



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Regulación de la jerarquía de secreción de sustratos intermedios y tardíos a través del sistema de secreción tipo III de *Escherichia coli* enteropatógena

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

MEZTLI OFELIA GAYTÁN ENRÍQUEZ

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. DIMITRIS GEORGELLIS
(INSTITUTO DE FISILOGÍA CELULAR-UNAM)

DR. JUAN MIRANDA RÍOS

(INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS-UNAM)

Ciudad de México. Marzo, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 325 N del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Bertha González Pedrajo.

Agradezco el apoyo técnico de la Dra. Norma Espinosa Sánchez para la elaboración de este trabajo.

Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo de los donativos 180460 de CONACYT e IN209617 de la DGAPA, UNAM. Adicionalmente, durante la realización de mi tesis me fue otorgada la beca de manutención con número 262002 por parte del CONACYT. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN209617.

Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) y al Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes de la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) por el apoyo económico que me fue otorgado para la asistencia a congresos y la realización de una estancia internacional.

El comité tutor que asesoró este trabajo estuvo conformado por la Dra. Bertha González Pedrajo, el Dr. Dimitris Georgellis y el Dr. Juan Miranda Ríos.

El jurado que examinó esta tesis estuvo formado por la Dra. Esperanza Martínez Romero, el Dr. Mario Soberón Chávez, el Dr. Luis Servín González, la Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo y el Dr. José Luis Puente 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 Cabera; del Bioterio: Dra. Claudia Rivera Cerecedo y Dr. Héctor Malagón Rivero; de la Unidad de Cómputo: Biol. Gerardo Coello Coutiño, M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo, Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo e Ing. Ivette Rosas Arciniega.

Agradecemos a los doctores: José Luis Puente, Juan Xicohtencatl y Fernando Navarro por la donación de las cepas ΔsepL , ΔespB , ΔespD y ΔespA así como por el anticuerpo anti-EspD.

También reconocemos y agradecemos todo el apoyo recibido por el Dr. Keiichi Namba, el Dr. Tohru Minamino y la Dra. Miki Kinoshita durante la realización de una estancia de investigación en la Universidad de Osaka, Japón.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
Sistemas de secreción tipo III.....	1
Bacterias patógenas que poseen SST3.....	2
SST3 en simbiosis.....	4
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	4
Mecanismo molecular de patogénesis de EPEC.....	6
Adherencia inicial.....	6
Transducción de señales.....	7
Adherencia íntima.....	9
Locus de esfacelamiento enterocítico.....	11
Sistema de secreción tipo III de EPEC.....	12
Estructura del SST3 de EPEC.....	13
Componentes del cuerpo basal.....	15
Aparato de exportación.....	16
Apéndices extracelulares.....	17
Componentes citoplásmicos.....	18
Biogénesis y funcionamiento del SST3.....	18
Reclutamiento y secreción de sustratos.....	19
Energización de la secreción.....	21
Regulación de la secreción de sustratos.....	21
ANTECEDENTES	25

El complejo SepL-SepD-CesL regula la secreción de sustratos en EPEC.....	25
La ausencia de calcio promueve un cambio en la secreción de sustratos.....	26
Mecanismo de regulación de la secreción de translocadores y efectores.....	27
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	29
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	30
Manipulación de DNA y clonación de genes.....	31
Etiquetado de genes en cromosoma.....	34
Ensayo de secreción.....	34
Inmunodetección.....	35
Producción de proteínas recombinantes.....	36
Ensayos de co-purificación por cromatografía de afinidad por níquel.....	37
Fraccionamiento celular.....	39
Ensayos de estabilidad de proteínas.....	40
Co-inmunoprecipitación.....	41
RESULTADOS	42
Efecto del calcio en la secreción de EPEC.....	42
Componentes estructurales del SST3 involucrados en la detección del calcio.....	47
Blancos citoplásmicos de la regulación por calcio.....	50
Componentes del SST3 que interaccionan con SepL.....	59
El dominio citoplásmico de EscV participa en el reconocimiento de sustratos.....	66

Los componentes de la plataforma de clasificación interactúan	
con sustratos.....	67
Resultados adicionales.....	70
DISCUSIÓN.....	77
CONCLUSIONES.....	90
PERSPECTIVAS.....	91
REFERENCIAS.....	93

ABREVIATURAS

A/E	Adherencia y esfacelamiento
Ap	Ampicilina
CBB	Azul de Coomassie
CBD	Sitio de unión a chaperona
Cm	Cloranfenicol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
EAF	Factor de adherencia de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ECP	Pili común de <i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ácido etilenglicol bis (2-aminoetiléter)tetra-acético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
HA	Hemaglutinina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
Km	Kanamicina
LEE	Locus de esfacelamiento enterocítico
MBP	Proteína de unión a maltosa
Nle	Efactor no codificado en el locus de esfacelamiento enterocítico
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Buffer de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMF	Fuerza protón motriz
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Sm	Estreptomicina
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
SST3	Sistema de secreción tipo III
Tc	Tetraciclina
TCA	Ácido tricloroacético
Tir	Receptor de intimina translocado

RESUMEN

Los Sistemas de Secreción Tipo III (SST3) son piezas clave en la virulencia de gran variedad de bacterias Gram negativas. Estos dispositivos moleculares funcionan, literalmente, como jeringas moleculares a través de las cuales se inyectan proteínas efectoras del citoplasma bacteriano a la célula hospedera. La translocación de efectores ocurre cuando el SST3 hace contacto directo con la célula hospedera y forma un poro en la membrana (constituido por dos proteínas denominadas translocadoras). La secreción ordenada de proteínas (translocadores antes que efectores) está regulada por un complejo formado por las proteínas SepL, SepD y CesL. Adicionalmente, se ha propuesto que diversas señales ambientales, como el calcio, influyen la secreción de proteínas a través del SST3. Empleando como modelo de estudio a *Escherichia coli* enteropatógena, investigamos la conexión entre la concentración de calcio y la regulación de la secreción de sustratos por la proteína SepL. En este trabajo observamos que la eliminación de calcio del medio de cultivo promueve la secreción de efectores aún en ausencia de las proteínas que forman el poro de translocación; sin embargo, esta condición no afecta la estabilidad, formación y localización celular del complejo regulatorio SepL/SepD/CesL. Asimismo, identificamos a EscV, el componente principal de la puerta de exportación, como un nuevo punto de regulación de la secreción ya que sirve como plataforma para el reconocimiento tanto de sustratos como de la proteína que regula el orden de secreción, SepL.

ABSTRACT

Type Three Secretion Systems are key virulence factors employed by several Gram negative bacteria. These molecular devices function, literally, as molecular syringes to inject effector proteins from the bacterial cytosol into the host cell. Translocation of effectors is triggered upon host-cell contact in response to different environmental cues, such as calcium levels. Using enteropathogenic *Escherichia coli* as a model system, we investigated the link between calcium concentration and secretion regulation by the gatekeeper protein SepL. We observed that calcium depletion from the culture media promotes effector secretion in a translocon-independent manner. Furthermore, the stability, formation, and subcellular localization of the SepL/SepD/CesL regulatory complex were not affected by the absence of calcium. In addition, we identified EscV, the major export gate component, as a potential secretion-regulatory checkpoint, since it serves as a binding platform for both, secreted substrates and the secretion-regulatory protein SepL.

INTRODUCCIÓN

Sistema de secreción tipo III.

Las bacterias han desarrollado diversas estrategias para asegurar su sobrevivencia y diseminación. Entre estas encontramos la formación de estructuras proteicas complejas como el flagelo y el inyectisoma (Figura 1). El flagelo es un organelo de motilidad bacteriana que le permite a la bacteria dirigirse hacia ambientes favorables, mientras que el inyectisoma funciona como una jeringa molecular que permite la translocación de proteínas directamente al citoplasma de células hospederas (Erhardt, Namba et al., 2010).

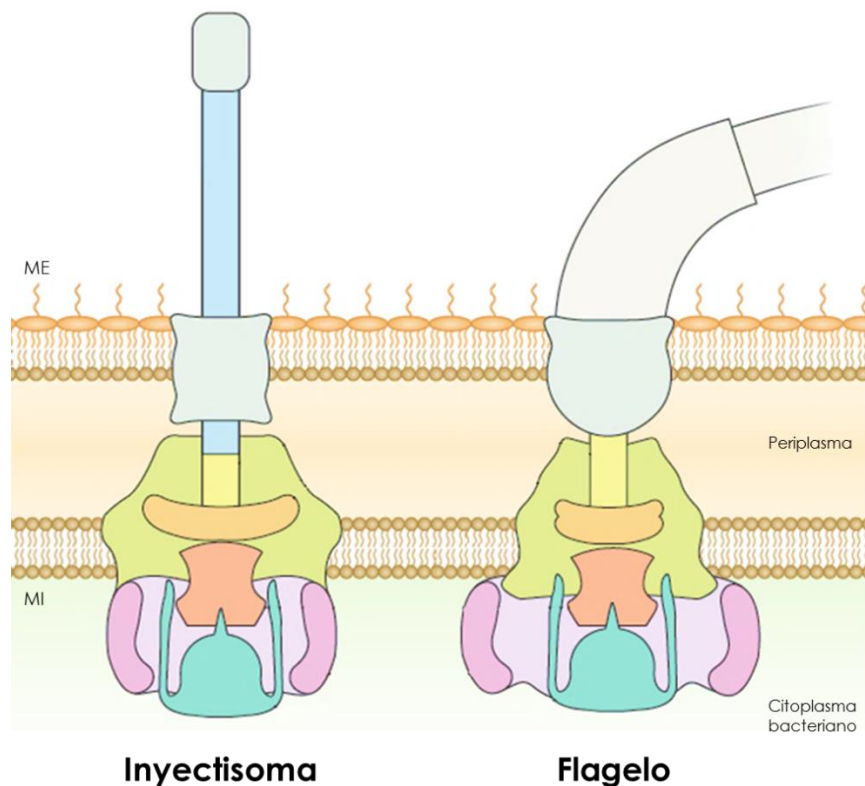


Figura 1. Esquema representativo de la estructura del inyectisoma o SST3 y el flagelo bacteriano. Modificado de (Deng, Marshall et al., 2017). MI: Membrana interna y ME: Membrana externa.

Si bien, el flagelo y el inyectisoma difieren en función, tienen una relación evolutiva cercana. Estudios recientes sugieren que el inyectisoma surgió a partir del reclutamiento de componentes del aparato flagelar, con la posterior adquisición de otros elementos necesarios para la translocación de proteínas (Abby & Rocha, 2012). Por lo anterior, los componentes que forman el núcleo de ambos sistemas (Sistema de Secreción Tipo III o SST3) están altamente conservados, mientras que los apéndices extracelulares son propios de cada organelo. Aunque por definición, el SST3 es la maquinaria molecular que permite la exportación de proteínas a través de las membranas bacterianas en un solo paso, este término se emplea de manera intercambiable para referirse al inyectisoma.

Debido a que la translocación de proteínas que manipulan diversos procesos celulares del hospedero en beneficio de la bacteria (denominados efectores) representa una ventaja adaptativa, los SST3 se encuentran en una gran variedad de especies de bacterias Gram negativas, tanto patógenas como simbiotes (Cornelis, 2006). Los efectores translocados a través de estos sistemas varían en número y función de acuerdo a la especie bacteriana y su hospedero, pero reflejan los requerimientos únicos de cada asociación.

Bacterias patógenas que poseen SST3: a la fecha, se han reportado más de 10 patógenos de humanos que emplean el SST3 como una de sus principales herramientas de virulencia. El espectro de enfermedades que provocan es muy amplio: enfermedades intestinales, neumonía, fiebre entérica, enfermedades de

transmisión sexual, tosferina e incluso peste bubónica (Tabla 1) (Coburn, Sekirov et al., 2007). Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de 12 bacterias y familias de bacterias patógenas para las cuales se necesita con urgencia el desarrollo de nuevos antibióticos (World Health Organization, 2017). Al menos cuatro de ellas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* emplean al inyectisoma como uno de sus principales mecanismos de virulencia. En años recientes el empleo de inhibidores del SST3 se ha planteado como una alternativa al uso de antibióticos tradicionales (Duncan, Linington et al., 2012).

Tabla 1. Algunas bacterias patógenas de humanos que poseen SST3

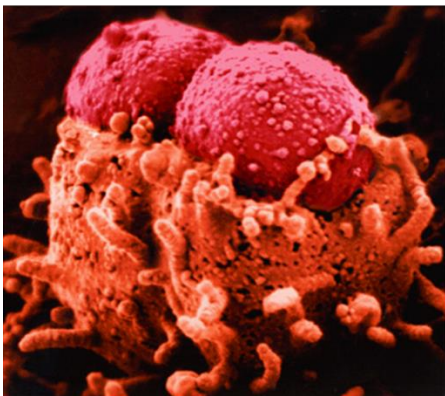
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Salmonella enterica</i>	

Los SST3 también son empleados como armas moleculares por diversos patógenos de plantas como: *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* y *Erwinia amylovora*. Estas bacterias causan pérdidas económicas importantes ya que son plaga de diversos cultivos como tomate, papa, plátano, tabaco, berenjena, pimiento, manzana y pera, entre otros (Hueck, 1998). Adicionalmente, los SST3 también se han descrito en patógenos de animales como *Aeromonas salmonicida* y *Edwardsiella tarda* que infectan peces, así como en el patógeno de ratones *Citrobacter rodentium*, que de hecho se emplea

como modelo animal para el estudio de infecciones (Crepin, Collins et al., 2016, Okuda, Takeuchi et al., 2014, Origgi, Benedicenti et al., 2017).

