL a pesar de estar relacionados funcionalmente no actúan de manera sinérgica.

Por otra parte, la mutante ΔescQ , a diferencia de las otras 2 mutantes de la plataforma de clasificación, no puede ser compensada por un excedente de efectores pero sí cuando el translocador EspA es sobreproducido. Esto podría indicar que existe un reconocimiento diferencial de las distintas categorías de sustratos por diferentes componentes de la plataforma de clasificación, es decir, que EscQ sea esencial para el reconocimiento de translocadores pero no para el de efectores. Otra posible explicación es que dado que EscQ es el componente principal de la plataforma de clasificación, posiblemente la mutante ΔescQ requiera de una mayor concentración de sustratos para permitir la secreción.

En conjunto, los resultados de los experimentos de sobre-producción de sustratos fueron cruciales para entender la naturaleza funcional de EscK en el inyectisoma, ya que el conjuntar estos datos nos permitió proponer un modelo funcional de EscK y de la plataforma de clasificación de los inyectisomas:

La plataforma de clasificación, además de proveer una estación de interacción donde los sustratos son temporalmente ordenados para su secreción, también funge como una plataforma de afinidad incrementando la concentración local de sustratos en la vecindad del aparato de exportación para hacer eficiente el proceso de secreción. En ausencia de EscK o de EscL, se reduce la frecuencia con la que EscQ -el componente mayoritario de la plataforma de clasificación- se ensambla en el inyectisoma, pero de manera ocasional se puede ensamblar permitiendo la secreción de sustratos. Es por esta razón que en ausencia de EscK sólo vemos

secreción cuando los sustratos se encuentran en exceso; como la concentración de sustratos dentro de la bacteria aumenta, ya no es necesario que la plataforma incremente la concentración de sustratos de manera local. Esta interpretación concuerda con las propuestas recientes en otros SST3, donde el ensamblaje del “núcleo” del SST3, formado por el cuerpo basal y el aparato de exportación en la membrana bacteriana, no requiere de los componentes citoplásmicos (Diepold et al. 2010, Wagner et al. 2010). Es posible entonces que este núcleo primordial del SST3 sea suficiente para llevar a cabo la secreción de sustratos.

Es importante notar que los datos obtenidos en este trabajo acerca de la función de EscK podrían ser extrapolados a sus homólogos cercanos e incluso a toda la familia SctK. En este trabajo se probó si la proteína STM1410, homólogo de EscK codificado en la SPI-2 de *S. enterica*, era capaz de sustituir la función de EscK en EPEC. Aunque la proteína recombinante se expresa en EPEC, ésta no restauró la secreción de proteínas del SST3 (Figura 19). En *S. flexneri* se había reportado que la función de Spa33 (SctQ) no puede ser reemplazada por la expresión de homólogos cercanos (Morita-Ishihara et al. 2006). Aunque aún queda por determinar si la versión recombinante His-STM1410 que se usó en este trabajo es capaz de restaurar la secreción en *S. enterica* de la cepa Δ STM1410, es posible que este resultado muestre la especificidad en la función de los componentes de la plataforma de clasificación en cada bacteria.

Mediante dos técnicas distintas e independientes demostramos que EscK interacciona de manera directa con EscQ, el componente principal de la plataforma de clasificación de EPEC (Figuras 20 y 21). La interacción EscK con EscQ parece ser importante para el funcionamiento del inyectisoma ya la sustitución de dos tirosinas de EscK que participan directamente en la interacción con EscQ, abate por completo la función de EscQ (Figura 32). En el flagelo, FliG (EscK) interacciona con FliM (EscQ) para adosar al anillo citoplásmico, formado por esta última proteína, al cuerpo basal del flagelo (Passmore et al. 2008; Lam et al. 2013). Es sumamente tentador proponer que EscK cumple la tarea de un puente estructural uniendo el anillo citoplásmico (EscQ) al cuerpo basal. De hecho, la reciente crio-tomografía de alta resolución del inyectisoma de *S. enterica* muestra que, en efecto, OrgA (EscK) es el enlace entre SpaO (EscQ) y PrgH (EscD) (Hu et al. 2017). Para evaluar esta

hipótesis se probó mediante doble híbrido en levadura y ensayos de co-purificación la interacción de EscK con las proteínas que forman el cuerpo basal de membrana interna como EscJ y EscD (Karen Mojica, datos no publicados), sin embargo no nos fue posible detectarla. Debido al alto porcentaje de falsos negativos de este sistema de exploración de interacciones proteína-proteína, no descartamos que *in vivo*, EscK interactuara con alguna proteína del cuerpo basal.

Siguiendo un protocolo ampliamente usado en EPEC para separar los distintos compartimentos celulares (citoplasma, periplasma, membrana interna y membrana externa) (Gauthier, Puente, & Finlay 2003; Sal-Man, Biemans-Oldehinkel, et al. 2012; Shaulov et al. 2017; Biemans-Oldehinkel et al. 2011) encontramos que EscK se localiza tanto en el citoplasma como en la membrana bacteriana. Esta distribución es independiente de la presencia de los componentes del SST3 de EPEC ya que en un fondo Δler (donde la isla LEE no se expresa) y aún en un fondo de *E. coli* no patogénico (BDP sin SST3), EscK se asocia con la membrana bacteriana. Esta localización coincide con la de EscQ -compañero de interacción de EscK- que corroboramos en este trabajo (Figura 30) y que ya había sido reportada anteriormente (Biemans-Oldehinkel et al. 2011). Sin embargo, sería importante contrastar los resultados de localización obtenidos mediante este protocolo con otros métodos de fraccionamiento bacteriano como un gradiente de sacarosa (Blank & Donnenberg 2001; Laskowska 2004). No obstante, es importante mencionar que ha sido descrito que otros componentes, tanto del inyectisoma como del flagelo bacteriano, presentan una preferencia intrínseca por la membrana a pesar de no tener cruces transmembranales (Auvray et al. 2002, Biemans-Oldehinkel et al. 2011). Sin embargo, en *Yersinia enterocolitica* se ha reportado que la localización focalizada de YscQ (EscQ) en la base del inyectisoma sí requiere la presencia de YscL (EscL) y de YscK (EscK). Es posible entonces que la preferencia intrínseca por la membrana de EscK facilite su rápida incorporación a la maquinaria de secreción, pero que el ensamblado final en la base sí requiera de otros componentes.

Cuando se realizó un alineamiento múltiple entre EscK y sus homólogos identificados por BLAST encontramos numerosos residuos conservados. De este conjunto de aminoácidos, seleccionamos 10 para cambiarlos por alanina y poder evaluar la contribución individual de cada uno a la función de EscK. Encontramos

tres residuos, el W26, F103 y Q122 que al cambiarlos por alanina afectaron parcialmente la función de EscK. Cuatro mutaciones en esta proteína, D100A, Y101A, Y107A y R108A abatieron por completo la capacidad de EscK para restaurar la secreción de la mutante Δ escK. Para poder explicar por qué resultan esenciales estos residuos probamos su capacidad para interactuar con EscQ. Nuevamente por dos metodologías distintas, se demostró que mutaciones en los residuos Y101 y Y107 afectan la interacción de EscK con EscQ. Este resultado muestra que la interacción de EscK con EscQ es importante para el funcionamiento correcto del inyectisoma de EPEC. La pérdida de función de las versiones mutantes EscK D100A y R108A posiblemente se deba a la interrupción de alguna otra interacción no detectada en este trabajo con otro componente del inyectisoma de EPEC.

Encontramos también que las mutantes D100A y R108A que no son funcionales pero que aún son capaces de interactuar con EscQ presentan dominancia negativa sobre la secreción de proteínas en la cepa de EPEC silvestre. Esto indica que este par de mutantes no funcionales aún están siendo incorporadas a la maquinaria de secreción y al competir con EscK silvestre interfieren con la secreción de proteínas.

Asimismo, encontramos que la expresión de EscK interfiere con la motilidad de EPEC. Si bien, ya había sido reportado que la expresión del operón *LEE1* (donde *escK* se encuentra codificado) afecta *in vitro* la motilidad de *E. coli*, nosotros detectamos que la sola expresión de EscK es suficiente para inhibir el nado en cajas de agar suave. El sistema de secreción tipo III de virulencia y el flagelo bacteriano son maquinarias con un origen evolutivo en común, por lo que algunos de los componentes estructurales se encuentran compartidos entre ambas maquinarias. Dado que FliG (EscK) interactúa con FliM (EscQ) en el flagelo (Marykwas&Berg 1996; Lam et al. 2013) es posible entonces que EscK interactúe con FliM impidiendo de este modo el ensamblaje correcto del anillo citoplásmico flagelar. Para probar esta hipótesis se podrían hacer ensayos de interacción entre la proteína flagelar FliM y EscK. Sería también sumamente interesante determinar si la inhibición observada obedece a que se interfiere con la secreción de proteínas o si sólo se inhibe la rotación flagelar.

Según la Organización Mundial de la Salud, la diarrea es la segunda causa de muerte infantil más importante, imperando ésta en países subdesarrollados. Si bien es cierto que los patógenos bacterianos son el origen etiológico de la gran mayoría de las enfermedades gastrointestinales, las verdaderas causas subyacentes son el acceso limitado a agua potable y la falta de servicios sanitarios adecuados. El estudio de los mecanismos moleculares de bacterias patógenas y el desarrollo de nuevos fármacos que inhiban la acción de los dispositivos de virulencia es importante para detener la oleada de bacterias multi-resistentes que se prevé tener si la tendencia de adquisición de resistencia a antibióticos continúa, sin embargo, la erradicación de las muertes infantiles asociadas a patógenos entéricos requiere la voluntad política internacional para garantizar las condiciones mínimas necesarias que aseguren el acceso a los servicios sanitarios básicos.