SST3 en simbiotes. Además de su papel en la virulencia de ciertas especies de bacterias, los SST3 también les han permitido establecer asociaciones simbióticas con organismos superiores (Preston, 2007). Quizá el caso mejor estudiado es el de *Rhizobium* spp., bacterias fijadoras de nitrógeno que se asocian con plantas leguminosas. *Rhizobium* posee un SST3 a través del cual secreta proteínas denominadas Nops (Nodulation Outer Protein), las cuales son cruciales en la interacción con su hospedero. Algunas de las proteínas Nops son translocadas a las células de la planta, donde, entre otras cosas, suprimen la respuesta de defensa contra *Rhizobium*, permitiendo así que se establezca una relación de simbiosis (Hueck, 1998). De igual manera, se ha demostrado que el SST3 de *Burkholderia rhizoxinica* y *Sodalis glossinidius* es indispensable para la asociación con sus hospederos, el hongo fitopatógeno *Rhizopus microspores* y la mosca Tsetse, respectivamente (Dale, Young et al., 2001, Lackner, Moebius et al., 2011).

***Escherichia coli* enteropatógena.**



Hospedero: niños menores de 5 años, adultos (con inóculos grandes), gatos, perros y conejos.

Sitio de colonización: intestino delgado.

Dosis de infección: 10^8 – 10^{10} unidades formadoras de colonia.

Modo de infección: consumo de alimentos y agua contaminada.

Síntomas clínicos: diarrea acuosa, vómito, dolor abdominal, náuseas y fiebre.

Figura 2. En el panel izquierdo se muestra una microscopía electrónica de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), tomada de (Kaper, Nataro et al., 2004). En el panel derecho se describen las características principales de las infecciones por EPEC.

Escherichia coli enteropatógena o EPEC se considera la causa más probable de los brotes de diarrea en niños (diarrea de verano o cólera infantil) que ocurrieron en Europa durante el siglo XVII. Sin embargo, no fue hasta 1945 cuando John Bray identificó a EPEC (entonces conocida como *Bacterium coli* neapolitanum) como el agente causal de la denominada diarrea de verano (Bray, 1945 , Robins-Browne, 1987).

Hoy en día, las enfermedades diarreicas provocadas por agentes biológicos siguen siendo prevalentes. De hecho, se estima que en 2010, la incidencia global de casos de enfermedades diarreicas de transmisión alimentaria ascendió a 1.8 mil millones, resultando en 599 000 muertes a nivel mundial. Aunque se estima que el mayor número de muertes (213 515) fueron causadas por norovirus, EPEC ocupa el segundo lugar con 121 455 muertes reportadas (Pires, Fischer-Walker et al., 2015). Por lo anterior, EPEC sigue siendo un problema importante de salud pública, principalmente en países en vías de desarrollo.

Las infecciones intestinales causadas por EPEC afectan principalmente a niños menores de dos años. Una infección por EPEC provoca diarrea acuosa severa que resulta en la pérdida excesiva de agua y electrolitos, la cual puede derivar en la deshidratación y muerte de los pacientes (Nataro & Kaper, 1998). Adicionalmente, en las infecciones por EPEC se observa una histopatología singular conocida como lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E) que si bien

es un sello distintivo de las infecciones por EPEC, también es causada por otros patógenos como EHEC, R-EPEC (EPEC específica de conejos) y *C. rodentium*, a los que en conjunto se les conoce como patógenos A/E. La lesión A/E se caracteriza por la adherencia íntima de la bacteria a los enterocitos y la formación de estructuras en forma de pedestal ricas en actina debajo del sitio de adhesión de la bacteria, así como la destrucción localizada de las microvellosidades intestinales (Figura 3) (Moon, Whipp et al., 1983).

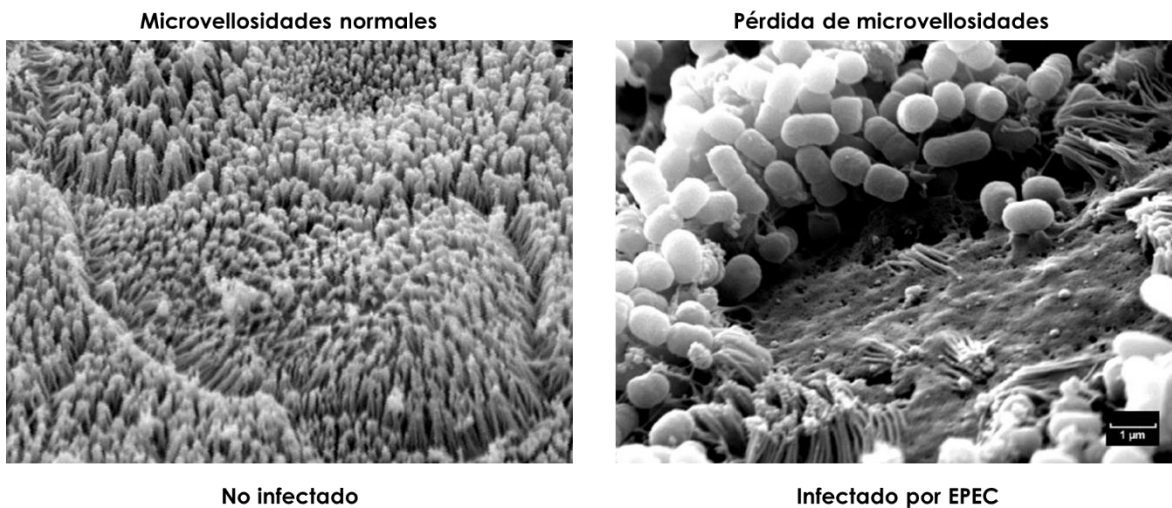


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido que muestra el tejido sano e infectado por EPEC, donde se observa la formación de la lesión A/E.

Mecanismo molecular de patogénesis de EPEC.

Para su mejor entendimiento, el mecanismo a través del cual EPEC induce la formación de la lesión A/E se divide en tres etapas (Donnenberg & Kaper, 1992):

Adherencia inicial: EPEC posee la habilidad de asociarse a su hospedero formando un patrón de adherencia localizada (Figura 4A). Esta capacidad depende de la presencia del plásmido EAF (EPEC Adherence Factor), el cual

codifica los genes necesarios para la biogénesis del pilus tipo IV denominado BFP (Bundle Forming Pilus), que media la adherencia bacteria-bacteria y bacteria-hospedero (Figura 4B) (Giron, Ho et al., 1991). Además del pilus BFP, se ha propuesto que otras adhesinas participan en la adherencia inicial de EPEC, tal es el caso de la intimina, el flagelo y el pilus común de *E. coli* (ECP: *E. coli* common pilus) (Cleary, Lai et al., 2004, Giron, Torres et al., 2002, Saldana, Erdem et al., 2009).

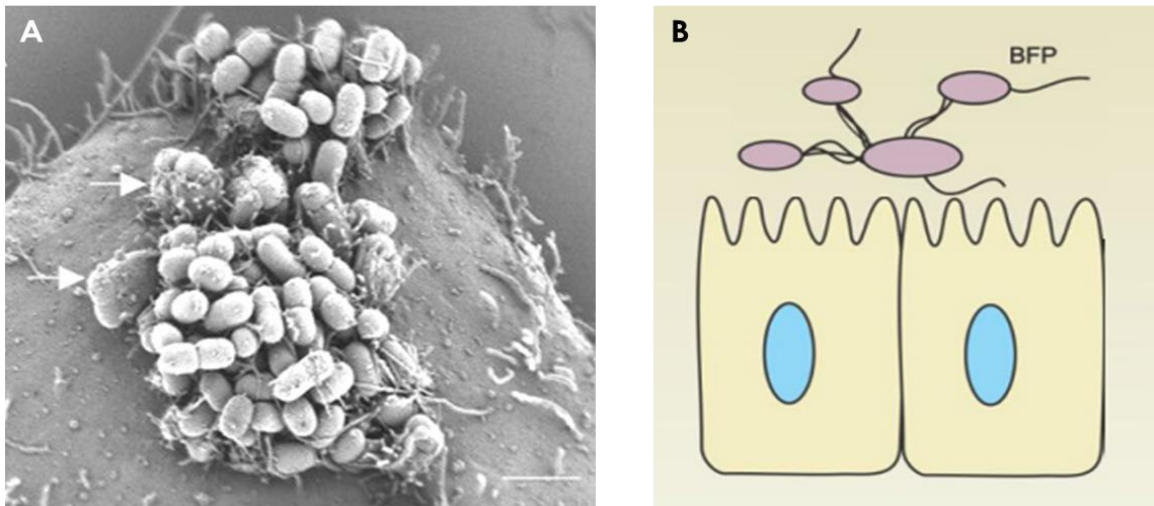


Figura 4. A) Microscopía electrónica de barrido de EPEC infectando células HT-29. Se observa el patrón de adherencia localizada. Tomada de (Saldana et al., 2009). B) Esquema de las asociaciones (bacteria-bacteria y bacteria-hospedero) que promueve el pili BFP. Modificada de (Reis & Horn, 2010).

Transducción de señales: a lo largo de su ciclo de vida, las bacterias están expuestas a distintos estímulos y señales ambientales que afectan su fisiología (Connolly, Finlay et al., 2015). Las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal promueven la expresión y funcionamiento del SST3 de EPEC (Kenny, Abe et al., 1997a). A través de este, EPEC inyecta 22 proteínas efectoras directamente al citoplasma de la célula hospedera (Deng, Yu et al., 2012). Estas proteínas de virulencia poseen distintas actividades bioquímicas que interfieren con las

funciones fisiológicas normales del hospedero (Figura 5, Tabla 2) (Dean & Kenny, 2009).

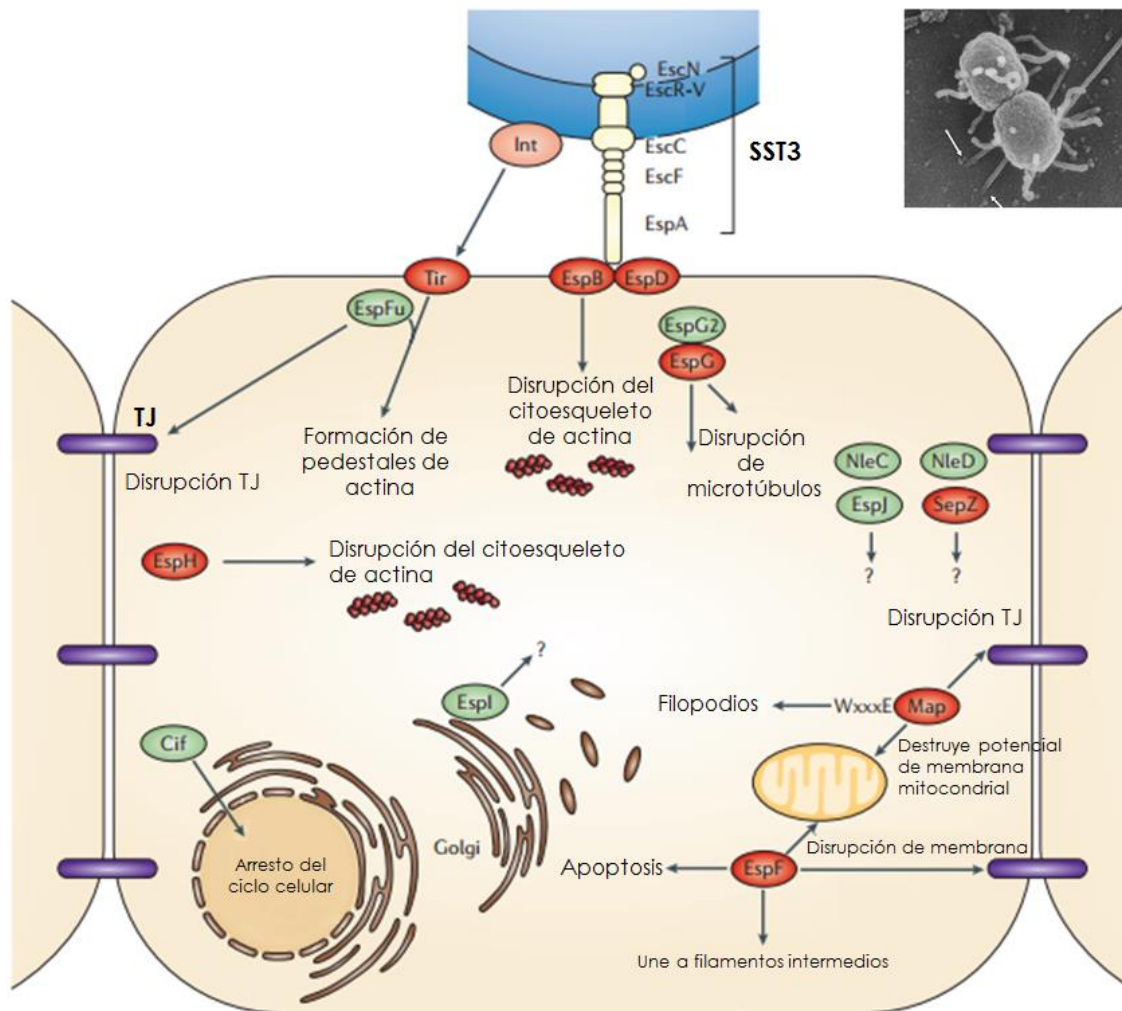


Figura 5. Esquema representativo de la inyección de algunos efectores de EPEC a través del SST3 y sus efectos en la célula hospedera. SST3: Sistema de secreción tipo III, Int: Intimina, TJ: uniones estrechas. Modificado de (Hayward, Leong et al., 2006). En la parte superior derecha se muestra una microscopía electrónica de barrido de EPEC infectando células HEL. Se observa el filamento del SST3 (flechas blancas) de EPEC haciendo contacto con las células HEL (Knutton, Rosenshine et al., 1998).

Tabla 2. Efectores de EPEC

Efactor	Función
EspB	Inhibe la fagocitosis y participa en la eliminación de microvellosidades.
Tir	Receptor de la intimina que promueve la adherencia íntima y formación de pedestal a través de la polimerización de actina.

Map	Modula la actividad de Rho GTPasas, induce apoptosis, altera las funciones mitocondriales, las uniones estrechas y los canales iónicos.
EspH	Modula la actividad de Rho GTPasas, inhibe la fagocitosis, participa en la adherencia íntima y en la formación del pedestal de actina.
EspF	Induce apoptosis, inhibe la fagocitosis, altera las uniones estrechas y canales iónicos.
EspG	Altera los microtúbulos, interfiere con el tráfico celular y con la localización de canales iónicos.
EspZ	Inhibe la citotoxicidad celular, ayuda a mantener las adhesiones focales, reduce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial.
NleA/EspI	Altera las uniones estrechas y el tráfico de proteínas.
NleB	Ayuda a modular la respuesta inmune
NleB2	Ayuda a modular la respuesta inmune
NleC	Ayuda a modular la respuesta inmune
NleD	Ayuda a modular la respuesta inmune
NleE	Ayuda a modular la respuesta inmune
NleF	Desconocida
NleG	Ubiquitin ligasa de función desconocida
NleH	Ayuda a modular la respuesta inmune, inhibe la apoptosis
NleH2	Modera la respuesta inflamatoria del hospedero.
NleJ	Desconocida
EspG2	Altera los microtúbulos.
EspJ	Inhibe la fagocitosis
EspL	Participa en la adherencia íntima y en la formación del pedestal de actina.
LifA	Desconocida

Modificada de (Donnenberg, 2013).

Adherencia íntima: la proteína Tir (Translocated intimin receptor), uno de los 22 efectores translocados a la célula hospedera, es esencial para la colonización por EPEC (Vlisidou, Dziva et al., 2006). Una vez translocado, Tir se inserta en la membrana del hospedero y adopta una estructura de asa, dejando expuesto su

dominio central hacia el lumen extracelular y sus extremos amino y carboxilo hacia el citoplasma de la célula hospedera (Kenny, 1999, Kenny, DeVinney et al., 1997b). La región extracelular de Tir funciona como receptor de una adhesina de membrana de EPEC conocida como intimina. Esta interacción promueve la adherencia íntima entre la bacteria y el hospedero (~10nm) (Luo, Frey et al., 2000). Adicionalmente, Tir también es el responsable de los rearrreglos de actina que dan lugar a la formación del pedestal característico de las infecciones por EPEC (Figura 6) (Kenny et al., 1997b).

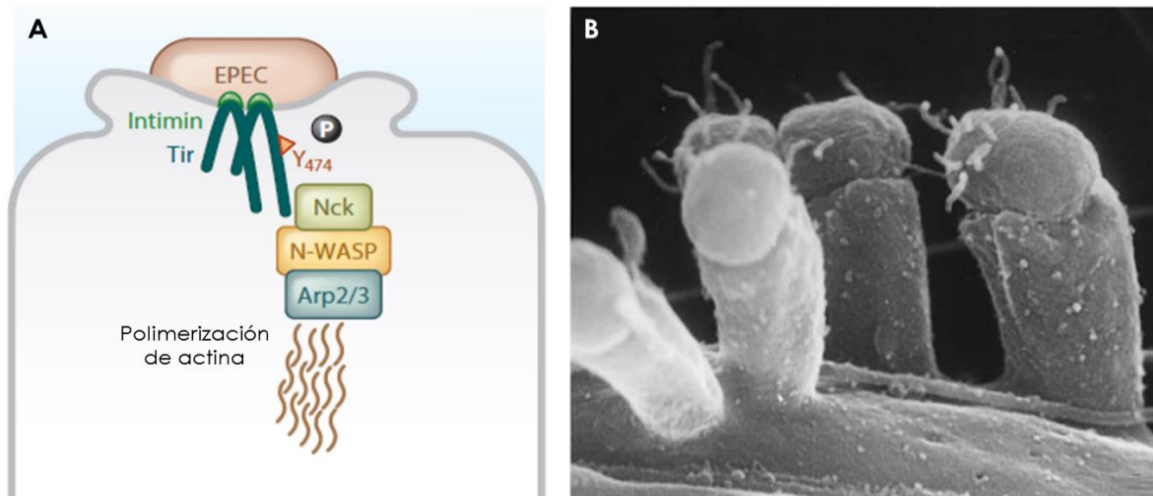


Figura 6. A) Esquema de la interacción Tir-Intimina así como la vía de señalización que promueve la polimerización de actina. Tir es fosforilado por cinasas del hospedero en la tirosina 474 (Y474). La forma fosforilada de Tir recluta a la proteína Nck, esta activa a la proteína neuronal del síndrome Wiskott Aldrich (N-WASP, por sus siglas en inglés), que a su vez estimula la nucleación y polimerización de actina mediada por el complejo Arp2/3. Modificado de (Pearson, Giogha et al., 2016). B) Microscopía electrónica de barrido de EPEC infectando células HEL, se aprecia la formación del pedestal bajo el sitio de adherencia de la bacteria (Knutton et al., 1998).

Los 22 efectores de EPEC translocados a través del SST3 son los responsables de todos los cambios fisiológicos que dan lugar a la formación de la lesión A/E. Es por ello que el SST3 es esencial para la patogénesis de EPEC. En los patógenos A/E, el SST3 se codifica en una isla genómica de patogenicidad denominada locus de

esfacelamiento enterocítico (LEE) (McDaniel, Jarvis et al., 1995). De hecho, la transferencia del LEE de EPEC a una cepa no patógena de *E. coli* (K12) es suficiente para conferirle a esta la capacidad de formar la lesión A/E (McDaniel & Kaper, 1997).

Locus de esfacelamiento enterocítico.

El LEE de EPEC es una región de 35 kb insertada en el gen que codifica para el tRNA de selenocisteína. Su contenido de GC (~38 %) es menor al del resto del genoma de *E. coli* (~51 %), lo cual sugiere que esta isla de patogenicidad fue adquirida por transferencia horizontal (Deng, Li et al., 2001, Schmidt & Hensel, 2004).

El LEE de EPEC (Figura 7) está conformado por 41 marcos de lectura abiertos organizados en 7 operones (LEE1-LEE7) y 4 unidades transcripcionales individuales (*etgA*, *cesF*, *map* y *escD*) (Elliott, Wainwright et al., 1998, Yerushalmi, Litvak et al., 2014). En este locus se codifican todos los componentes estructurales del SST3, así como proteínas que regulan su expresión (reguladores transcripcionales) y funcionamiento (reguladores de la secreción). La adhesina de membrana íntima también está codificada en esta isla de patogenicidad, así como 7 de los 22 efectores translocados a través del SST3 y sus chaperonas. El resto de los efectores se encuentran codificados fuera del LEE, por lo que se les denomina Nle (Non-LEE encoded).

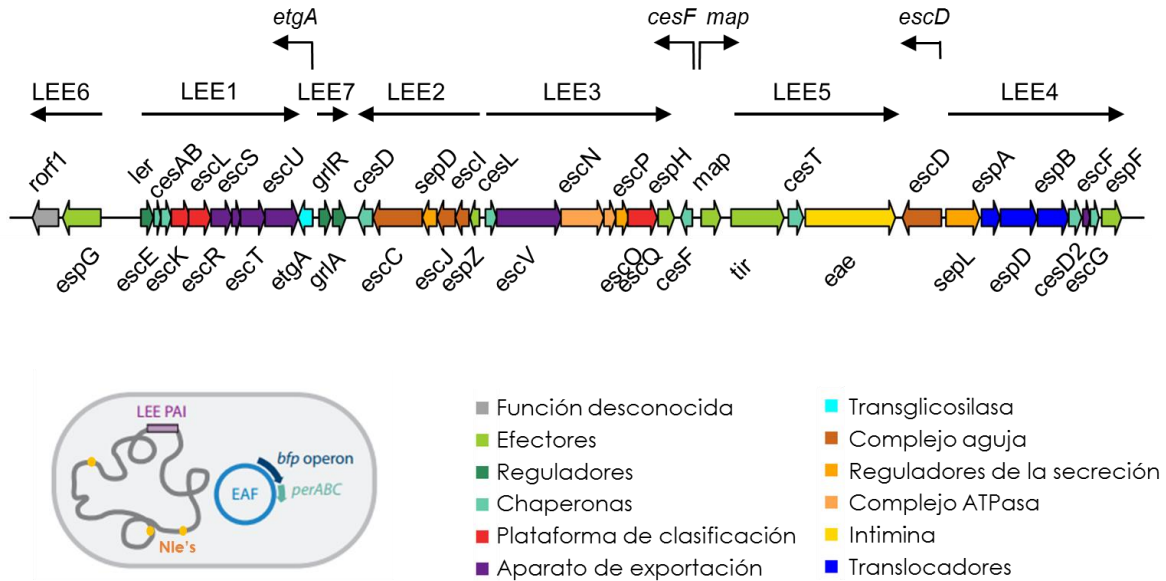


Figura 7. A) Esquema del LEE donde se muestran las 4 unidades transcripcionales individuales y los 37 marcos de lectura abiertos restantes organizados en 7 operones. Con código de colores se muestra la función asignada a cada gen. En la parte inferior izquierda se muestra un esquema de EPEC con el LEE integrado en cromosoma y diferentes Nle's, así como el plásmido EAF que codifica para pili tipo IV BFP . Modificada de (Gaytan, Martinez-Santos et al., 2016).

Sistema de secreción tipo III de EPEC.

El SST3 de EPEC conserva la arquitectura global de todos los SST3, una estructura extracelular en forma de aguja (con un canal central de 2-3 nm de diámetro) unida a una serie de anillos membranales conectados a través de un eje periplásmico (Hueck, 1998); sin embargo, EPEC se distingue por la presencia de un largo filamento extracelular ensamblado en la punta de la aguja (Figura 8) (Knutton et al., 1998, Sekiya, Ohishi et al., 2001).

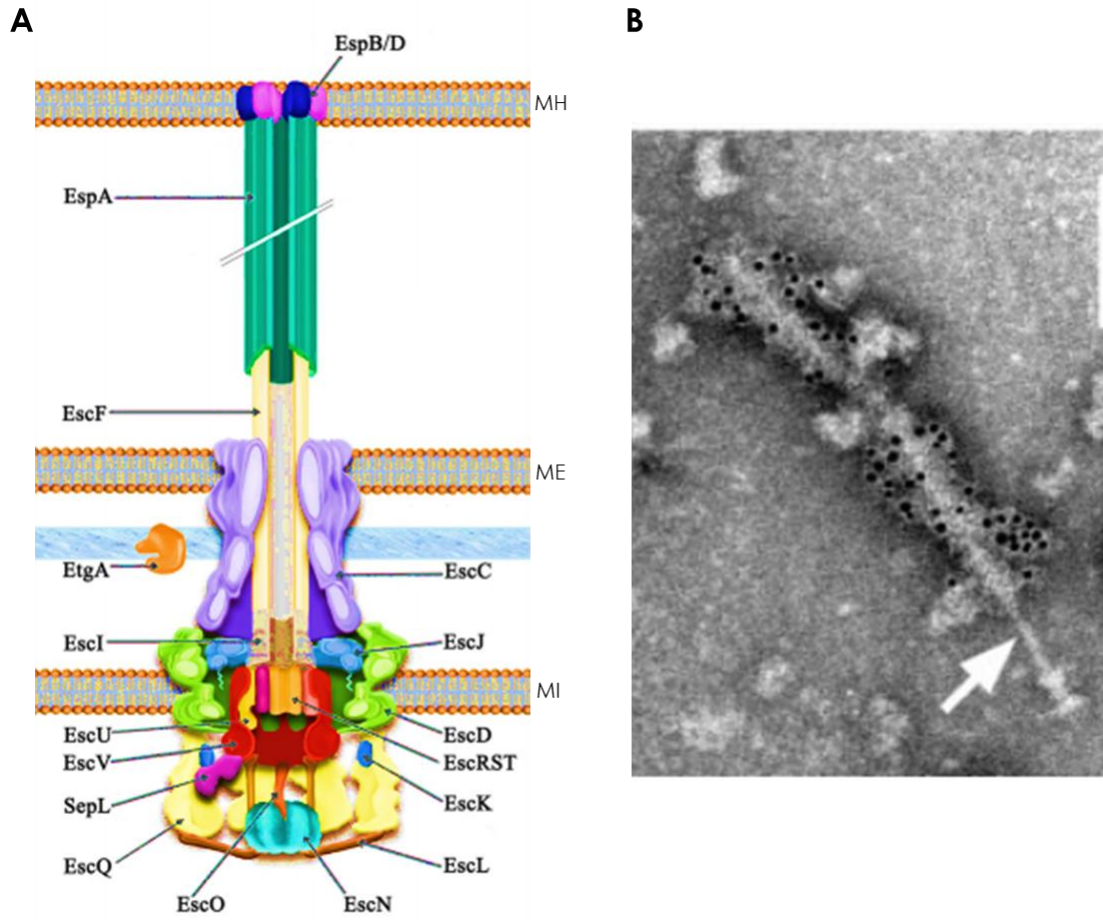


Figura 8. A) Ilustración del SST3 de EPEC indicando los nombres de las proteínas que forman cada estructura. Modificada de (Gaytan et al., 2016). MH: membrana del hospedero, ME: membrana externa y MI: membrana interna. B) Microscopía electrónica de transmisión donde se aprecia el complejo aguja purificado de EPEC. El filamento fue detectado con anticuerpos específicos contra la proteína EspA acoplados a partículas de oro. La flecha blanca señala a la aguja. Tomada de (Sekiya et al., 2001).