CONCLUSIONES

- EscK es un componente estructural importante del SST3 de EPEC.
- EscK interacciona de manera directa con el principal componente de la plataforma de clasificación, EscQ, y dicha interacción es importante para el funcionamiento del SST3.
- La estabilidad de EscQ no depende de EscK.
- EscK es un componente intracelular que se encuentra localizado tanto en el citoplasma bacteriano como asociado a la membrana interna de la bacteria.
- EscK es un homólogo distante de la proteína flagelar FliG y su sobreproducción interfiere con el nado de EPEC.
- No es necesaria la formación íntegra de la plataforma de clasificación para la secreción de proteínas vía SST3 cuando los sustratos son sobre-producidos.

PERSPECTIVAS

Dilucidar la red completa de interacción proteína-proteína de EscK

Mediante el análisis de pruebas de interacción usando el sistema de doble-híbrido en levadura, sólo se detectó que EscK interacciona con EscQ. Sin embargo, es probable que EscK se encuentre interaccionando con otros componentes del SST3 de EPEC. Considero que candidatos importantes para los cuales se podrían probar la interacción directa con EscK usando otros métodos distintos a los aquí usados son:

- **EscJ y EscL.** En la mayoría de genomas bacterianos con SST3, los homólogos de EscK se encuentran codificados en el genoma entre los genes que codifican para estas 2 proteínas (Figura 16). Se ha descrito que la conservación del contexto genómico es un fuerte indicador de genes funcionalmente relacionados cuyos productos frecuentemente interaccionan físicamente (Rao et al. 2014; Galperin&Koonin 2000). Además, si como proponemos en este trabajo, es cierto que EscK es un homólogo remoto del componente flagelar FliG, la interacción análoga FliG (EscK) con FliF (EscJ) es importante para adosar el anillo citoplásmico al cuerpo basal (Francis et al. 1992; Grünenfelder et al. 2003). Por otro lado es importante notar que el marco de lectura de *escK* se traslapa con el gen de *escL* lo que podría indicar alguna restricción funcional entre las proteínas codificadas por estos genes.
- **EscD.** Aunque en el laboratorio, tanto por doble híbrido en levadura como por ensayos de co-purificación, no se detectó la interacción entre EscK y EscD (Karen Mojica, datos no publicados), considero que aún debería de probarse la interacción EscK-EscD con otras metodologías. La ultraestructura criotomográfica del inyector de *Shigella flexneri* reveló que entre la densidad correspondiente de EscQ y EscD existe una densidad la cual no había podido ser asignada a un componente en específico (Hu et al. 2016). Tomando en cuenta que EscK interacciona con EscQ y que en el flagelo una de las funciones de FliG (EscK) es la de fungir como puente entre la porción citoplásmica del cuerpo basal (formado en el inyector de EPEC por EscD) y FliM (EscQ), es tentador proponer que EscK cumple esta misma función estructural de “enlace o puente” entre EscD y EscQ. Recientemente, la

estructura completa del SST3 de la SPI-1 de *Salmonella* fue resuelta. En las imágenes de criotomografía se aprecia que OrgA (EscK) es la estructura que conecta a SpaO (EscQ) con el N-terminal de PrgH (EscD) que forma el cuerpo basal (Hu et al. 2017), sin embargo, esta interacción no ha sido reportada en ningún SST3. Para probar si existe la interacción EscK-EscD en EPEC sería idóneo usar una estrategia *in vivo* como la co-inmunoprecipitación de proteínas en EPEC ya que se ha visto que el dominio FHA de MxiG (homólogo de EscD) únicamente reconoce sitios fosforilados en proteínas con las cuales interacciona (Barison et al. 2012).

- **Sustratos del SST3.** Se ha reportado que los homólogos de EscK, como parte de la plataforma de clasificación del inyectisoma de EPEC, tienen una relación funcional directa con los distintos de sustratos que son secretados a través de este sistema (Lara-Tejero et al. 2011). Mientras que en otros SST3 se ha visto que homólogos de EscQ y EscL interaccionan de manera directa con sustratos (Lorenz et al. 2012; Lin et al. 2014), hasta el momento no se ha probado si EscK o sus homólogos interaccionan con éstos. Para determinar si existe interacción directa entre EscK y los sustratos secretados a través del sistema una alternativa sería realizar ensayos *in vitro* de co-purificación sobre-expresando sustratos (eje y aguja, translocadores y efectores). Otra opción sería hacer etiquetar a EscK en cromosoma con un epítipo y mediante co-inmunoprecipitación analizar si los sustratos co-eluyen con EscK.

Estado oligomérico de EscK

Un gran vacío en el presente trabajo fue la determinación del estado oligomérico *in vivo* de EscK. Como parte de la plataforma de clasificación se espera que EscK, junto con EscL y EscQ, formen una estructura anular multimérica en la porción citoplásmica de la base del inyectisoma. Aunque se trató de determinar si EscK interacciona consigo misma usando el sistema de doble híbrido en levadura la alta tasa de falsos negativos no nos permitió determinarlo. También se trató de estudiar el estado oligomérico de la proteína purificada *in vitro* usando formaldehído como entrecruzador (datos no mostrados) sin obtener resultados positivos. Una propuesta para estudiar la multimerización de EscK *in vivo* sería etiquetar a la proteína en

cromosoma con un epítipo y mediante geles azules nativos resolver el estado oligomérico de EscK (Dresler, Klimentova,&Stulik 2011). En este trabajo no se etiquetó a la proteína EscK en cromosoma porque 50 pb el extremo 3' del gen *escK* se encuentran sobrelapadas con el extremo 5' del gen *escL* y la metodología que usamos para etiquetar genes en cromosoma implicaría la disrupción del marco de lectura *escL*. Sin embargo, se podría echar mano de otras metodologías que no interrumpen el gen río abajo que se encuentra sobrelapado (Zhao&Méresse 2015).

Otra alternativa sería, usando las fusiones fluorescentes generadas, determinar la estequiometría de EscK en la base de inyectisoma con técnicas de cuantificación por microscopía de fluorescencia de moléculas únicas (*single molecule fluorescence*, en inglés) (Delalez, Berry,&Armitage 2014; Bai et al. 2014; Diepold et al. 2015). Esta técnica nos permitiría incluso estimar cuántos monómeros de cada componente de la plataforma de clasificación se encuentran ensamblados en la base del inyectisoma al comparar la intensidad de fluorescencia del componente de interés con la fluorescencia emitida por algún otro componente cuya estequiometría ya se haya determinado (como la de EscJ o la EscD) (Yip, Brett Finlay, & Strynadka 2004; Hodgkinson et al. 2009).

Ruta de ensamblaje de la plataforma de clasificación de EPEC

La plataforma de clasificación es un complejo de alto peso molecular formado por oligómeros de EscQ, EscK y EscL y cuya función es crítica para el funcionamiento del SST3 de EPEC y, por ende, para la virulencia de esta bacteria. Si bien conocemos la composición y algunas de las funciones de los distintos componentes de esta plataforma aún no hay información acerca del proceso y temporalidad de ensamblaje de este complejo multimérico. Comparando la formación de puntos fluorescentes formados por la proteína recombinante GFP-YscQ en *Yersinia enterocolitica* silvestre y en distintas mutantes nulas, Diepold et al. pudieron determinar la posible ruta de ensamblaje de YscQ (Diepold et al. 2010). Sin embargo no se conoce la temporalidad con que EscK y EscL (o algunos de sus homólogos) son ensamblados. Las fusiones fluorescentes generadas de los componentes de la plataforma de clasificación en este trabajo podrían ayudar a dilucidar la ruta de ensamblaje de toda la plataforma de clasificación de EPEC

siguiendo una estrategia similar de cuantificación de puntos fluorescentes en distintos fondos mutantes de EPEC.

Caracterización estructural del inyectisoma de EPEC en ausencia de EscK

Los análisis funcionales nos permitieron determinar que en ausencia de EscK y de EscL puede haber secreción de sustratos cuando éstos son sobre-expresados. Sin embargo, una gran incógnita de este resultado es si en las mutantes $\Delta escK$ y $\Delta escL$ el eje y la aguja (formados por monómeros de EscI y EscF, respectivamente) se encuentran formados. Nosotros encontramos que en las mutantes $\Delta escI$ y $\Delta escF$ la secreción no podía ser restaurada aunque los sustratos fueran sobreproducidos (dato no mostrado). En fechas recientes otro grupo de investigación reportó que en ausencia de la ATPasa flagelar FliI la secreción de sustratos flagelares y por ende, el ensamblaje extracelular del flagelo puede ser parcialmente compensado si hay un incremento en la fuerza protón motriz (aunque sólo en un subconjunto de la población bacteriana) (Erhardt et al. 2014). Para definir si en las cepas $\Delta escK$ y $\Delta escL$ la aguja se encuentra ensamblada al menos en parte de la población podría abordarse con 2 metodologías:

1. Mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos primarios anti-EscF que reconozcan los niveles ensamblados de la aguja y posteriormente usar un anticuerpo secundario acoplado a alguna molécula fluorescente como Alexa.
2. Mediante entrecruzamiento de los monómeros de EscF ensamblados en el lado extracelular usando un entrecruzador no permeable a la membrana bacteriana como BS³ Thermo Scientific Pierce. Esta estrategia permitiría unir covalentemente monómeros de EscF vecinos para monitorear su estado de ensamblaje (Torruellas et al. 2005). Posteriormente las muestras donde la aguja se hayan entrecruzado se pueden analizar mediante electroforesis en gel e inmunodetección.

Es importante mencionar que en el laboratorio se intentaron generar anticuerpos contra EscF, sin embargo éstos no son capaces de reconocer ni los niveles silvestres de producción ni la secreción al sobrenadante de EscF. Una solución plausible sería etiquetar a EscF en cromosoma con algún epítipo como FLAG o HA. La etiqueta serviría para monitorear el estado de ensamblaje tanto por entrecruzamiento como por inmunofluorescencia.