Estructura del SST3 de EPEC.

En general, los componentes estructurales del SST3 se pueden agrupar en cuatro categorías: componentes del cuerpo basal, aparato de exportación, apéndices extracelulares y componentes citoplásmicos (Tabla 3).

Tabla 3. Componentes estructurales de SST3.

Nomenclatura unificada*	Estructura que forman	EPEC	Salmonella SPI-1	Shigella	Yersinia spp.	P. aeruginosa
Cuerpo basal						
SctC	Secretina Anillo de ME	EscC	InvG	MxiD	YscC	PscC
SctI	Eje	EscI	PrgJ	MxiI	YscI	PscI
SctD	Anillo de MI	EscD	PrgH	MxiG	YscD	PscD
SctJ	Anillo de MI	EscJ	PrgK	MxiJ	YscJ	PscJ
Aparato de exportación						
SctR	Componente de MI	EscR	SpaP	Spa24	YscR	PscR
SctS	Componente de MI	EscS	SpaQ	Spa9	YscS	PscS
SctT	Componente de MI	EscT	SpaR	Spa29	YscT	PscT
SctU	Puerta de exportación	EscU	SpaS	Spa40	YscU	PscU
SctV	Puerta de exportación	EscV	InvA	MxiA	YscV	PcrD
Apéndices extracelulares						
SctB	Poro de translocación	EspB	SipC	IpaC	YopD	PopD
SctE	Poro de translocación	EspD	SipB	IpaB	YopB	PopB
SctA	Filamento	EspA	SipD	IpaD	LcrV	PcrV
SctF	Aguja	EscF	PrgI	MxiH	YscF	PscF
Componentes citoplásmicos						
SctN	ATPasa	EscN	InvC	Spa47	YscN	PscN
SctO	Regulador + de la ATPasa	EscO	InvI	Spa13	YscO	PscO
SctL	Regulador - de la ATPasa Plataforma de clasificación	EscL	OrgB	MxiN	YscL	PscL
SctQ	Plataforma de clasificación	EscQ	SpaO	Spa33	YscQ	PscQ
SctK	Plataforma de clasificación	EscK	OrgA	MxiK	YscK	PscK

* La nomenclatura unificada fue propuesta por Hueck en 1998 (Hueck, 1998). Sct: secretion and cellular translocation.

Componentes del cuerpo basal. La estructura que ancla a los componentes extracelulares del SST3 a las membranas bacterianas se conoce como cuerpo basal, este complejo consta de tres anillos membranales conectados a través de un eje periplásmico (Figura 9) (Sekiya et al., 2001).

La proteína EscC forma un anillo en la membrana externa de 12 a 14 subunidades (Spreter, Yip et al., 2009). EscC pertenece a la familia de las secretinas, estas proteínas funcionan como canales que permiten la secreción de proteínas bacterianas a través de la membrana externa (Korotkov, Gonen et al., 2011). En muchos sistemas, la oligomerización de la secretina y su inserción en la membrana externa es asistida por una lipoproteína llamada pilotina, sin embargo, en los patógenos A/E no se ha identificado ninguna proteína que cumpla con dicha función, de hecho, la proteína EscC carece del dominio de unión a pilotina (Gauthier, Puente et al., 2003, Gaytan et al., 2016).

En la membrana interna de EPEC se ensamblan dos anillos concéntricos (Figura 9). El anillo externo está formado por subunidades de la proteína EscD, la cual consiste de un dominio amino citoplásmico y un dominio carboxilo periplásmico conectados por un cruce transmembranal (Kresse, Schulze et al., 1998). Mientras que el anillo interno está formado por la proteína EscJ, la cual, a diferencia de sus homólogos en otros sistemas, no posee cruces transmembranales, en su lugar, tiene un dominio de lipidación que la ancla a la cara periplásmica de la membrana interna (Crepin, Prasannan et al., 2005, Yip, Kimbrough et al., 2005).

Además de los contactos entre las proteínas EscD y EscC (Creasey, Delahay et al., 2003), los anillos de membrana están conectados a través de un eje periplásmico formado por la proteína EscI (Pallen, Beatson et al., 2005, Sal-Man, Deng et al., 2012).

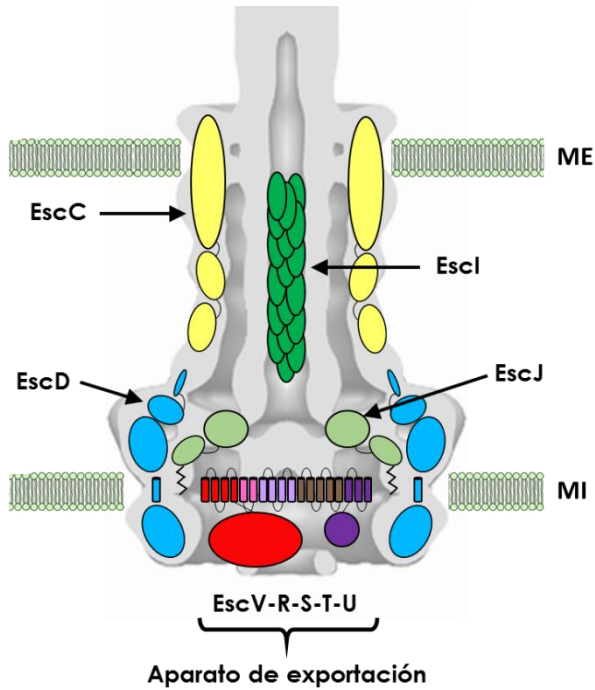


Figura 9. Esquema donde se muestran los componentes del cuerpo basal y el aparato de exportación de EPEC. ME: membrana externa, MI: membrana interna.

Aparato de exportación. Localizado en la base del cuerpo basal y embebido en la membrana interna, el aparato de exportación actúa como el portal de entrada de los sustratos al SST3. Está formado por cinco proteínas esenciales para la secreción, EscR, EscS, EscT, EscU y EscV (Figura 9), que están conservadas en todos los SST3, incluyendo el flagelar (Deng, Puente et al., 2004, Wagner, Konigsmair et al., 2010, Yip et al., 2005). Las proteínas EscU y EscV tienen dominios citoplásmicos de 100 y 300 aminoácidos, respectivamente, que forman una **puerta de exportación** en la base del sistema que reconoce y controla el acceso de sustratos (Minamino, Imada et al., 2008, Minamino, Shimada et al., 2010).

Apéndices extracelulares. Como se aprecia en la Tabla 3, los apéndices extracelulares comprenden tres estructuras, la aguja, el filamento y el poro de translocación. **La aguja** es una estructura helicoidal hueca de 23 nm de largo formada por múltiples copias de la proteína EscF (Sekiya et al., 2001), está anclada al cuerpo basal del SST3 a través de su interacción con los anillos de membrana (Ogino, Ohno et al., 2006), mientras que en la parte distal se asocia con la proteína EspA (Wilson, Shaw et al., 2001), cuya polimerización resulta en la formación del **filamento**, un apéndice extracelular hueco que, a diferencia de la aguja, tiene una longitud variable que puede alcanzar hasta 600 nm y solo se encuentra en los SST3 de patógenos A/E y de *Bordetella* spp. El filamento funciona como un adaptador entre la aguja y el **poro de translocación** (Crepin, Shaw et al., 2005, Knutton et al., 1998, Sekiya et al., 2001). El poro de translocación es un complejo proteico formado por la hetero-oligomerización de las proteínas hidrofóbicas: EspB y EspD. Este complejo forma un poro en la membrana del hospedero que permite la translocación directa de efectores al citoplasma de dicha célula (Ide, Laarmann et al., 2001).

Desde la base hasta la parte distal del SST3 se forma un canal interno de aproximadamente 2 nm de diámetro que conecta el citoplasma bacteriano con el citoplasma de la célula hospedera (canal de secreción) (Fujii, Cheung et al., 2012, Loquet, Sgourakis et al., 2012). El tamaño de este canal no permite la secreción de proteínas en su conformación nativa, es por ello que los sustratos de secreción deben ser parcialmente desnaturalizados antes de ser transportados a través del SST3 (Akedo & Galan, 2005).

Componentes citoplásmicos. El **complejo ATPasa** está formado por las proteínas EscN, EscL y EscO, todas ellas esenciales para el funcionamiento del SST3. EscN es la ATPasa que energiza el proceso de secreción, su actividad enzimática depende de su estado oligomérico, y es regulada por las proteínas EscL y EscO. EscL inhibe su actividad enzimática, por lo que se considera el regulador negativo. Por el contrario, EscO funciona como regulador positivo, estimulando la actividad de ATPasa de EscN (Andrade, Pardo et al., 2007, Romo-Castillo, Andrade et al., 2014).

El **anillo C** es una estructura anular citoplásmica que asocia a la base del SST3, está formado por la proteína EscQ y es esencial para el correcto funcionamiento del SST3. Adicionalmente, EscQ se asocia con otras proteínas (EscN, EscL y EscK), formando complejos de alto peso molecular. Por analogía con otros sistemas, el complejo EscQ-EscL-EscK se denomina **plataforma de clasificación**, y juega un papel importante en el establecimiento del orden de secreción de sustratos (Biemans-Oldehinkel, Sal-Man et al., 2011, Lara-Tejero, Kato et al., 2011, Soto, Espinosa et al., 2017). Juntos, el complejo ATPasa y el anillo C, funcionan como centro de clasificación de sustratos y energización de su secreción.

Biogénesis y funcionamiento del SST3.

La biogénesis del inyectisoma es un proceso secuencial que inicia con el ensamblaje Sec-dependiente de las proteínas que forman el aparato de exportación (EscRSTUV) y los anillos de membrana (EscC, EscD y EscJ). Posteriormente, el complejo ATPasa y el anillo C se asocian con la cara del

citoplásmica del cuerpo basal del inyectisoma, dando inicio a la fase de secreción dependiente del SST3 (Diepold, Amstutz et al., 2010, Wagner et al., 2010), a través de la cual se secretan los componentes estructurales del SST3 como el eje, la aguja, el filamento y el poro de translocación, así como los efectores (Figura 10).

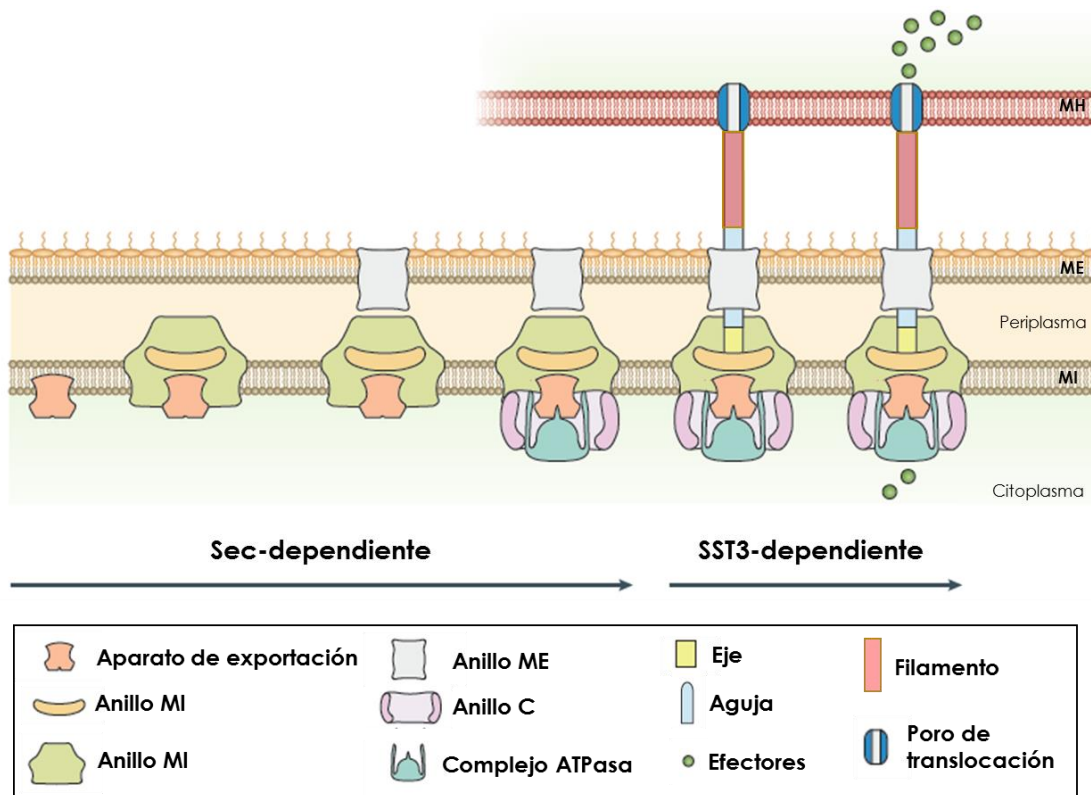


Figura 10. Diagrama del ensamblaje del SST3. El ensamblaje del inyectisoma ocurre en dos fases. Durante la fase Sec-dependiente se ensamblan todas las proteínas de membrana a través de la vía general de secreción, posteriormente se asocian los componentes citoplásmicos del sistema (complejo ATPasa y anillo C). En este punto se da inicio a la fase de secreción dependiente del SST3, a través de la cual se secretan los componentes estructurales del eje, la aguja, el filamento y el poro de translocación, lo cuales permiten la translocación directa de efectores a la célula hospedera. MI: membrana interna, ME: membrana externa, y MH: membrana del hospedero. Modificado de (Deng et al., 2017).

Reclutamiento y secreción de sustratos. Los sustratos del SST3 deben ser reconocidos y reclutados a la base del sistema antes de ser secretados de

manera ordenada. Debido, en parte, a la naturaleza dinámica de dicho proceso, aún se desconocen muchos detalles del mecanismo molecular, sin embargo a continuación abordaremos algunas generalidades.

Las proteínas secretadas a través del SST3 tienen una señal de secreción no procesable en los primeros 20 aminoácidos de su extremo N-terminal que los identifica como sustratos del sistema. Se trata de una región desordenada y poco conservada, pero enriquecida en ciertos aminoácidos como serina, treonina, isoleucina y prolina (Arnold, Brandmaier et al., 2009).

Otro de los requisitos para el reclutamiento de los sustratos a la base del inyectisoma es la interacción de estos con sus chaperonas. Las chaperonas se unen a los sustratos recién sintetizados en una región de aproximadamente 100 aminoácidos, río abajo de la señal de secreción (CBD: chaperone binding domain) y son clasificadas de acuerdo al sustrato que unen (Tabla 4). La principal función de las chaperonas es conferir estabilidad a sus sustratos y mantenerlos parcialmente plegados, en un estado competente para la secreción (Stebbins & Galan, 2001).

Tabla 4. Clasificación de las chaperonas de EPEC

Clase	Descripción	Chaperonas	Sustratos
Clase 1A	Se unen a un solo efector	CesL CesF	SepL EspF
Clase 1B	Une múltiples efectores	CesT	Tir, Map, NleA, NleF, NleH, NleH2, EspH, EspZ, EspF, NleG y EspG
Clase 2	Chaperonas de translocadores	CesD, CesD2 y CesAB	EspA, EspB y EspD

Clase 3	Se unen a la subunidad de la aguja	EscE y EscG	EscF
----------------	------------------------------------	-------------	------

Los complejos chaperona/sustrato son reclutados a la plataforma de clasificación, sin embargo, se ha propuesto que la función de las chaperonas va más allá del simple direccionamiento de sustratos a la base del SST3, y que la afinidad de estas por la plataforma de clasificación podría contribuir a la **jerarquía de secreción** (Lara-Tejero et al., 2011).

Energización de la secreción. Una vez que el complejo chaperona/sustrato llega a la base del SST3, la ATPasa del sistema libera a la chaperona del sustrato y este es desplegado para que ingrese al canal de secreción (Akedo & Galan, 2005). Adicionalmente, también se requiere de la fuerza protón motriz (PMF) y de las interacciones electrostáticas para la eficiente secreción de sustratos y su propulsión a través del inyectisoma naciente (Erhardt, Mertens et al., 2014, Rathinavelan, Zhang et al., 2010, Wilharm, Lehmann et al., 2004).

Regulación de la secreción de sustratos. A excepción del LEE1, cuya expresión se activa inmediatamente después de la inducción de la secreción, la expresión de los demás operones (LEE2-7) y las unidades transcripcionales individuales ocurre 70 minutos después de que se activa el sistema (Yerushalmi et al., 2014), esto significa que todos los sustratos dependientes del SST3 se encuentran presentes al mismo tiempo en el citoplasma, sin embargo, estos son secretados de manera ordenada. Los primeros sustratos en ser secretados son EscI y EscF (**sustratos tempranos**), las subunidades que forman el eje y la aguja, respectivamente.

Posteriormente, se secretan los translocadores o también denominados **sustratos intermedios**. Esta categoría comprende a las proteínas que forman el filamento (EspA) y el poro de translocación (EspB y EspD) y, finalmente se secretan, también de manera ordenada, las 22 proteínas de virulencia (efectores o **sustratos tardíos**) que son inyectadas a la célula hospedera (Buttner, 2012, Deng et al., 2017, Gaytan et al., 2016, Mills, Baruch et al., 2013).

La secreción ordenada de estas tres clases de sustratos está regulada por dos complejos proteicos, además de la plataforma de clasificación, denominados **interruptores moleculares**.

Interruptor molecular 1: de sustratos tempranos a sustratos intermedios.

La transición de sustratos tempranos a intermedios está regulada por las proteínas **EscP** y **EscU**. En EPEC, EscP se secreta de manera intermitente durante el ensamblaje la aguja (formada por EscF) y su interacción directa con EscF le permite medir la longitud de esta estructura. Se propone que cuando la aguja alcanza su longitud máxima (23 nm en EPEC), todos los subdominios de EscP hacen contacto con la estructura naciente, lo que causa una pausa en la secreción que permite la interacción entre EscP y EscU. Esta interacción promueve un cambio conformacional en EscU que modifica la especificidad de la secreción de sustratos tempranos a intermedios (Monjaras Feria, Garcia-Gomez et al., 2012).

Interruptor molecular 2: de sustratos intermedios a sustratos tardíos.

Para que los efectores sean inyectados directamente hacia el citoplasma de la célula hospedera, las proteínas que forman el poro de translocación (translocadores) se deben secretar antes que los efectores. Esta regulación está a cargo del complejo formado por las proteínas SepL, SepD y CesL (Deng, Li et al., 2005, Younis, Bingle et al., 2010).

SepL pertenece a la familia de proteínas denominadas "porteros", cuya función es promover la secreción de translocadores y al mismo tiempo, evitar la secreción prematura de efectores. SepL forma un complejo trimérico con las proteínas SepD y CesL (Younis et al., 2010). Al igual que SepL, SepD está involucrada directamente en la regulación de la secreción de sustratos, ya que la eliminación de los genes que codifican para cualquiera de las dos proteínas abate la secreción de translocadores y aumenta la secreción de efectores. En contraste, CesL es esencial para la secreción de toda clase de sustratos y, por homología de secuencia a proteínas chaperonas, se clasificó como una chaperona de clase 1 (Deng et al., 2005, Deng et al., 2004, O'Connell, Creasey et al., 2004, Portaliou, Tsolis et al., 2017, Wang, Roe et al., 2008, Younis et al., 2010).

El complejo SepL-SepD-CesL es homólogo a los complejos SsaL-SpiC-SsaM, YopN/TyeA-YscB-SycN, PopN/Pcr1-PscB-Pcr2, CopN-Scs4-Scs1 y EsaL-EsaB-EsaM, de la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) de *Salmonella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Chlamydia* y *Edwardsiella*, respectivamente (Tabla 5). Estos complejos proteicos coordinan la secreción ordenada de translocadores y efectores en sus respectivos

SST3 (Day & Plano, 1998, Liu, Nie et al., 2017, Silva-Herzog, Joseph et al., 2011, Yang, Shan et al., 2007, Yu, McGourty et al., 2010).

En EPEC se desconoce el mecanismo molecular a través del cual el complejo SepL-SepD-CesL regula la secreción de sustratos intermedios y tardíos, así como la señal fisiológica que desencadena dicho cambio en la especificidad de la secreción.

Tabla 5. Homólogos de las proteínas SepL, SepD y CesL

EPEC	SepL	SepD	CesL
<i>Salmonella</i> SPI-2	SsaL	SpiC	SsaM
<i>Edwardsiella</i>	EsaL	EsaB	EsaM
<i>Yersinia</i>	YopN-TyeA*	YscB	SycN
<i>Pseudomonas</i>	PopN-Pcr1*	PscB	Pcr2
<i>Chlamydia</i>	CopN	Scs4	Scs1

* El homólogo de SepL en *Yersinia* y *Pseudomonas* está formado por dos péptidos individuales que corresponden a su región amino y carboxilo terminal.

ANTECEDENTES

El complejo SepL-SepD-CesL regula la secreción de sustratos en EPEC.

Pese a que en estudios previos se demostró que la proteína CesL es esencial para la secreción de sustratos en *C. rodentium*, en el laboratorio, así como en un trabajo reciente, se observó que la eliminación del gen que codifica para CesL en EPEC abate la secreción de translocadores y aumenta la secreción de efectores, sugiriendo que CesL participa de manera activa en la regulación de la jerarquía de secreción de sustratos (Díaz-Guerrero M., no publicado (Portaliou et al., 2017)). Este fenotipo es idéntico al de las mutantes nulas en los genes que codifican para SepL y SepD (Figura 11).

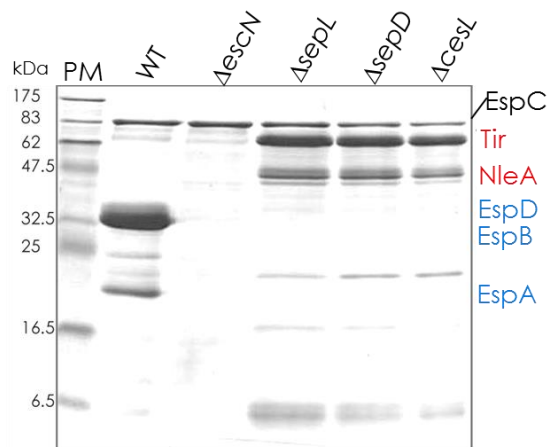


Figura 11. Perfil de proteínas secretadas por las mutantes nulas en los genes que codifican para SepL, SepD y CesL. Cuando EPEC se crece en medio DMEM, el SST3 se activa y secreta proteínas al medio de crecimiento. Las proteínas secretadas se precipitan y pueden ser resueltas y visualizadas en geles desnaturizantes teñidos con azul de Coomassie. En esta imagen se observa el perfil de proteínas secretadas por la cepa EPEC silvestre (WT), la cual secreta translocadores (EspA, EspB y EspD) y efectores, aunque estos últimos son secretados a niveles que no pueden ser detectados mediante esta técnica. La cepa EPEC $\Delta escN$ carece del gen que codifica para la ATPasa por lo cual no secreta ningún sustrato dependiente del SST3. Las mutantes nulas en los genes *sepL*, *sepD* y *cesL*, no secretan translocadores pero hipersecretan efectores (Tir y NleA). La banda que se observa en todos los carriles alrededor de los 83 kDa corresponde al autotransportador

EspC, el cual es secretado de manera independiente del SST3. PM: marcador de peso molecular.

La ausencia de calcio promueve un cambio en la secreción de sustratos.

En condiciones fisiológicas, EPEC se encuentra expuesta a altas concentraciones de calcio (1 mM en el medio extracelular del lumen intestinal), sin embargo, cuando el SST3 hace contacto con la célula hospedera y se inserta el poro de translocación en la membrana de esta, se detecta una reducción en la concentración de calcio (~100 nM al interior de la célula hospedera). En EPEC se demostró que la eliminación del calcio del medio de cultivo reduce la secreción de translocadores y aumenta la secreción de efectores (Figura 12), lo anterior llevó a proponer que la disminución de calcio que se detecta al hacer contacto con la célula hospedera podría ser la señal que detiene la exportación de las proteínas que forman el poro de translocación e induce la secreción de proteínas efectoras (Deng et al., 2005, Ide, Michgehl et al., 2003, Kenny et al., 1997a).

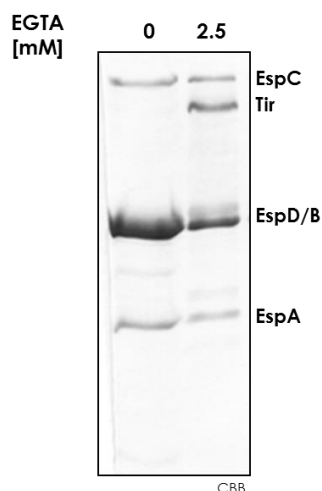


Figura 12. Perfil de proteínas secretadas por EPEC en medio DMEM normal o adicionado con 2.5 mM de EGTA, quelante de iones divalentes.

Adicionalmente, el hecho de que el fenotipo de secreción de EPEC WT en ausencia de calcio (Figura 12) sea similar al de las mutantes en *sepL*, *sepD* y *cesL*

(Figura 11), sugiere que esta señal ambiental podría regular la secreción de sustratos a través del complejo SepL-SepD-CesL.