Estructura de la proteína EscK

Nuestro análisis bioinformático y las similitudes funcionales encontradas sugieren que EscK es un homólogo remoto de la familia YscK/OrgA/MxiK. Sin embargo, son necesarios estudios estructurales que ayuden a develar similitudes entre estas proteínas.

La proteína EscK por sí sola resultó ser sumamente insoluble, por lo que en este trabajo se generó una versión recombinante de EscK fusionada a la etiqueta MBP incrementando significativamente la solubilidad de la proteína. MBP-EscK es enteramente funcional, ya que su expresión restaura la secreción de proteínas de la cepa Δ escK y permite purificar a EscK en condiciones nativas mediante cromatografía de afinidad. Debido a que hay estudios que demuestran factibilidad de cristalizar proteínas etiquetadas con MBP (hasta el año 2015, un total de 102 estructuras de proteínas fusionadas a MBP han sido depositadas en el PDB) (Smyth et al. 2003; Waugh 2016) proponemos que la construcción generada en este trabajo podría usarse para purificar a MBP-EscK e intentar obtener la estructura de la proteína recombinante mediante cristalización. Obtener la estructura terciaria de EscK sería un logro de gran importancia ya que no se cuenta con la estructura resuelta de ningún miembro de la familia SctK.

ANEXOS

Anexo I. Propiedades generales de proteínas relacionadas con el SST3 de EPEC.

Proteína	MW (kDa)	# aa	Péptido señal [±]	HTM [¶]	LipoP*	Punto isoelectrico
rOrf1	31,06	272	N	1	N	6,54
EspG1	43,93	398	N	0	N	5,03
Ler	15,14	129	N	0	N	5,96
EscE	8,45	72	N	0	N	6,52
CesAB	12,3	107	N	0	N	10,1
EscK	23,47	199	N	0	N	7,64
EscL	27,18	231	N	0	N	8,89
EscR	24,39	217	N	4	N	5,21
EscS	9,92	89	N	2	N	5,52
EscT	28,75	258	N	5	N	4,65
EscU	39,18	345	N	4	N	9,77
EtgA	17,11	152	Y	0	N	9,06
GrIR	13,95	123	N	0	N	4,53
GrIA	16,05	137	N	0	N	10,15
CesD	17,51	151	N	0	N	7,45
EscC	56,23	512	Y	0	N	8,24
SepD	17,57	151	N	0	N	7,6
EscJ	20,76	190	Y	0	Y	5,33
EscI	15,26	142	N	0	N	5,09
EspZ	9,39	98	N	2	N	4,74
CesL	13,94	117	N	0	N	4,48

EscN	48,86	446	N	0	N	6,28
EscO	14,66	125	N	0	N	10,14
EscP	16,58	138	N	0	N	9,59
EscV	75,17	675	N	7	N	5,62
EscQ	34,97	305	N	0	N	4,55
EspH	19,02	168	N	0	N	9,92
CesF	14,06	120	N	0	N	4,31
Map	22,58	203	N	0	N	9,29
Tir	56,52	550	N	0	N	4,7
CesT	17,71	156	N	0	N	4,16
Intimin	102,37	939	N	1	N	9,18
EscD	45,32	406	N	1	N	7,49
SepL	39,99	351	N	0	N	4,49
EspA	20,47	192	N	0	N	4,33
EspD	39,51	380	N	2	N	4,86
EspB	33,15	321	N	1	N	5,01
CesD2	15,83	135	N	0	N	4,98
EscF	8,13	73	N	0	N	4,07
EscG	10,31	92	N	0	N	6,24
EspF	20,98	206	N	0	N	11,25
EspG2	42,74	390	N	0	N	6,05
EspJ	24,59	217	N	0	N	10,28
EspL	62,19	549	N	0	N	6,78
NleA_Espl	47,48	440	N	0	N	5,22
NleB1	38,06	326	N	0	N	6,37
NleB2	37,63	329	N	0	N	5,6

NleC	37,23	330	N	0	N	4,42
NleD	25,96	232	N	0	N	6,18
NleE	19,72	168	N	0	N	5,68
NleF	21,39	189	N	0	N	4,7
NleI_NleG	20,33	192	N	0	N	5,22
NleH1	32,49	293	N	0	N	5,19
NleH2	33,69	303	N	0	N	5,63

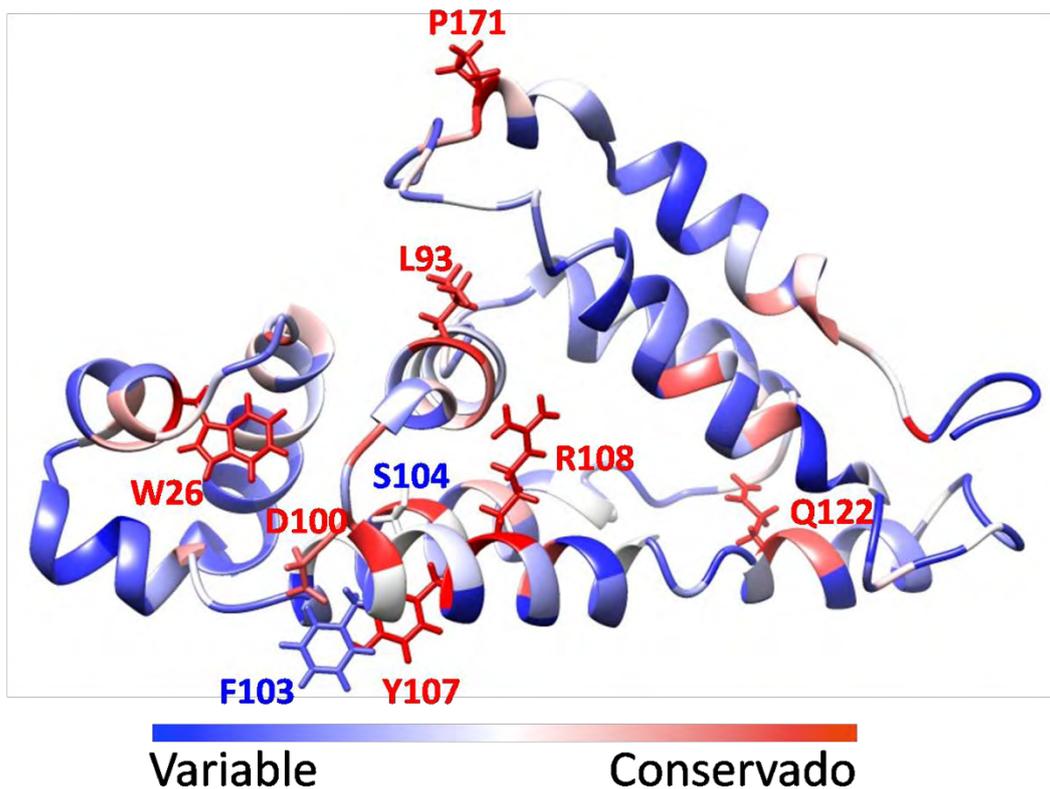
Y: sí posee la característica en cuestión; N: no posee la característica descrita.

¶ La predicción de cruces transmembranales se llevo a cabo usando en el servidor (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)

± La predicción de la presencia de péptido señal se llevo a cabo usando en el servidor (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) D-cutoff=0.4

* La predicción de lipoproteínas se llevó a cabo usando en el servidor LipoP 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>)

ANEXO II. Mapeo de los residuos mutados por alanina en la estructura predicha de EscK.



La estructura terciaria de la proteína EscK de EPEC se modeló usando el servidor I-TASSER. Los residuos de la proteína se dibujaron de acuerdo a su grado de conservación estimado usando el servidor ConSurf. Se indican los residuos seleccionados que se cambiaron por alanina en este trabajo. La molécula se visualizó usando el programa Chimera UCSF.

REFERENCIAS

- Abby, Sophie S., and Eduardo P. C. Rocha. 2012. "The Non-Flagellar Type III Secretion System Evolved from the Bacterial Flagellum and Diversified into Host-Cell Adapted Systems." *PLoS Genetics* 8 (9): e1002983.
- Abe, Akio, Kanna Nagamatsu, and Mineo Watanabe. 2008. "The Bordetella Type III Secretion System: Its Application to Vaccine Development." *Microbiology and Immunology* 52 (2): 128–33.
- Abrusci, Patrizia, Marta Vergara-Irigaray, Steven Johnson, Morgan D. Beeby, David R. Hendrixson, Pietro Roversi, Miriam E. Friede, et al. 2013. "Architecture of the Major Component of the Type III Secretion System Export Apparatus." *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (1): 99–104.
- Acuna-Soto, Rodolfo, David W. Stahle, Malcolm K. Cleaveland, and Matthew D. Therrell. 2002. "Megadrought and Megadeath in 16th Century Mexico." *Emerging Infectious Diseases* 8 (4): 360–62.
- Akeda, Yukihiro, and Jorge E. Galán. 2005. "Chaperone Release and Unfolding of Substrates in Type III Secretion." *Nature* 437 (7060): 911–15.
- Andrade, Angel, Juan Pablo Pardo, Norma Espinosa, Gerardo Pérez-Hernández, and Bertha González-Pedrajo. 2007. "Enzymatic Characterization of the Enteropathogenic Escherichia Coli Type III Secretion ATPase EscN." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 468 (1): 121–27.
- Auvray, Frédéric, Amanda J. Ozin, Laurent Claret, and Colin Hughes. 2002. "Intrinsic Membrane Targeting of the Flagellar Export ATPase FliI: Interaction with Acidic Phospholipids and FliH." *Journal of Molecular Biology* 318 (4): 941–50.
- Bai, Fan, Yusuke V. Morimoto, Shinsuke D. J. Yoshimura, Noritaka Hara, Nobunori Kami-Ike, Keiichi Namba, and Tohru Minamino. 2014. "Assembly Dynamics and the Roles of FliI ATPase of the Bacterial Flagellar Export Apparatus." *Scientific Reports* 4 (October): 6528.
- Barison, N., J. Lambers, R. Hurwitz, and M. Kolbe. 2012. "Interaction of MxiG with the Cytosolic Complex of the Type III Secretion System Controls Shigella Virulence." *The FASEB Journal* 26 (4): 1717–26.
- Bergeron, Julien R. 2016. "Structural Modeling of the Flagellum MS Ring Protein FliF Reveals Similarities to the Type III Secretion System and Sporulation Complex." *PeerJ* 4 (February): e1718.
- Betts-Hampikian, Helen Jennifer, and Kenneth A. Fields. 2010. "The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut." *Frontiers in Microbiology* 1. doi:10.3389/fmicb.2010.00114.
- Betts, Helen J., Roy R. Chaudhuri, and Mark J. Pallen. 2004. "An Analysis of Type-III Secretion Gene Clusters in Chromobacterium Violaceum." *Trends in Microbiology* 12 (11): 476–82.
- Betts, H. J., L. E. Twiggs, M. S. Sal, P. B. Wyrick, and K. A. Fields. 2008. "Bioinformatic and Biochemical Evidence for the Identification of the Type III Secretion System Needle Protein of Chlamydia Trachomatis." *Journal of Bacteriology* 190 (5): 1680–90.
- Bieber, D., S. W. Ramer, C. Y. Wu, W. J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez, and G. K. Schoolnik. 1998. "Type IV Pili, Transient Bacterial Aggregates, and Virulence of Enteropathogenic Escherichia Coli." *Science* 280 (5372): 2114–18.

- Biemans-Oldehinkel, Esther, Neta Sal-Man, Wanyin Deng, Leonard J. Foster, and B. Brett Finlay. 2011. "Quantitative Proteomic Analysis Reveals Formation of an EscL-EscQ-EscN Type III Complex in Enteropathogenic Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 193 (19): 5514–19.
- Blank, T. E., and M. S. Donnenberg. 2001. "Novel Topology of BfpE, a Cytoplasmic Membrane Protein Required for Type IV Fimbrial Biogenesis in Enteropathogenic Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 183 (15): 4435–50.
- Blocker, A., P. Gounon, E. Larquet, K. Niebuhr, V. Cabiaux, C. Parsot, and P. Sansonetti. 1999. "The Tripartite Type III Secretion System of Shigella Flexneri Inserts IpaB and IpaC into Host Membranes." *The Journal of Cell Biology* 147 (3): 683–93.
- Boratyn, Grzegorz M., Alejandro A. Schäffer, Richa Agarwala, Stephen F. Altschul, David J. Lipman, and Thomas L. Madden. 2012. "Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST." *Biology Direct* 7 (April): 12.
- Bray, John, and Bray John. 1945. "Isolation of Antigenically Homogeneous Strains of Bact. Coli Neapolitanum from Summer Diarrhoea of Infants." *The Journal of Pathology and Bacteriology* 57 (2): 239–47.
- Burkinshaw, Brianne J., and Natalie C. J. Strynadka. 2014. "Assembly and Structure of the T3SS." *Biochimica et Biophysica Acta* 1843 (8): 1649–63.
- Bustamante, Víctor H., Francisco J. Santana, Calva Edmundo, and Jose Luis Puente. 2001. "Transcriptional Regulation of Type III Secretion Genes in Enteropathogenic Escherichia Coli: Ler Antagonizes H-NS-Dependent Repression." *Molecular Microbiology* 39 (3): 664–78.
- Bustamante, Víctor H., Miryam I. Villalba, Víctor A. García-Angulo, Alejandra Vázquez, Luary C. Martínez, Rafael Jiménez, and José L. Puente. 2011. "PerC and GrlA Independently Regulate Ler Expression in Enteropathogenic Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 82 (2): 398–415.
- Buttner, D., and S. Y. He. 2009. "Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria." *Plant Physiology* 150 (4): 1656–64.
- Bzymek, Krzysztof P., Brent Y. Hamaoka, and Partho Ghosh. 2012. "Two Translation Products of Yersinia yscQ Assemble to Form a Complex Essential to Type III Secretion." *Biochemistry* 51 (8): 1669–77.
- Campellone, Kenneth G. 2010. "Cytoskeleton-Modulating Effectors of Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic Escherichia Coli: Tir, EspFU and Actin Pedestal Assembly." *The FEBS Journal* 277 (11): 2390–2402.
- Carleton, Heather A., María Lara-Tejero, Xiaoyun Liu, and Jorge E. Galán. 2013. "Engineering the Type III Secretion System in Non-Replicating Bacterial Minicells for Antigen Delivery." *Nature Communications* 4: 1590.
- Castillo, Amanda, Luis E. Eguiarte, and Valeria Souza. 2005. "A Genomic Population Genetics Analysis of the Pathogenic Enterocyte Effacement Island in Escherichia Coli: The Search for the Unit of Selection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (5): 1542–47.
- Chandry, P. Scott, Simon Gladman, Sean C. Moore, Torsten Seemann, Keith A. Crandall, and Narelle Fegan. 2012. "A Genomic Island in Salmonella Enterica Ssp. Salamae Provides New Insights on the Genealogy of the Locus of Enterocyte Effacement." *PLoS One* 7 (7): e41615.
- Clarke, S. C., R. D. Haigh, P. P. E. Freestone, and P. H. Williams. 2003. "Virulence of Enteropathogenic Escherichia Coli, a Global Pathogen." *Clinical Microbiology Reviews* 16 (3): 365–78.

- Coburn, Bryan, Guntram A. Grassl, and B. B. Finlay. 2007. "Salmonella, the Host and Disease: A Brief Review." *Immunology and Cell Biology* 85 (2): 112–18.
- Coburn, B., I. Sekirov, and B. B. Finlay. 2007. "Type III Secretion Systems and Disease." *Clinical Microbiology Reviews* 20 (4): 535–49.
- Coll, Núria S., and Marc Valls. 2013. "Current Knowledge on the *Ralstonia Solanacearum* Type III Secretion System." *Microbial Biotechnology* 6 (6): 614–20.
- Cornelis, Guy R. 2006. "The Type III Secretion Injectisome." *Nature Reviews. Microbiology* 4 (11): 811–25.
- Creasey, Elizabeth A., Devorah Friedberg, Robert K. Shaw, Tatiana Umanski, Stuart Knutton, Ilan Rosenshine, and Gad Frankel. 2003. "CesAB Is an Enteropathogenic *Escherichia Coli* Chaperone for the Type-III Translocator Proteins EspA and EspB." *Microbiology* 149 (Pt 12): 3639–47.
- Crepin, Valérie F., Sunil Prasanna, Rob K. Shaw, Rebecca K. Wilson, Elizabeth Creasey, Cecilia M. Abe, Stuart Knutton, Gad Frankel, and Steve Matthews. 2005. "Structural and Functional Studies of the Enteropathogenic *Escherichia Coli* Type III Needle Complex Protein EscJ." *Molecular Microbiology* 55 (6): 1658–70.
- Crepin, V. F., R. Shaw, C. M. Abe, S. Knutton, and G. Frankel. 2005. "Polarity of Enteropathogenic *Escherichia Coli* EspA Filament Assembly and Protein Secretion." *Journal of Bacteriology* 187 (8): 2881–89.
- Croxen, Matthew A., and B. Brett Finlay. 2009. "Molecular Mechanisms of *Escherichia Coli* Pathogenicity." *Nature Reviews. Microbiology*. doi:10.1038/nrmicro2265.
- Cunningham, B. C., and J. A. Wells. 1989. "High-Resolution Epitope Mapping of hGH-Receptor Interactions by Alanine-Scanning Mutagenesis." *Science* 244 (4908): 1081–85.
- Daniell, Sarah J., Kocsis Eva, Morris Edward, Knutton Stuart, Frank P. Booy, and Frankel Gad. 2003. "3D Structure of EspA Filaments from Enteropathogenic *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 49 (2): 301–8.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. "One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia Coli* K-12 Using PCR Products." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12): 6640–45.
- Davis, Alison J., Dennise A. De Jesús Díaz, and Joan Meccas. 2010. "A Dominant-Negative Needle Mutant Blocks Type III Secretion of Early but Not Late Substrates in *Yersinia*." *Molecular Microbiology* 76 (1): 236–59.
- Dean, Paul, and Brendan Kenny. 2009. "The Effector Repertoire of Enteropathogenic *E. Coli*: Ganging up on the Host Cell." *Current Opinion in Microbiology* 12 (1): 101–9.
- Delalez, Nicolas J., Richard M. Berry, and Judith P. Armitage. 2014. "Stoichiometry and Turnover of the Bacterial Flagellar Switch Protein FliN." *mBio* 5 (4): e01216–14.
- DeLong, E. F., and N. R. Pace. 2001. "Environmental Diversity of Bacteria and Archaea." *Systematic Biology* 50 (4): 470–78.
- Deng, Wanyin, José L. Puente, Samantha Gruenheid, Yuling Li, Bruce A. Vallance, Alejandra Vázquez, Jeannette Barba, et al. 2004. "Dissecting Virulence: Systematic and Functional Analyses of a Pathogenicity Island." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (10): 3597–3602.