Mecanismo de regulación de la secreción de translocadores y efectores.

En la mayoría de los SST3 la función regulatoria de las proteínas “portero” depende de su habilidad de desacoplarse de la base del SST3. Una vez que se recibe la señal de contacto celular y se promueve la salida de efectores estas proteínas pueden ser secretadas, como es el caso de YopN, PopN, CopN y MxiC (Archuleta & Spiller, 2014, Botteaux, Sory et al., 2009, Cheng, Kay et al., 2001, Cherradi, Schiavolin et al., 2013, Lee, Zmina et al., 2014) o degradadas como es el caso de SsaL (Yu et al., 2010). La proteína SepL posee una señal de secreción funcional en su extremo N-terminal que es capaz de promover la secreción de proteínas fusionadas a esta, sin embargo la proteína SepL completa no se secreta (Deng et al., 2005, Deng et al., 2004, Younis et al., 2010).

El complejo SsaL-SpiC-SsaM regula la jerarquía de secreción en respuesta a cambios en el pH. *Salmonella* es un patógeno intracelular que se replica en vacuolas ácidas. Bajo estas condiciones, el complejo SsaL-SpiC-SsaM se asocia a la base del SST3, permitiendo la secreción de translocadores, mientras bloquea la secreción de efectores (Figura 13A). Cuando se ensambla el poro de translocación en la membrana de la vacuola se detecta un incremento en el pH (ácido en la vacuola → neutro en el citoplasma), que en consecuencia causa la disociación del complejo SsaL-SpiC-SsaM y la degradación de sus componentes, permitiendo así la secreción de efectores (Figura 13B y C) (Yu et al., 2010).

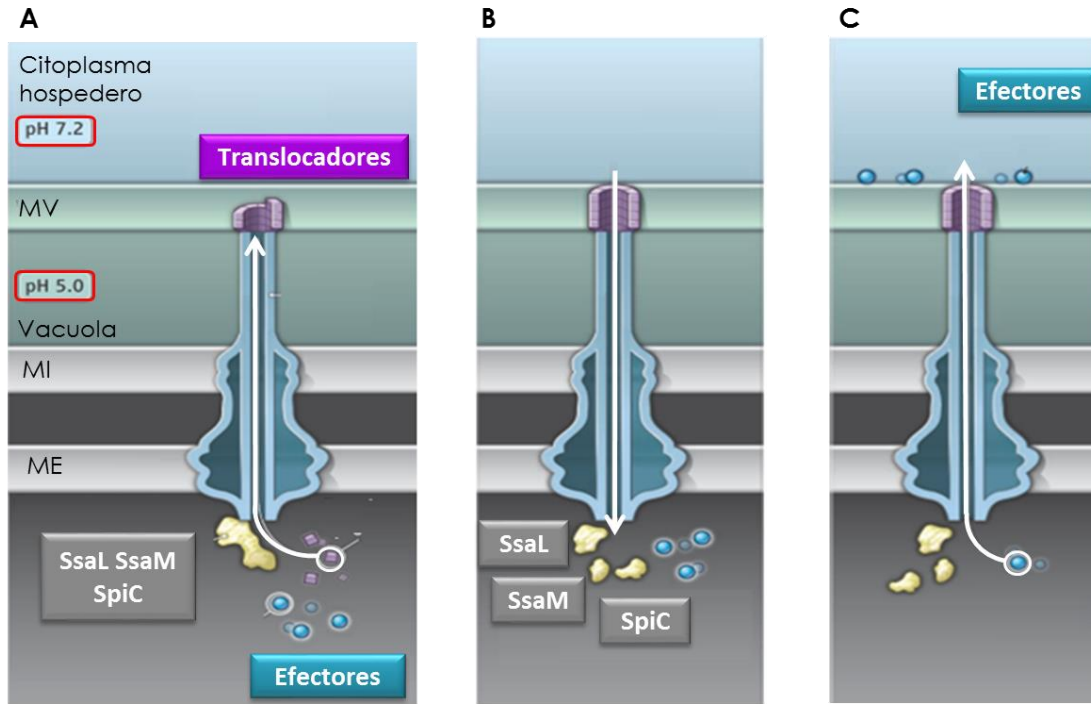


Figura 13. Esquema que muestra la regulación de la secreción por el complejo SsaL-SpiC-SsaM en *Salmonella* SPI-2. A) El complejo SsaL-SpiC-SsaM se asocia a la base del SST3 y permite la secreción de translocadores mientras que evita la de efectores cuando la bacteria se encuentra a pH 5, al interior de la vacuola. B) Cuando los translocadores forman un poro de translocación en la membrana de la vacuola (MV) se detecta un cambio en el pH, de 5 a 7.2, lo cual C) promueve la disociación del complejo SsaL-SpiC-SsaM, la degradación de sus componentes individuales y por consiguiente la secreción de efectores directamente al citoplasma de la célula hospedera. Modificado de (Yu et al., 2010).

En el laboratorio observamos que en ausencia de cualquiera de los componentes del complejo SepL-SepD-CesL, se disminuye la estabilidad de las otras proteínas que conforman el complejo (Díaz-Guerrero M., no publicado). Por todo lo anterior nos propusimos investigar si el complejo SepL-SepD-CesL regula la secreción de sustratos a través de un mecanismo molecular similar al empleado por el complejo SsaL-SpiC-SsaM del SST3 de la SPI-2 de *Salmonella*.

HIPÓTESIS

El complejo SepL/SepD/CesL regula la secreción de translocadores y efectores en respuesta a variaciones en la concentración de calcio a través de la interacción dinámica con otras proteínas del SST3.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Caracterizar el mecanismo molecular a través del cual el complejo SepL-SepD-CesL regula la secreción de sustratos a través del SST3.

Objetivos particulares.

- Determinar el efecto directo e indirecto del calcio en la formación del complejo SepL-SepD-CesL.
- Evaluar la estabilidad y localización celular de los componentes del complejo regulador SepL-SepD-CesL en respuesta a cambios en la concentración de calcio.
- Identificar blancos de unión de SepL en el SST3.
- Evaluar si las interacciones proteicas entre SepL y otros componentes del SST3 son dependientes de calcio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 6. La inducción del crecimiento bacteriano se realizó en medio LB (Lysogeny Broth) a 37°C con agitación constante (250 rpm). El medio de crecimiento se adicionó con los siguientes antibióticos, cuando fue requerido: estreptomicina (Sm, 25 µg/mL), kanamicina (Km, 50 µg/mL), ampicilina (Ap, 100 µg/mL), cloranfenicol (Cm, 25 µg/mL) o tetraciclina (Tc, 25 µg/mL).

Tabla 6. Cepas bacterianas empleadas.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
EPEC WT	EPEC E2348/69 O127:H6, Sm ^r	(Levine, Bergquist et al., 1978)
ΔescN	EPEC E2348/69 con eliminación en fase del gen escN; Sm ^r	(Gauthier et al., 2003)
ΔespA	EPEC E2348/69 con eliminación en fase del gen espA; Sm ^r Km ^r	Donación del Dr. Navarro F.
ΔespB	EPEC E2348/69 con eliminación en fase del gen espB; Sm ^r Km ^r	Donación del Dr. Xicohtencatl J.
ΔespD	EPEC E2348/69 con eliminación en fase del gen espD; Sm ^r Km ^r	Donación del Dr. Xicohtencatl J.
ΔsepL	EPEC E2348/69 con eliminación en fase del gen sepL; Sm ^r	Donación del Dr. Puente JL
ΔescU	EPEC E2348/69 con eliminación en fase del gen escU; Sm ^r Km ^r	(Soto et al., 2017)
ΔescF	EPEC E2348/69 con eliminación en fase del gen escF; Sm ^r Km ^r	Monjarás-Feria J. Tesis de doctorado 2013.
ΔescI	EPEC E2348/69 con eliminación en fase del gen escI; Sm ^r Km ^r	Monjarás-Feria J. Tesis de doctorado 2013.

JPEP39 (Δ grlR)	EPEC E2348/69 con eliminación en fase del gen <i>grlR</i> ; Sm ^r	(Garcia-Angulo, Martinez-Santos et al., 2012)
<i>sepL</i> -3Flag::km	EPEC E2348/69 que expresa al gen <i>sepL</i> fusionado a una etiqueta de 3-Flag; Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
<i>sepL</i> -3Flag	EPEC E2348/69 que expresa al gen <i>sepL</i> fusionado a una etiqueta de 3-Flag; Sm ^r	Este trabajo
<i>cesL</i> -2HA::km	EPEC E2348/69 que expresa al gen <i>cesL</i> fusionado a una etiqueta de 2-HA; Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
<i>cesL</i> -6His::km	EPEC E2348/69 que expresa al gen <i>cesL</i> fusionado a una etiqueta de 6-His; Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
<i>sepD</i> -2HA::km	EPEC E2348/69 que expresa al gen <i>sepD</i> fusionado a una etiqueta de 2-HA; Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
<i>sepD</i> -2HA	EPEC E2348/69 que expresa al gen <i>sepD</i> fusionado a una etiqueta de 2-HA; Sm ^r	Este trabajo
<i>sepL</i> -3Flag <i>cesL</i> -2HA::km	EPEC E2348/69 que expresa al gen <i>sepL</i> fusionado a una etiqueta de 3-Flag y al gen <i>cesL</i> fusionado a 2-HA; Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
BL21 (DE3)/pLysS	Cepa empleada para la expresión de construcciones basadas en el vector pET19b; Cm ^r	Novagen
XL1-Blue	Cepa para clonación; Tc ^r	Stratagene
M15 (pREP4)	Cepa empleada para la expresión de construcciones basadas en el vector pQE30; Km ^r	Qiagen
Salmonella		
JR501	Cepa para hacer plásmidos compatibles con <i>Salmonella</i> .	(Ryu & Hartin, 1990)
SJW1368	Cepa para expresión de construcciones basadas en el vector pTrc99A_FF4.	(Ohnishi, Ohto et al., 1994)

Manipulación de DNA y clonación de genes.

Los plásmidos y oligonucleótidos empleados en este trabajo se enlistan en la Tabla 7. La amplificación de genes se llevó a cabo mediante la técnica de PCR (polymerase chain reaction), a partir de DNA cromosomal obtenido de la cepa EPEC E2348/69 (EPEC WT), usando los pares de oligonucleótidos apropiados. Para la construcción del plásmido pMATpL Δ C11, el gen *sepL* sin los últimos 11 codones se subclonó a partir de la construcción pJTpL Δ C11 en los sitios NdeI/BamHI del

vector pACTrc. Todas las construcciones generadas o empleadas en este trabajo se secuenciaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Tabla 7. Plásmidos y oligonucleótidos empleados.

Plásmidos	Descripción	Referencia
pTrc99A_FF4	Vector de expresión bajo el control del promotor trc; Ap ^r	(Ohnishi, Fan et al., 1997)
pET19b	Vector de expresión bajo el control del promotor T7; Ap ^r	Novagen
pACTrc	Vector de expresión bajo el control del promotor trc; Cm ^r	Donación de la Dra. G.M. Fraser
pKD46	Vector termosensible que codifica para el sistema de recombinación del fago λ, bajo el control del promotor araB; Ap ^r	(Datsenko & Wanner, 2000)
pSUB11	Plásmido empleado como templado para la amplificación del casete de kanamicina fusionado a la etiqueta de 3-Flag; Ap ^r , Km ^r	(Uzzau, Figueroa-Bossi et al., 2001)
pSU315	Plásmido empleado como templado para la amplificación del casete de kanamicina fusionado a la etiqueta de HA; Ap ^r , Km ^r	(Uzzau et al., 2001)
pSUB7	Plásmido empleado como templado para la amplificación del casete de kanamicina fusionado a la etiqueta de 6-His; Ap ^r , Km ^r	(Uzzau et al., 2001)
pFLP2	Vector de expresión de la recombinasa Flp; Ap ^r	(Hoang, Karkhoff-Schweizer et al., 1998)
pMTpL	<i>sepL</i> clonada en pTrc99A_FF4	Gaytán-Enríquez M. Tesis de licenciatura, 2011.
pJTpL Nt	<i>sepL</i> sin los codones 277 a 351 clonada en pTrc99A_FF4	Benítez-García M. No publicado
pJTpL Δ319-334	<i>sepL</i> sin los codones 319 a 334 clonada en pTrc99A_FF4	Benítez-García M. No publicado
pJTpL ΔC11	<i>sepL</i> sin los codones 341 a 351 clonada en pTrc99A_FF4	Benítez-García M. No publicado
pKEeVc	codones 335 a 675 de <i>escV</i> clonados en pET19b	Mojica-Ávila K. Tesis de licenciatura, 2015.
pATHeN	<i>his-escN</i> clonada en pTrc99A_FF0	(Andrade et al., 2007)
pNEescO	<i>escO</i> clonada en pET19b	(Romo-Castillo et al., 2014)

pAQescL Δ 89	escL sin los primeros 89 codones clonada en pQE30	(Romo-Castillo et al., 2014)
pJEel	escL clonada en pET19b	(Monjaras Feria et al., 2012)
pAEo4	escK clonada en pET19b	(Soto et al., 2017)
pSTHAeQ	escQ clonada en pTrcHisA	Soto E. No publicado
pKEeD _N	codones 1 a 120 de escD clonados en pET19b	Mojica-Ávila K. Tesis de licenciatura, 2015.
pSLo4	escK clonada en pMAL-c2x	(Soto et al., 2017)
pJHeH	espH con su sitio de unión a ribosoma nativo clonado en pTOPO-2HA	(Monjaras Feria et al., 2012)
pJHnC	nleC con su sitio de unión a ribosoma nativo clonado en pTOPO-2HA	(Monjaras Feria et al., 2012)
pJHeI	escI con su sitio de unión a ribosoma nativo clonado en pTOPO-2HA	(Monjaras Feria et al., 2012)
pJHnH2	nleH2 con su sitio de unión a ribosoma nativo clonado en pTOPO-2HA	(Monjaras Feria et al., 2012)
pSTel	escI clonado en pTrc99A_FF4	Soto E. No publicado
pATpD	sepD clonado en pTrc99A_FF4	Castañeda A. No publicado
pMTcL	cesL clonado en pTrc99A_FF4	Díaz-Guerrero M. No publicado
pMEcL	cesL clonado en pET19b	Díaz-Guerrero M. No publicado
pMTBISpDcL	sepD y his-cesL clonado en pTrc99A_FF4	Díaz-Guerrero M. No publicado
pMATpL	sepL clonado en pACTrc	Díaz-Guerrero M. No publicado
pMATpL Δ C11	sepL sin los codones 341 a 351 clonado en pACTrc	Este trabajo