- Deng, Wanyin, Hong B. Yu, Carmen L. de Hoog, Nikolay Stoykov, Yuling Li, Leonard J. Foster, and B. Brett Finlay. 2012. "Quantitative Proteomic Analysis of Type III Secretome of Enteropathogenic Escherichia Coli Reveals an Expanded Effector Repertoire for Attaching/effacing Bacterial Pathogens." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 11 (9): 692–709.
- Deng, Wanyin, Hong B. Yu, Yuling Li, and B. Brett Finlay. 2015. "SepD/SepL-Dependent Secretion Signals of the Type III Secretion System Translocator Proteins in Enteropathogenic Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 197 (7): 1263–75.
- Diepold, Andreas, Marliese Amstutz, Sören Abel, Isabel Sorg, Urs Jenal, and Guy R. Cornelis. 2010. "Deciphering the Assembly of the Yersinia Type III Secretion Injectisome." *The EMBO Journal* 29 (11): 1928–40.
- Diepold, Andreas, Mikhail Kudryashev, Nicolas J. Delalez, Richard M. Berry, and Judith P. Armitage. 2015. "Composition, Formation, and Regulation of the Cytosolic c-Ring, a Dynamic Component of the Type III Secretion Injectisome." *PLoS Biology* 13 (1): e1002039.
- Dietsche, Tobias, Mehari Tesfazgi Mebrhatu, Matthias J. Brunner, Patrizia Abrusci, Jun Yan, Mirita Franz-Wachtel, Charlotta Schärfe, et al. 2016. "Structural and Functional Characterization of the Bacterial Type III Secretion Export Apparatus." *PLoS Pathogens* 12 (12): e1006071.
- Donnenberg, M. S., C. O. Tacket, S. P. James, G. Losonsky, J. P. Nataro, S. S. Wasserman, J. B. Kaper, and M. M. Levine. 1993. "Role of the eaeA Gene in Experimental Enteropathogenic Escherichia Coli Infection." *The Journal of Clinical Investigation* 92 (3): 1412–17.
- Dresler, Jiri, Jana Klimentova, and Jiri Stulik. 2011. "Bacterial Protein Complexes Investigation Using Blue Native PAGE." *Microbiological Research* 166 (1): 47–62.
- Edgar, Robert C. 2004. "MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput." *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792–97.
- Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper. 2000. "The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator Controls Expression of Both LEE- and Non-LEE-Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia Coli." *Infection and Immunity* 68 (11): 6115–26.
- Elliott, S. J., J. Yu, and J. B. Kaper. 1999. "The Cloned Locus of Enterocyte Effacement from Enterohemorrhagic Escherichia Coli O157:H7 Is Unable to Confer the Attaching and Effacing Phenotype upon E. Coli K-12." *Infection and Immunity* 67 (8): 4260–63.
- Eng, Shu-Kee, Priyia Pusparajah, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Hooi-Leng Ser, Kok-Gan Chan, and Learn-Han Lee. 2015. "Salmonella : A Review on Pathogenesis, Epidemiology and Antibiotic Resistance." *Frontiers in Life Science* 8 (3): 284–93.
- Erhardt, Marc, and Kelly T. Hughes. 2010. "C-Ring Requirement in Flagellar Type III Secretion Is Bypassed by FlhDC Upregulation." *Molecular Microbiology* 75 (2): 376–93.
- Erhardt, Marc, Max E. Mertens, Florian D. Fabiani, and Kelly T. Hughes. 2014. "ATPase-Independent Type-III Protein Secretion in Salmonella Enterica." *PLoS Genetics* 10 (11): e1004800.
- Evans, Lewis D. B., Graham P. Stafford, Sangita Ahmed, Gillian M. Fraser, and Colin Hughes. 2006. "An Escort Mechanism for Cycling of Export Chaperones during Flagellum Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (46): 17474–79.

- Fowler, Janet M., Christine R. Wulff, Susan C. Straley, and Robert R. Brubaker. 2009. "Growth of Calcium-Blind Mutants of *Yersinia Pestis* at 37 Degrees C in Permissive Ca²⁺-Deficient Environments." *Microbiology* 155 (Pt 8): 2509–21.
- Francis, N. R., V. M. Irikura, S. Yamaguchi, D. J. DeRosier, and R. M. Macnab. 1992. "Localization of the *Salmonella Typhimurium* Flagellar Switch Protein FliG to the Cytoplasmic M-Ring Face of the Basal Body." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (14): 6304–8.
- Galán, Jorge E., Maria Lara-Tejero, Thomas C. Marlovits, and Samuel Wagner. 2014. "Bacterial Type III Secretion Systems: Specialized Nanomachines for Protein Delivery into Target Cells." *Annual Review of Microbiology* 68 (June): 415–38.
- Galperin, Michael Y., and Eugene V. Koonin. 2000. "Who's Your Neighbor? New Computational Approaches for Functional Genomics." *Nature Biotechnology* 18 (6): 609–13.
- Gamez, A., R. Mukerjea, M. Alayyoubi, M. Ghassemian, and P. Ghosh. 2012. "Structure and Interactions of the Cytoplasmic Domain of the *Yersinia* Type III Secretion Protein YscD." *Journal of Bacteriology* 194 (21): 5949–58.
- Gauthier, Annick, Jose Luis Puente, and B. Brett Finlay. 2003. "Secretin of the Enteropathogenic *Escherichia Coli* Type III Secretion System Requires Components of the Type III Apparatus for Assembly and Localization." *Infection and Immunity* 71 (6): 3310–19.
- Gaytán, Meztlli O., Verónica I. Martínez-Santos, Eduardo Soto, and Bertha González-Pedrajo. 2016. "Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6. doi:10.3389/fcimb.2016.00129.
- Girón, J. A., A. S. Ho, and G. K. Schoolnik. 1991. "An Inducible Bundle-Forming Pilus of Enteropathogenic *Escherichia Coli*." *Science* 254 (5032): 710–13.
- Gonzalez-Pedrajo, Bertha, Tohru Minamino, May Kihara, and Keiichi Namba. 2006. "Interactions between C Ring Proteins and Export Apparatus Components: A Possible Mechanism for Facilitating Type III Protein Export." *Molecular Microbiology* 60 (4): 984–98.
- Grünenfelder, Björn, Stefanie Gehrig, and Urs Jenal. 2003. "Role of the Cytoplasmic C Terminus of the FliF Motor Protein in Flagellar Assembly and Rotation." *Journal of Bacteriology* 185 (5): 1624–33.
- Gupta, Radhey S. 2011. "Origin of Diderm (Gram-Negative) Bacteria: Antibiotic Selection Pressure rather than Endosymbiosis Likely Led to the Evolution of Bacterial Cells with Two Membranes." *Antonie van Leeuwenhoek* 100 (2): 171–82.
- Hacker, Jörg, Hacker Jörg, and James B. Kaper. 2000. "Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes." *Annual Review of Microbiology* 54 (1): 641–79.
- Hauser, Alan R. 2009. "The Type III Secretion System of *Pseudomonas Aeruginosa*: Infection by Injection." *Nature Reviews. Microbiology* 7 (9): 654–65.
- Hegazy, Wael Abdel Halim, and Michael Hensel. 2012. "*Salmonella Enterica* as a Vaccine Carrier." *Future Microbiology* 7 (1): 111–27.
- Herskowitz, Ira. 1987. "Functional Inactivation of Genes by Dominant Negative Mutations." *Nature* 329 (6136): 219–22.
- Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma, and H. P. Schweizer. 1998. "A Broad-Host-Range Flp-FRT Recombination System for Site-Specific Excision of Chromosomally-Located DNA Sequences: Application for Isolation of Unmarked *Pseudomonas Aeruginosa* Mutants." *Gene* 212 (1): 77–86.

- Hodgkinson, Julie L., Ashley Horsley, David Stabat, Martha Simon, Steven Johnson, Paula C. A. da Fonseca, Edward P. Morris, Joseph S. Wall, Susan M. Lea, and Ariel J. Blocker. 2009. "Three-Dimensional Reconstruction of the Shigella T3SS Transmembrane Regions Reveals 12-Fold Symmetry and Novel Features throughout." *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (5): 477–85.
- Hu, Bo, Maria Lara-Tejero, Qingke Kong, Jorge E. Galán, and Jun Liu. 2017. "In Situ Molecular Architecture of the Salmonella Type III Secretion Machine." *Cell* 168 (6): 1065–74.e10.
- Hu, Bo, Dustin R. Morado, William Margolin, John R. Rohde, Olivia Arizmendi, Wendy L. Picking, William D. Picking, and Jun Liu. 2015. "Visualization of the Type III Secretion Sorting Platform of Shigella Flexneri." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (4): 1047–52.
- Hueck, C. J. 1998. "Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 62 (2): 379–433.
- Ibuki, Tatsuya, Ibuki Tatsuya, Imada Katsumi, Minamino Tohru, Kato Takayuki, Miyata Tomoko, and Namba Keiichi. 2011. "Common Architecture of the Flagellar Type III Protein Export Apparatus and F- and V-Type ATPases." *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (3): 277–82.
- Ide, Tina, Ide Tina, Laarmann Sven, Greune Lilo, Schillers Hermann, Oberleithner Hans, and M. Alexander Schmidt. 2001. "Characterization of Translocation Pores Inserted into Plasma Membranes by Type III-Secreted Esp Proteins of Enteropathogenic Escherichia Coli." *Cellular Microbiology* 3 (10): 669–79.
- Ide, T., S. Laarmann, L. Greune, H. Schillers, H. Oberleithner, and M. A. Schmidt. 2001. "Characterization of Translocation Pores Inserted into Plasma Membranes by Type III-Secreted Esp Proteins of Enteropathogenic Escherichia Coli." *Cellular Microbiology* 3 (10): 669–79.
- Iguchi, Atsushi, Nicholas R. Thomson, Yoshitoshi Ogura, David Saunders, Tadasuke Ooka, Ian R. Henderson, David Harris, et al. 2009. "Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of Enteropathogenic Escherichia Coli O127:H6 Strain E2348/69." *Journal of Bacteriology* 191 (1): 347–54.
- Ittig, Simon J., Christoph Schmutz, Christoph A. Kasper, Marlise Amstutz, Alexander Schmidt, Loïc Sauter, M. Alessandra Vigano, et al. 2015. "A Bacterial Type III Secretion-Based Protein Delivery Tool for Broad Applications in Cell Biology." *The Journal of Cell Biology* 211 (4): 913–31.
- Jackson, M. W., and G. V. Plano. 2000. "Interactions between Type III Secretion Apparatus Components from Yersinia Pestis Detected Using the Yeast Two-Hybrid System." *FEMS Microbiology Letters* 186 (1): 85–90.
- Johnson, Steven, and Ariel Blocker. 2008. "Characterization of Soluble Complexes of the Shigella Flexneri Type III Secretion System ATPase." *FEMS Microbiology Letters* 286 (2): 274–78.
- Johnson, Zackary I., and Sallie W. Chisholm. 2004. "Properties of Overlapping Genes Are Conserved across Microbial Genomes." *Genome Research* 14 (11): 2268–72.
- Jouihri, Nouredine, Marie-Paule Sory, Anne-Laure Page, Pierre Gounon, Claude Parsot, and Abdelmounaïm Allaoui. 2004. "MxiK and MxiN Interact with the Spa47 ATPase and Are Required for Transit of the Needle Components MxiH and MxiI, but Not of Ipa Proteins, through the Type III Secretion Apparatus of Shigella Flexneri." *Molecular Microbiology* 49 (3): 755–67.

- Journet, Laure, Céline Agrain, Petr Broz, and Guy R. Cornelis. 2003. "The Needle Length of Bacterial Injectisomes Is Determined by a Molecular Ruler." *Science* 302 (5651): 1757–60.
- Kamada, Nobuhiko, Yun-Gi Kim, Ho Pan Sham, Bruce A. Vallance, José L. Puente, Eric C. Martens, and Gabriel Núñez. 2012. "Regulated Virulence Controls the Ability of a Pathogen to Compete with the Gut Microbiota." *Science* 336 (6086): 1325–29.
- Kambara, Kumiko, Silvia Ardisson, Hajime Kobayashi, Maged M. Saad, Olivier Schumpp, William J. Broughton, and William J. Deakin. 2009. "Rhizobia Utilize Pathogen-like Effector Proteins during Symbiosis." *Molecular Microbiology* 71 (1): 92–106.
- Kaper, James B., James P. Nataro, and Harry L. Mobley. 2004. "Pathogenic Escherichia Coli." *Nature Reviews. Microbiology* 2 (2): 123–40.
- Karnik, Abhijit, Rucha Karnik, and Christopher Grefen. 2013. "SDM-Assist Software to Design Site-Directed Mutagenesis Primers Introducing 'Silent' Restriction Sites." *BMC Bioinformatics* 14 (March): 105.
- Kenny, B. 1999. "Phosphorylation of Tyrosine 474 of the Enteropathogenic Escherichia Coli (EPEC) Tir Receptor Molecule Is Essential for Actin Nucleating Activity and Is Preceded by Additional Host Modifications." *Molecular Microbiology* 31 (4): 1229–41.
- Khursigara, C., M. Abul-Milh, B. Lau, J. A. Giron, C. A. Lingwood, and D. E. B. Foster. 2001. "Enteropathogenic Escherichiacoli Virulence Factor Bundle-Forming Pilus Has a Binding Specificity for Phosphatidylethanolamine." *Infection and Immunity* 69 (11): 6573–79.
- Klein, J. R., T. F. Fahlen, and B. D. Jones. 2000. "Transcriptional Organization and Function of Invasion Genes within Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Pathogenicity Island 1, Including the prgH, prgI, prgJ, prgK, orgA, orgB, and orgC Genes." *Infection and Immunity* 68 (6): 3368–76.
- Konishi, Manabu, Masaomi Kanbe, Jonathan L. McMurry, and Shin-Ichi Aizawa. 2009. "Flagellar Formation in C-Ring-Defective Mutants by Overproduction of FliI, the ATPase Specific for Flagellar Type III Secretion." *Journal of Bacteriology* 191 (19): 6186–91.
- Korotkov, Konstantin V., Tamir Gonen, and Wim G. J. Hol. 2011. "Secretins: Dynamic Channels for Protein Transport across Membranes." *Trends in Biochemical Sciences* 36 (8): 433–43.
- Labbé, Ronald G., and Santos García. 2001. *Guide to Foodborne Pathogens*. John Wiley & Sons.
- Lam, Kwok-Ho, Wendy Wai Ling Lam, Jase Yan-Kit Wong, Ling-Chim Chan, Masayo Kotaka, Thomas Kin-Wah Ling, Dong-Yan Jin, Karen M. Ottemann, and Shannon Wing-Ngor Au. 2013. "Structural Basis of FliG-FliM Interaction in Helicobacter Pylori." *Molecular Microbiology* 88 (4): 798–812.
- Lanata, Claudio F., Christa L. Fischer-Walker, Ana C. Olascoaga, Carla X. Torres, Martin J. Aryee, Robert E. Black, and Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. 2013. "Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review." *PLoS One* 8 (9): e72788.
- Lapointe, Tamia K., Pamela M. O'Connor, and Andre G. Buret. 2009. "The Role of Epithelial Malfunction in the Pathogenesis of Enteropathogenic E. Coli-Induced Diarrhea." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 89 (9): 964–70.

- Lara-Tejero, María, Junya Kato, Samuel Wagner, Xiaoyun Liu, and Jorge E. Galán. 2011. "A Sorting Platform Determines the Order of Protein Secretion in Bacterial Type III Systems." *Science* 331 (6021): 1188–91.
- Laskowska, E. 2004. "Aggregation of Heat-Shock-Denatured, Endogenous Proteins and Distribution of the IbpA/B and Fda Marker-Proteins in Escherichia Coli WT and grpE280 Cells." *Microbiology* 150 (1): 247–59.
- Lee, Pei-Chung, Stephanie Elizabeth Zmina, Charles Morgan Stopford, Jonida Toska, and Arne Rietsch. 2014. "Control of Type III Secretion Activity and Substrate Specificity by the Cytoplasmic Regulator PcrG." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (19): E2027–36.
- Levine, M. 1978. "ESCHERICHIA COLI STRAINS THAT CAUSE DIARRHOEA; A BUT DO NOT PRODUCE HEAT-LABILE OR HEAT-STABLE ENTEROTOXINS AND ARE NON-INVASIVE." *The Lancet* 311 (8074): 1119–22.
- Leyns, Frederik, Marcel De Cleene, Jean-Guy Swings, and Jozef De Ley. 1984. "The Host Range of the genus Xanthomonas." *The Botanical Review; Interpreting Botanical Progress* 50 (3): 308–56.
- Lin, Ching-Nan, Wei-Sheng W. Sun, Hui-Yin Lu, Swee-Chuan Ng, Ying-Shu Liao, and Wan-Jr Syu. 2014. "Protein Interactions and Regulation of EscA in Enterohemorrhagic E. Coli." *PloS One* 9 (1): e85354.
- Lloyd, S. A., and D. F. Blair. 1997. "Charged Residues of the Rotor Protein FliG Essential for Torque Generation in the Flagellar Motor of Escherichia Coli." *Journal of Molecular Biology* 266 (4): 733–44.
- Lorenz, Christian, Jens Hausner, and Daniela Büttner. 2012. "HrcQ Provides a Docking Site for Early and Late Type III Secretion Substrates from Xanthomonas." *PloS One* 7 (11): e51063.
- Luo, Y., E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, A. L. Creagh, D. G. Knoechel, C. A. Haynes, B. B. Finlay, and N. C. Strynadka. 2000. "Crystal Structure of Enteropathogenic Escherichia Coli Intimin-Receptor Complex." *Nature* 405 (6790): 1073–77.
- MacDonald, Paul N. 2001. *Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols*. Springer Science & Business Media.
- Makino, Fumiaki, Dakang Shen, Naoko Kajimura, Akihiro Kawamoto, Panayiota Pissaridou, Henry Oswin, Maria Pain, Isabel Murillo, Keiichi Namba, and Ariel J. Blocker. 2016. "The Architecture of the Cytoplasmic Region of Type III Secretion Systems." *Scientific Reports* 6 (September): 33341.
- Marykwas, D. L., and H. C. Berg. 1996. "A Mutational Analysis of the Interaction between FliG and FliM, Two Components of the Flagellar Motor of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 178 (5): 1289–94.
- McDaniel, Timothy K., and James B. Kaper. 1997. "A Cloned Pathogenicity Island from Enteropathogenic Escherichia Coli Confers the Attaching and Effacing Phenotype on E. Coli K-12." *Molecular Microbiology* 23 (2): 399–407.
- McDowell, Melanie A., Julien Marcoux, Gareth McVicker, Steven Johnson, Yu Hang Fong, Rebecca Stevens, Lesley A. H. Bowman, et al. 2016. "Characterisation of Shigella Spa33 and Thermotoga FliM/N Reveals a New Model for C-Ring Assembly in T3SS." *Molecular Microbiology* 99 (4): 749–66.
- Medhekar, Bob, Ruchi Shrivastava, Seema Mattoo, Mari Gingery, and Jeff F. Miller. 2009. "Bordetella Bsp22 Forms a Filamentous Type III Secretion System Tip Complex and Is Immunoprotective in Vitro and in Vivo." *Molecular Microbiology* 71 (2): 492–504.
- Miki, Tsuyoshi, Mirei Iguchi, Kinari Akiba, Masato Hosono, Tomoyoshi Sobue,