Oligonucleótidos	Secuencia 5' – 3'
sepL-3Flag_Fw	ATACATTATAATGATTGGTAAAGTGATAGATTATAAGGAGGATGTTATGGACTACAAAG ACCATGACGG
sepL-3Flag_Rv	CCTCTTCATAATCTTTCTTAGCATGACAAAACTATAAAAAAACAATAATGAATATCC TCCTAGTTC
cesL-2HA_Fw	CTTTCAACAGCATGTGCAGATTATTGAGCGGTTCCGAGGATGACATCATATCCGTA TGATGTGCCGGACTATGCGTATCCGATGATGTTCTGAT
cesL-6His_Fw	GAATACTTTCAACAGCATGTGCAGATTATTGAGCGGTTCCGAGGATGACATCACA CCACCATCATCACCATTAG
cesL-6His_Rv	AAGATCGTGATATGACTCTGCTTTTTAAATATATTTAAGAGTTTATTCATATGAATATCCTC CTTAGTTC
sepD-2HA_Fw	ATACAATGATGCCGCAACACACTGTTTTCTGATATAGGACGAATTGTGTATCCGAT GATGTGCCGGACTATGCGTATCCGATGATGTTCTGAT
sepD-2HA_Rv	GCACTGCAGCAAAATAGTGCTGTAAAAATAAAAAAACAATTTTTTTCATATGAATATCCT CCTTAGTTC

Etiquetado de genes en cromosoma.

La incorporación de la secuencia codificante para la etiqueta de 3-Flag, 2-HA Y 6-His al extremo 3' de los genes *sepL*, *sepD* y *cesL* (EPEC *sepL*-3Flag::*km*, EPEC *sepD*-2HA::*km*, EPEC *cesL*-6His::*km* y EPEC *cesL*-2HA::*km*) se realizó mediante recombinación homóloga, empleando el sistema Red del fago λ (Uzzau et al., 2001). El casete de resistencia a kanamicina, conteniendo la secuencia codificante de 3-Flag, HA o 6-His se amplificó a partir de los vectores pSUB11, pSU315 y pSUB7, respetivamente, con los siguientes pares de oligonucleótidos: *sepL*-3Flag_Fw/*sepL*-3Flag_Rv, *sepD*-2HA_Fw/*sepD*-2HA_Rv, *cesL*-2HA_Fw/*cesL*-6His_Rv y *cesL*-6His_Fw/*cesL*-6His_Rv. Los productos de PCR se electroporaron en una cepa de EPEC WT que había sido previamente transformada con el plásmido pKD46, a partir del cual se induce la expresión de la recombinasa Red. La selección de cepas recombinantes se realizó en placas de LB adicionadas con 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Km, adicionalmente, la eliminación del plásmido pKD46 se corroboró al evaluar la sensibilidad de las colonias obtenidas a ampicilina. Para generar la cepa EPEC *sepL*-3Flag *cesL*-2HA::*km*, el casete de resistencia a kanamicina de la cepa EPEC *sepL*-3Flag::*km* se eliminó usando el plásmido pFLP2 (Hoang et al., 1998), sobre esta cepa se electroporó el casete de resistencia a kanamicina amplificado a partir de pSU315 con los oligonucleótidos *cesL*-2HA_Fw/*cesL*-6His_Rv y se llevó a cabo otro evento de recombinación.

Ensayo de secreción.

La secreción de sustratos a través del SST3 de EPEC se indujo creciendo a la bacteria en medio DMEM regular (Dulbecco's modified Eagle's médium, Gibco,

12100-046) a 37°C en condiciones estáticas en presencia de 5% de CO₂. Al alcanzar una densidad óptica a 600nm (DO₆₀₀) de 0.8-1, se colectó y centrifugó el cultivo a 19,800 x g por 10 minutos con el fin de separar las proteínas secretadas al medio (sobrenadante) de la pastilla celular. Las proteínas secretadas se precipitaron por 12 h a 4°C con 10% de ácido tricloroacético (TCA) y posteriormente, se colectaron mediante centrifugación a 19,800 x g por 30 minutos. La pastilla de proteínas se resuspendió en amortiguador de carga de geles desnaturizantes, normalizando el volumen empleado de acuerdo a la DO₆₀₀ del cultivo; el TCA remanente se neutralizó adicionando Tris saturado. El perfil de proteínas secretadas se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) e inmunodetección.

Para evaluar el efecto de la eliminación del calcio en el perfil de proteínas secretadas por EPEC, los ensayos de secreción se realizaron en DMEM sin calcio (Gibco, 21068-028).

Inmunodetección.

Las proteínas sometidas a SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF (polyvinylidene fluoride). Las membranas se incubaron durante 12h a 4°C con Tris-amortiguador salino (TBS; 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) adicionado con Tween 20 al 0.1 % (v/v) (TBS-Tween) y leche descremada en polvo al 5 % (w/v). Se lavaron con TBS-Tween y posteriormente se incubaron con los anticuerpos adecuados (Policlonales generados en conejo: anti-Tir, anti-Map,

anti-EspA, anti-EscJ, anti-EspD, anti-SepD, anti-SepL, anti-EspF o anti-EscI. Monoclonales: anti-DnaK, anti-MBP, anti-His, anti-Flag o anti-HA acoplado a la peroxidasa de rábano [HRP]). Las membranas se lavaron con TBS-Tween para eliminar el exceso de anticuerpo primario, posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a HRP que reconocen a las IgG's de conejo (GAR: goat anti-rabbit) o ratón (GAM: goat anti-mouse). Finalmente, la detección de proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia.

Producción de proteínas recombinantes.

La cepa *Salmonella* SJW1368 se transformó con los plásmidos basados en el vector pTrc99A_FF4, mientras que las cepas *E. coli* M15 (pREP4) y BL21 (DE3)/pLysS (BDP) se usaron como cepas de expresión para los plásmidos generados a partir de los vectores pQE30 y pET19b, respectivamente. Se inició el crecimiento bacteriano en medio LB con los antibióticos adecuados a 37°C con agitación constante. Una vez alcanzada una DO₆₀₀ de 0.8 se agregó isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a los cultivos para inducir la producción de proteínas. El crecimiento bacteriano se continuó como se indica en la Tabla 8. Las células bacterianas se cosecharon por centrifugación a 15,500 x g por 10 minutos.

Tabla 8. Condiciones de expresión de proteínas recombinantes

Proteína(s)	Plásmido	Cepa	Vol. de cultivo	[] de IPTG	Temperatura	Tiempo
His-EscN	pATHescN	SJW1368	400 mL	0.1 mM	30 °C	4 h
His-EscO	pNEescO	BDP	600 mL	0.3 mM	25 °C	4 h
His-EscL Δ89	pAQescL Δ89	M15	400 mL	0.3 mM	25 °C	4 h
His-EscI	pJEel	BDP	600 mL	0.3 mM	20 °C	12 h
His-EscVc	pKEeVc	BDP	100 mL	0.1 mM	30 °C	4 h

His-EscDN	pKEeDN	BDP	200 mL	0.1 mM	30 °C	4 h
His-EscK	pSEo4	BDP	300 mL	0.3 mM	25 °C	4 h
His-EscQ	pSTHAeQ	SJW1368	300 mL	0.3 mM	25 °C	4 h
MBP-EscK	pSLo4	BDP	300 mL	0.1 mM	30 °C	4 h
SepL WT	pMTpL	SJW1368	50 mL	0.1 mM	30 °C	4 h
SepLΔC75	pJTpL Δ C75	SJW1368	400 mL	0.1 mM	30 °C	4 h
SepLΔ319-334	pJTpL Δ 319-334	SJW1368	400 mL	0.1 mM	30 °C	4 h
SepLΔC11	pJTpL Δ C11	SJW1368	400 mL	0.1 mM	30 °C	4 h
SepL WT/ SepD/CesL	pMTBISpDcL + pMATpL WT	SJW1368	100 mL	0.1 mM	30 °C	4 h
SepL ΔC11/ SepD/CesL	pMTBISpDcL + pMATpL Δ C11	SJW1368	100 mL	0.1 mM	30 °C	4 h

Ensayos de co-purificación por cromatografía de afinidad por níquel.

Las pastillas celulares se resuspendieron en 1/10 del volumen del cultivo de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8 y NaCl 0.5 M) adicionado con imidazol 20 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.1 mM. Las células se rompieron mediante sonicación y se centrifugaron a 15,500 x g por 30 minutos para separar las proteínas solubles (lisado) de los restos celulares.

Co-purificación de SepL con His-EscN, His-EscO, His-EscL Δ 89, His-EscI y His-EscVc.

El lisado celular de las proteínas recombinantes His-EscN, His-EscO, His-EscL Δ 89, His-EscI o His-EscVc se mezcló con el lisado de SepL y se incubó durante 2 h en agitación a 4°C. A la par, se empacaron 100 μ L de resina de agarosa Ni-NTA (nickel nitrilotriacetic acid) en una columna y se equilibró con amortiguador de lisis adicionado con 20 mM de imidazol. La mezcla de lisados se cargó en la columna con resina Ni-NTA pre-equilibrada y esta se lavó extensivamente con amortiguador de lisis adicionado con concentraciones crecientes de imidazol

(Tabla 9). Las proteínas unidas a las resina se eluyeron con amortiguador de lisis adicionado con 500 mM de imidazol.

Tabla 9. Condiciones de lavado de las copurificaciones con SepL

Proteína(s)	Lavado 1	Lavado 2	Lavado 3
	Vol. – [] Imidazol	Vol. – [] Imidazol	Vol. – [] Imidazol
His-EscN	50 mL – 20 mM	40 mL – 60 mM	30 mL – 80 mM
His-EscO	50 mL – 40 mM	30 mL – 80 mM	30 mL – 80 mM
His-EscL Δ89	40 mL – 20 mM	60 mL – 40 mM	30 mL – 60 mM
His-EscI	40 mL – 60 mM	40 mL – 80 mM	40 mL – 95 mM
His-EscVc	100 mL – 20 mM	50 mL – 30 mM	20 mL – 40 mM

Co-purificación de His-EscVc con SepL WT, SepL Δ C75, SepL Δ 319-334 y SepL Δ C11.

El lisado celular de la proteína recombinante His-EscVc se mezcló con el lisado de las proteínas SepL WT, SepL Δ C75, SepL Δ 319-334 o SepL Δ C11 y se incubó durante 2 h en agitación a 4°C. A la par, se empacaron 100 μ L de resina de agarosa Ni-NTA (nickel nitrilotriacetic acid) en una columna y se equilibró con amortiguador de lisis adicionado con 20 mM de imidazol. La mezcla de lisados se cargó en la columna con resina Ni-NTA pre-equilibrada y esta se lavó extensivamente con amortiguador de lisis adicionado con 20, 30 y 40 mM de imidazol. Las proteínas unidas a las resina se eluyeron con amortiguador de lisis adicionado con 500 mM de imidazol.

Co-purificación del complejo SepL-SepD-His-CesL. Las células *Salmonella* SJW1368 se co-transformaron con los plásmidos pMTBISpDcL y pMATpL o pMATpL Δ C11. El lisado celular se incubó con 100 μ L de resina de Ni-NTA por 2 h a 4°C y posteriormente se cargó en una columna. Se lavó de manera extensiva con

concentraciones crecientes de imidazol y finalmente, las proteínas se eluyeron con 500 mM de imidazol.

Para evaluar el efecto directo del calcio en las interacciones, se agregó CaCl_2 a una concentración final de 2 mM a todos los amortiguadores empleados en los ensayos de co-purificación.

Co-purificación de His-EscVc, His-EscD_N, His-EscQ, His-EscK y His-EscL Δ 89 con proteínas secretadas. Se indujo la secreción de proteínas en medio DMEM de las cepas EPEC Δ sepL y Δ grlR. El sobrenadante del ensayo de secreción se recuperó después de centrifugar los cultivos bacterianos y se guardó a 4°C hasta su uso.