- Hirofumi Danbara, and Nobuhiko Okada. 2010. "Chromobacterium Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System Is a Major Virulence Determinant for Chromobacterium Violaceum-Induced Cell Death in Hepatocytes." *Molecular Microbiology*, no – no.
- Minamino, Tohru, Yusuke V. Morimoto, Noritaka Hara, and Keiichi Namba. 2011. "An Energy Transduction Mechanism Used in Bacterial Flagellar Type III Protein Export." *Nature Communications* 2 (September): 475.
- Minamino, Tohru, and Keiichi Namba. 2008. "Distinct Roles of the Flil ATPase and Proton Motive Force in Bacterial Flagellar Protein Export." *Nature* 451 (7177): 485–88.
- Monjaras Feria, J., E. Garcia-Gomez, N. Espinosa, T. Minamino, K. Namba, and B. Gonzalez-Pedrajo. 2012. "Role of EscP (Orf16) in Injectisome Biogenesis and Regulation of Type III Protein Secretion in Enteropathogenic Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 194 (22): 6029–45.
- Morello, J. E., and A. Collmer. 2009. "Pseudomonas Syringae HrpP Is a Type III Secretion Substrate Specificity Switch Domain Protein That Is Translocated into Plant Cells but Functions Atypically for a Substrate-Switching Protein." *Journal of Bacteriology* 191 (9): 3120–31.
- Morita-Ishihara, Tomoko, Michinaga Ogawa, Hiroshi Sagara, Mitutaka Yoshida, Eisaku Katayama, and Chihiro Sasakawa. 2006. "Shigella Spa33 Is an Essential C-Ring Component of Type III Secretion Machinery." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (1): 599–607.
- Mundy, Rosanna, Derek Pickard, Rebecca K. Wilson, Cameron P. Simmons, Gordon Dougan, and Gad Frankel. 2003. "Identification of a Novel Type IV Pilus Gene Cluster Required for Gastrointestinal Colonization of Citrobacter Rodentium." *Molecular Microbiology* 48 (3): 795–809.
- Munera, Diana, Valerie F. Crepin, Olivier Marches, and Gad Frankel. 2010. "N-Terminal Type III Secretion Signal of Enteropathogenic Escherichia Coli Translocator Proteins." *Journal of Bacteriology* 192 (13): 3534–39.
- Nakamura, Yoji, Tomokazu Takano, Motoshige Yasuike, Takamitsu Sakai, Tomomasa Matsuyama, and Motohiko Sano. 2013. "Comparative Genomics Reveals That a Fish Pathogenic Bacterium Edwardsiella Tarda Has Acquired the Locus of Enterocyte Effacement (LEE) through Horizontal Gene Transfer." *BMC Genomics* 14 (September): 642.
- Navarro-Garcia, Fernando, Antonio Serapio-Palacios, Jorge E. Vidal, M. Isabel Salazar, and Gabriela Tapia-Pastrana. 2014. "EspC Promotes Epithelial Cell Detachment by Enteropathogenic Escherichia Coli via Sequential Cleavages of a Cytoskeletal Protein and Then Focal Adhesion Proteins." *Infection and Immunity* 82 (6): 2255–65.
- Nicholson, T. L., S. L. Brockmeier, C. L. Loving, K. B. Register, M. E. Kehrli, and S. M. Shore. 2013. "The Bordetella Bronchiseptica Type III Secretion System Is Required for Persistence and Disease Severity but Not Transmission in Swine." *Infection and Immunity* 82 (3): 1092–1103.
- Nikolaus, T., J. Deiwick, C. Rappl, J. A. Freeman, W. Schröder, S. I. Miller, and M. Hensel. 2001. "SseBCD Proteins Are Secreted by the Type III Secretion System of Salmonella Pathogenicity Island 2 and Function as a Translocon." *Journal of Bacteriology* 183 (20): 6036–45.
- Nisa, Shahista, Tracy H. Hazen, Lillian Assatourian, Jean-Philippe Nougayrède, David A. Rasko, and Michael S. Donnenberg. 2013. "In Vitro Evolution of an Archetypal Enteropathogenic Escherichia Coli Strain." *Journal of Bacteriology*

- 195 (19): 4476–83.
- Notti, Ryan Q., Shibani Bhattacharya, Mirjana Lilic, and C. Erec Stebbins. 2015. “A Common Assembly Module in Injectisome and Flagellar Type III Secretion Sorting Platforms.” *Nature Communications* 6 (May): 7125.
- Okabe, Mayuko, Tohru Minamino, Katsumi Imada, Keiichi Namba, and May Kihara. 2009. “Role of the N-Terminal Domain of FliI ATPase in Bacterial Flagellar Protein Export.” *FEBS Letters* 583 (4): 743–48.
- Okazaki, Shin, Takakazu Kaneko, Shusei Sato, and Kazuhiko Saeki. 2013. “Hijacking of Leguminous Nodulation Signaling by the Rhizobial Type III Secretion System.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (42): 17131–36.
- Passmore, Steven E., Rithy Meas, and Donna L. Marykwas. 2008. “Analysis of the FliM/FliG Motor Protein Interaction by Two-Hybrid Mutation Suppression Analysis.” *Microbiology* 154 (Pt 3): 714–24.
- Paul, Koushik, Marc Erhardt, Takanori Hirano, David F. Blair, and Kelly T. Hughes. 2008. “Energy Source of Flagellar Type III Secretion.” *Nature* 451 (7177): 489–92.
- Pédelacq, Jean-Denis, Stéphanie Cabantous, Timothy Tran, Thomas C. Terwilliger, and Geoffrey S. Waldo. 2006. “Engineering and Characterization of a Superfolder Green Fluorescent Protein.” *Nature Biotechnology* 24 (1): 79–88.
- Pettersen, Eric F., Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, and Thomas E. Ferrin. 2004. “UCSF Chimera—a Visualization System for Exploratory Research and Analysis.” *Journal of Computational Chemistry* 25 (13): 1605–12.
- Polkinghorne, Adam, Jon Hanger, and Peter Timms. 2013. “Recent Advances in Understanding the Biology, Epidemiology and Control of Chlamydial Infections in Koalas.” *Veterinary Microbiology* 165 (3-4): 214–23.
- Preston, Gail M. 2007. “Metropolitan Microbes: Type III Secretion in Multihost Symbionts.” *Cell Host & Microbe* 2 (5): 291–94.
- Ramos-Morales, Francisco. 2012. “Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effectors on the Eukaryotic Host Cell.” *ISRN Cell Biology* 2012: 1–36.
- Rao, V. Srinivasa, V. Srinivasa Rao, K. Srinivas, G. N. Sujini, and G. N. Sunand Kumar. 2014. “Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis.” *International Journal of Proteomics* 2014: 1–12.
- Reid, S. D., C. J. Herbelin, A. C. Bumbaugh, R. K. Selander, and T. S. Whittam. 2000. “Parallel Evolution of Virulence in Pathogenic *Escherichia Coli*.” *Nature* 406 (6791): 64–67.
- Review on Antimicrobial Resistance. 2014. *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations*.
- Romo-Castillo, Mariana, Angel Andrade, Norma Espinosa, Julia Monjarás Feria, Eduardo Soto, Miguel Díaz-Guerrero, and Bertha González-Pedrajo. 2014. “EscO, a Functional and Structural Analog of the Flagellar FliJ Protein, Is a Positive Regulator of EscN ATPase Activity of the Enteropathogenic *Escherichia Coli* Injectisome.” *Journal of Bacteriology* 196 (12): 2227–41.
- Ross, Julia A., and Gregory V. Plano. 2011. “A C-Terminal Region of *Yersinia Pestis* YscD Binds the Outer Membrane Secretin YscC.” *Journal of Bacteriology* 193 (9): 2276–89.
- Ruano-Gallego, David, Beatriz Álvarez, and Luis Ángel Fernández. 2015. “Engineering the Controlled Assembly of Filamentous Injectisomes in *E. coli* K-12 for Protein Translocation into Mammalian Cells.” *ACS*

- Synthetic Biology* 4 (9): 1030–41.
- Rumer, Leonid, Joerg Jores, Petra Kirsch, Yolaine Cavnignac, Karen Zehmke, and Lothar H. Wieler. 2003. “Dissemination of pheU- and pheV-located Genomic Islands among Enteropathogenic (EPEC) and Enterohemorrhagic (EHEC) E. Coli and Their Possible Role in the Horizontal Transfer of the Locus of Enterocyte Effacement (LEE).” *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 292 (7-8): 463–75.
- Rüssmann, Holger. 2004. “Inverted Pathogenicity: The Use of Pathogen-Specific Molecular Mechanisms for Prevention or Therapy of Disease.” *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 293 (7-8): 565–69.
- Saldaña, Zeus, Aysen L. Erdem, Stephanie Schüller, Iruka N. Okeke, Mark Lucas, Arunon Sivananthan, Alan D. Phillips, James B. Kaper, José L. Puente, and Jorge A. Girón. 2009. “The Escherichia Coli Common Pilus and the Bundle-Forming Pilus Act in Concert during the Formation of Localized Adherence by Enteropathogenic E. Coli.” *Journal of Bacteriology* 191 (11): 3451–61.
- Sal-Man, Neta, Esther Biemans-Oldehinkel, David Sharon, Matthew A. Croxen, Roland Scholz, Leonard J. Foster, and B. Brett Finlay. 2012. “EscA Is a Crucial Component of the Type III Secretion System of Enteropathogenic Escherichia Coli.” *Journal of Bacteriology* 194 (11): 2819–28.
- Sal-Man, Neta, Sal-Man Neta, Deng Wanyin, and B. Brett Finlay. 2012. “EscI: A Crucial Component of the Type III Secretion System Forms the Inner Rod Structure in Enteropathogenic Escherichia Coli.” *Biochemical Journal* 442 (1): 119–25.
- Schroeder, Gunnar N., and Hubert Hilbi. 2008. “Molecular Pathogenesis of Shigella Spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion.” *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1): 134–56.
- Shannon, Jeffrey G., Aaron M. Hasenkrug, David W. Dorward, Vinod Nair, Aaron B. Carmody, and B. Joseph Hinnebusch. 2013. “Yersinia Pestis Subverts the Dermal Neutrophil Response in a Mouse Model of Bubonic Plague.” *mBio* 4 (5): e00170–13.
- Shaulov, Lihi, Jenia Gershberg, Wanyin Deng, B. Brett Finlay, and Neta Sal-Man. 2017. “The Ruler Protein EscP of the Enteropathogenic Escherichia Coli Type III Secretion System Is Involved in Calcium Sensing and Secretion Hierarchy Regulation by Interacting with the Gatekeeper Protein SepL.” *mBio* 8 (1). doi:10.1128/mBio.01733-16.
- Shaw, R. K., S. Daniell, F. Ebel, G. Frankel, and S. Knutton. 2001. “EspA Filament-Mediated Protein Translocation into Red Blood Cells.” *Cellular Microbiology* 3 (4): 213–22.
- Sherman, Fred, Gerald R. Fink, and James B. Hicks. 1986. *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*.
- Singer, Hanna M., Marc Erhardt, Andrew M. Steiner, Min-Min Zhang, Doju Yoshikami, Grzegorz Bulaj, Baldomero M. Olivera, and Kelly T. Hughes. 2012. “Selective Purification of Recombinant Neuroactive Peptides Using the Flagellar Type III Secretion System.” *mBio* 3 (3). doi:10.1128/mBio.00115-12.
- Smyth, Douglas R., Marek K. Mrozkiewicz, William J. McGrath, Pawel Listwan, and Bostjan Kobe. 2003. “Crystal Structures of Fusion Proteins with Large-Affinity Tags.” *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 12 (7): 1313–22.
- Spreter, Thomas, Calvin K. Yip, Sarah Sanowar, Ingemar André, Tyler G. Kimbrough, Marija Vuckovic, Richard A. Pfuetzner, et al. 2009. “A Conserved Structural Motif Mediates Formation of the Periplasmic Rings in the Type III

- Secretion System." *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (5): 468–76.
- Strange, Richard N., and Peter R. Scott. 2005. "Plant Disease: A Threat to Global Food Security." *Annual Review of Phytopathology* 43 (1): 83–116.
- Tacket, C. O., M. B. Sztein, G. Losonsky, A. Abe, B. B. Finlay, B. P. McNamara, G. T. Fantry, et al. 2000. "Role of EspB in Experimental Human Enteropathogenic Escherichia Coli Infection." *Infection and Immunity* 68 (6): 3689–95.
- Thomassin, Jenny-Lee, Xiang He, and Nikhil A. Thomas. 2011. "Role of EscU Auto-Cleavage in Promoting Type III Effector Translocation into Host Cells by Enteropathogenic Escherichia Coli." *BMC Microbiology* 11 (September): 205.
- Torruellas, Julie, Michael W. Jackson, Jeffry W. Pennock, and Gregory V. Plano. 2005. "The Yersinia Pestis Type III Secretion Needle Plays a Role in the Regulation of Yop Secretion." *Molecular Microbiology* 57 (6): 1719–33.
- Trabulsi, Luiz R., Rogéria Keller, and Tânia A. Tardelli Gomes. 2002. "Typical and Atypical Enteropathogenic Escherichia Coli." *Emerging Infectious Diseases* 8 (5): 508–13.
- Troisfontaines, Paul, and Guy R. Cornelis. 2005. "Type III Secretion: More Systems than You Think." *Physiology* 20 (October): 326–39.
- Uehara, Tsuyoshi, Thuy Dinh, and Thomas G. Bernhardt. 2009. "LytM-Domain Factors Are Required for Daughter Cell Separation and Rapid Ampicillin-Induced Lysis in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 191 (16): 5094–5107.
- Ugalde-Silva, Paul, Octavio Gonzalez-Lugo, and Fernando Navarro-Garcia. 2016. "Tight Junction Disruption Induced by Type 3 Secretion System Effectors Injected by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia Coli." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6 (August): 87.
- Umanski, Tatiana, Ilan Rosenshine, and Devorah Friedberg. 2002. "Thermoregulated Expression of Virulence Genes in Enteropathogenic Escherichia Coli." *Microbiology* 148 (Pt 9): 2735–44.
- Uzzau, S., N. Figueroa-Bossi, S. Rubino, and L. Bossi. 2001. "Epitope Tagging of Chromosomal Genes in Salmonella." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26): 15264–69.
- Vågene, Åshild J., Michael G. Campana, Nelly M. Robles García, Christina Warinner, Maria A. Spyrou, Aida Andrades Valtueña, Daniel Huson, et al. 2017. "Salmonella Enterica Genomes Recovered from Victims of a Major 16th Century Epidemic in Mexico." doi:10.1101/106740.
- Veitia, Reiner A. 2007. "Exploring the Molecular Etiology of Dominant-Negative Mutations." *The Plant Cell* 19 (12): 3843–51.
- Vidal, Jorge E., Canizález-Román Adrián, Gutiérrez-Jiménez Javier, and Navarro-García Fernando. 2007. "Patogénesis Molecular, Epidemiología Y Diagnóstico de Escherichia Coli Enteropatógena." *Salud Pública de México* 49 (5). doi:10.1590/s0036-36342007000500008.
- Vidal, Jorge E., and Fernando Navarro-García. 2008. "EspC Translocation into Epithelial Cells by enteropathogenic Escherichia Coli requires a Concerted Participation of Type V and III Secretion Systems." *Cellular Microbiology* 10 (10): 1975–86.
- Vogel, Gretchen. 2017. "Meet WHO's Dirty Dozen: The 12 Bacteria for Which New Drugs Are Most Urgently Needed." *Science*. doi:10.1126/science.aal0829.
- Wagner, Samuel, Lisa Königsmaier, María Lara-Tejero, Matthew Lefebvre, Thomas C. Marlovits, and Jorge E. Galán. 2010. "Organization and Coordinated Assembly of the Type III Secretion Export Apparatus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (41): 17745–

50.

- Warawa, J., B. B. Finlay, and B. Kenny. 1999. "Type III Secretion-Dependent Hemolytic Activity of Enteropathogenic Escherichia Coli." *Infection and Immunity* 67 (10): 5538–40.
- Waugh, David S. 2016. "Crystal Structures of MBP Fusion Proteins." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 25 (3): 559–71.
- Wee, Daniel H., and Kelly T. Hughes. 2015. "Molecular Ruler Determines Needle Length for the Salmonella Spi-1 Injectisome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (13): 4098–4103.
- Wells, Jonathan N., L. Therese Bergendahl, and Joseph A. Marsh. 2016. "Operon Gene Order Is Optimized for Ordered Protein Complex Assembly." *Cell Reports* 14 (4): 679–85.
- Widmaier, Daniel M., Danielle Tullman-Ercek, Ethan A. Mirsky, Rena Hill, Sridhar Govindarajan, Jeremy Minshull, and Christopher A. Voigt. 2009. "Engineering the Salmonella Type III Secretion System to Export Spider Silk Monomers." *Molecular Systems Biology* 5 (September): 309.
- Xie, Hai-Xia, Jin-Fang Lu, Nathalie Rolhion, David W. Holden, Pin Nie, Ying Zhou, and Xiu-Jun Yu. 2014. "Edwardsiella Tarda-Induced Cytotoxicity Depends on Its Type III Secretion System and Flagellin." *Infection and Immunity* 82 (8): 3436–45.
- Yamaguchi, S., H. Fujita, A. Ishihara, S. Aizawa, and R. M. Macnab. 1986. "Subdivision of Flagellar Genes of Salmonella Typhimurium into Regions Responsible for Assembly, Rotation, and Switching." *Journal of Bacteriology* 166 (1): 187–93.
- Yashunsky, Victor, Yashunsky Victor, and Aroeti Benjamin. 2015. "Infrared Surface Plasmon Spectroscopy Decodes Early Processes in Epithelial Host Cells upon Enteropathogenic Escherichia Coli Infection." In *Methods in Pharmacology and Toxicology*, 353–71.
- Yip, Calvin K., B. Brett Finlay, and Natalie C. J. Strynadka. 2004. "Structural Characterization of a Type III Secretion System Filament Protein in Complex with Its Chaperone." *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (1): 75–81.
- Yip, Calvin K., Tyler G. Kimbrough, Heather B. Felise, Marija Vuckovic, Nikhil A. Thomas, Richard A. Pfuetzner, Elizabeth A. Frey, B. Brett Finlay, Samuel I. Miller, and Natalie C. J. Strynadka. 2005. "Structural Characterization of the Molecular Platform for Type III Secretion System Assembly." *Nature* 435 (7042): 702–7.
- Zarivach, Raz, Zarivach Raz, Vuckovic Marija, Deng Wanyin, B. Brett Finlay, and Natalie C. J. Strynadka. 2007. "Structural Analysis of a Prototypical ATPase from the Type III Secretion System." *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (2): 131–37.
- Zhao, Weidong, and Stéphane Méresse. 2015. "A Method to Introduce an Internal Tag Sequence into a Salmonella Chromosomal Gene." *Methods in Molecular Biology* 1225: 81–92.
- Zilkenat, Susann, Mirita Franz-Wachtel, York-Dieter Stierhof, Jorge E. Galán, Boris Macek, and Samuel Wagner. 2016. "Determination of the Stoichiometry of the Complete Bacterial Type III Secretion Needle Complex Using a Combined Quantitative Proteomic Approach." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 15 (5): 1598–1609.