El lisado de las proteínas recombinantes His-EscVc, His-EscD_N, His-EscQ, His-EscK o His-EscL Δ 89 se mezcló e incubó con 100 μ L de resina de Ni-NTA por 2 h a 4°C. La mezcla se cargó en una columna y se lavó con amortiguador de lisis con 20 mM de imidazol para eliminar a las proteínas no unidas a la resina. Se agregó el sobrenadante de los ensayos de secreción de EPEC Δ sepL y Δ grlR, se dejaron eluir las proteínas no unidas, se lavó la resina con concentraciones crecientes de imidazol y finalmente se eluyeron las proteínas con 500 mM de imidazol.

Fraccionamiento celular.

El fraccionamiento celular se realizó siguiendo el protocolo descrito por Gauthier *et al.*, con pequeñas modificaciones (Gauthier *et al.*, 2003). La cepa EPEC *sepL-3Flag cesL-2HA::km* se creció en DMEM regular o DMEM sin calcio, bajo

condiciones de inducción del SST3, hasta alcanzar una DO_{600} de 1. Las células se colectaron por centrifugación ($15,500 \times g$ por 10 minutos) y la pastilla celular se lavó con amortiguador fosfato salino (PBS). Posteriormente la pastilla celular se resuspendió con Tris 20 mM pH 7.5 adicionado con PMSF 1 mM. Las células se rompieron por sonicación y se centrifugaron a $19,800 \times g$ por 10 minutos para eliminar a las células intactas. El lisado celular se ultracentrifugó a $90,000 \times g$ por 1h. El sobrenadante (que contiene las proteínas citoplásmicas) se colectó y se sometió a un paso más de ultracentrifugación. Por su parte, la pastilla que contiene a las proteínas membranales se lavó con con Tris 20 mM pH 7.5, se ultracentrifugó nuevamente a $90,000 \times g$ por 1h y finalmente se resuspendió en amortiguador Tris 20 mM pH 7.5. La concentración de proteínas de las muestras obtenidas se cuantificó mediante el estuche comercial DC protein assay (Bio-Rad).

Ensayos de estabilidad de proteínas.

La cepa EPEC *sepL-3Flag cesL-2HA::km* se creció en DMEM sin calcio adicionado con 1.8 mM de $CaCl_2$ a $37^\circ C$ en condiciones estáticas en presencia de 5% de CO_2 . Al alcanzar una DO_{600} de 1, las células se colectaron por centrifugación a $4,600 \times g$ por 10 minutos, se lavaron y resuspendieron en DMEM sin calcio o adicionado con 1.8 mM de $CaCl_2$. Para inhibir la síntesis de proteínas se agregó Cm a una concentración final de $50 \mu g/mL$. El crecimiento bacteriano se continuó por 3 h más y se tomaron muestras cada 30 minutos. Las muestras se normalizaron de acuerdo a la DO_{600} y se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetección.

Co-inmunoprecipitación.

Las cepas EPEC *sepL-3Flag cesL-2HA::km* y EPEC *cesL-2HA::km* se crecieron bajo condiciones de inducción de la secreción, en medio DMEM sin calcio o adicionado con 1.8 mM de CaCl₂ hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1. Las células se colectaron mediante centrifugación y las pastillas celulares se lavaron y resuspendieron con el siguiente amortiguador: HEPES 20 mM, NaCl 250 mM pH 7.4. Las células se rompieron por sonicación, el lisado celular se incubó con Triton X-100 [0.1% (v/v)] por 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 19,800 x g por 30 minutos. Se colectó el sobrenadante y se le agregó el entrecruzador DTSP (ditiobis succinimidil propionato) a una concentración final de 1 mM, la mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción se detuvo adicionando Tris pH 7.5 a una concentración final de 20 mM. Las muestras se mezclaron con 40 µL de perlas de agarosa acopladas a anticuerpo contra Flag (ANTI-Flag M2 Affinity Gel beads, SIGMA) y se incubaron por 12 h a 4°C en agitación constante, para acoplar a la proteína SepL-3Flag a las perlas. Las perlas acopladas se centrifugaron a 13,500 x g por 2 minutos y se lavaron tres veces con HEPES 20 mM, NaCl 250 mM pH 7.4. Finalmente, las perlas se resuspendieron en 20 µL de amortiguador de carga adicionado con 2 µL de β-mercaptoetanol. Las muestras generadas se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetección.

RESULTADOS

Efecto del calcio en la secreción por EPEC.

En trabajos previos se demostró que el calcio juega un papel importante en la regulación de la secreción de sustratos a través del SST3 en distintas especies bacterianas (Jamison and Hackstadt, 2008, Deng et al., 2005, Ide et al., 2003, Shaulov et al., 2017, Sarty et al., 2012, Gode-Potratz et al., 2010, Cisz et al., 2008, Michiels et al., 1990, Kim et al., 2005). Para evaluar el efecto de la ausencia de calcio en la secreción de sustratos tempranos, intermedios y tardíos, se realizó un ensayo de secreción en medio DMEM regular (que contiene 1.8 mM de CaCl_2), DMEM sin calcio y DMEM sin calcio adicionado con 1.8 mM de CaCl_2 empleando la cepa EPEC E2348/69 (WT) sola (Figura 14A) o transformada con los genes que codifican para los efectores EspH, NleH2 y NleC así como la subunidad del eje Escl (Figura 14B), clonados en el vector pTOPO-2HA, el cual fusiona dos etiquetas de hemaglutinina (HA).

Observamos que la eliminación de calcio del medio de cultivo promueve un incremento en la secreción de los efectores Tir, Map, EspH-2HA, NleH2-2HA y NleC-2HA (Figura 14A y 14B). Este efecto se debe exclusivamente a la ausencia de calcio, ya que al suplementar el DMEM sin calcio con 1.8 mM de CaCl_2 , la secreción de efectores se redujo a niveles similares a los observados en DMEM regular. Adicionalmente, demostramos que el efecto del calcio solo ocurre a nivel de la secreción de proteínas, ya que la producción de los sustratos analizados no

se alteró bajo ninguna condición de crecimiento (Figura 14A, panel inferior y Figura 14B, panel derecho). Como control se muestra el perfil de proteínas secretadas por una mutante nula en el gen *sepL*, la cual desregula completamente la secreción de efectores y translocadores y el de una mutante nula en el gen *escU*, componente del aparato de exportación que es esencial para la secreción (Figura 14A).

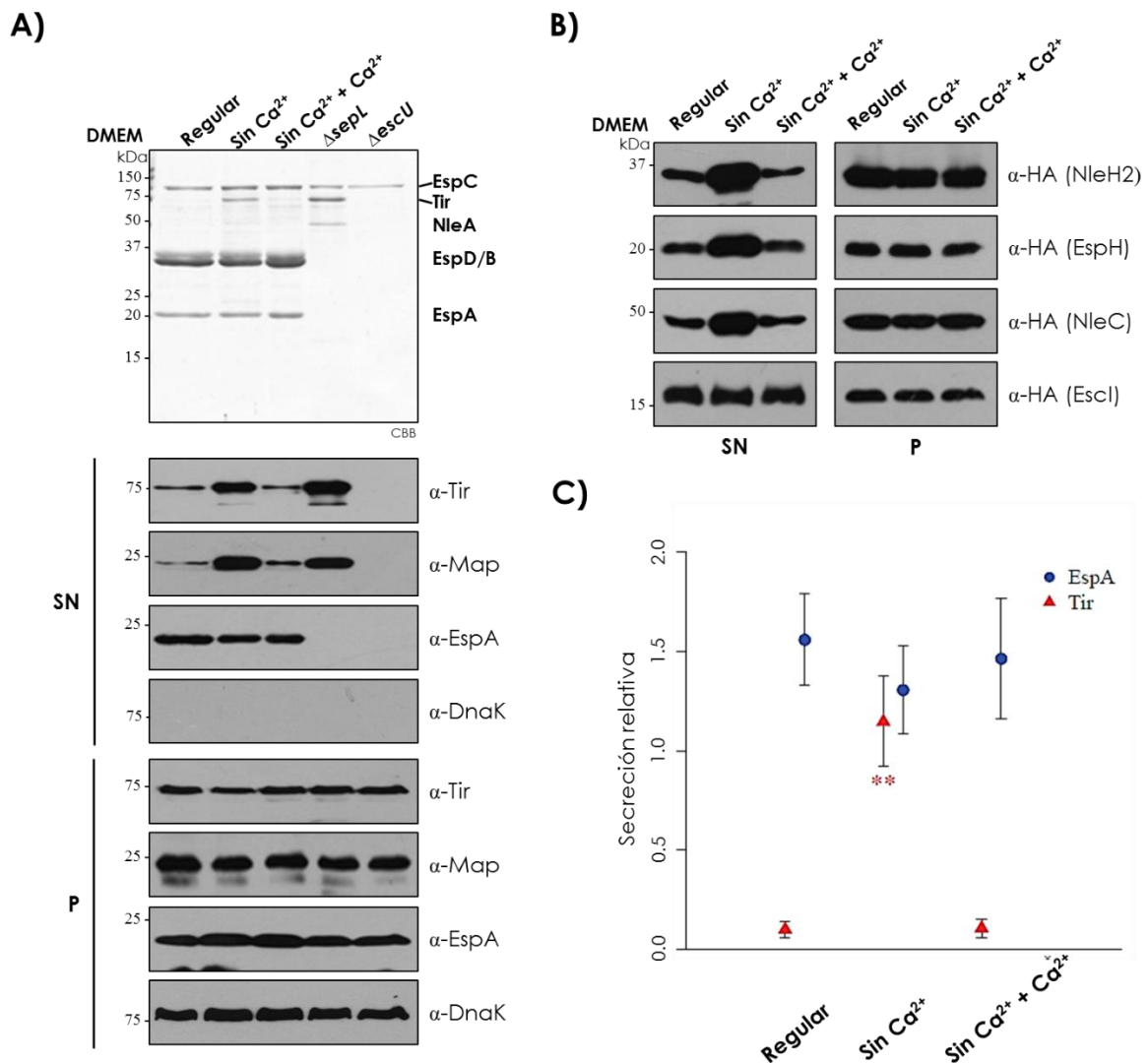


Figura 14. La eliminación de calcio del medio de cultivo incrementa la secreción de efectores en EPEC. A) Perfil de proteínas secretadas por EPEC WT en DMEM regular (Regular, 1.8 mM de CaCl₂), DMEM sin calcio (Sin Ca²⁺) y DMEM sin calcio adicionado con 1.8 mM de CaCl₂ (Sin Ca²⁺ + Ca²⁺) y fenotipo de secreción de EPEC Δ *sepL* y Δ *escU* en DMEM regular. Las proteínas secretadas al sobrenadante (SN) se analizaron mediante SDS-

PAGE teñido con azul de Coomassie (CBB) e inmunodetección empleando anticuerpos específicos contra Tir, Map y EspA. También se evaluó la producción de proteínas (P) mediante inmunodetección empleando los mismos anticuerpos. Como control de lisis y de carga, se evaluó la presencia de DnaK en sobrenadantes (SN) y pastilla celulares (P), respectivamente. B) Secreción (SN) y producción (P) de NleH2-2HA, EspH-2HA, NleC-2HA y Escl-2HA en DMEM regular, DMEM sin calcio y DMEM sin calcio adicionado con 1.8 mM de CaCl₂ analizados mediante inmunodetección de la etiqueta de 2HA. C) La abundancia relativa de EspA y Tir en el sobrenadante de EPEC WT crecida en la presencia y ausencia de calcio, como se describió en el inciso A. Se muestra el promedio y desviación estándar de 6 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco. Un valor $p < 0.05$ se consideró significativo. ** $p = 0.002$, Wilcoxon-test.

Reportes previos indicaban que la secreción de translocadores disminuye en ausencia de calcio (Deng et al., 2005, Ide et al., 2003). Sin embargo, en este trabajo no observamos una reducción significativa de la secreción de EspA en DMEM sin calcio (Figura 14A). Con el fin de tener una medida cuantitativa del cambio en la secreción de efectores y translocadores en presencia y ausencia de calcio, realizamos un análisis estadístico de los datos obtenidos de seis experimentos independientes, en los cuales cuantificamos la intensidad de las bandas de las proteínas Tir, EspA y EspC teñidas con azul de Coomassie. Los valores de Tir y EspA se normalizaron con los del autotransportador EspC, el cual se secreta de manera independiente del SST3 (Mellies, Navarro-Garcia et al., 2001, Stein, Kenny et al., 1996) y sirve como control de carga. Como se observa en la Figura 14C, aunque la secreción de EspA tiende a reducirse en ausencia de calcio, el cambio en la secreción no es significativo. Por otro lado, la secreción de Tir aumenta 11 veces en ausencia de calcio (Figura 14C).

Finalmente, también demostramos que la presencia o ausencia de calcio en el medio de cultivo no afecta la secreción del sustrato temprano Escl-2HA (Figura 14B). Sin embargo, observamos que la sobreexpresión de Escl-2HA causa una

reducción de la secreción en general (Figura 15A, panel superior), lo que nos llevó a pensar que el hecho de que el calcio no afecte la secreción de Escl-2HA podría deberse a que su sobreexpresión causa una reducción en la secreción. Para esclarecer el papel del calcio en la secreción de Escl evaluamos la secreción de Escl-2HA, Tir y EspA en presencia y ausencia de calcio empleando la cepa EPEC WT transformada con Escl-2HA (EPEC WT/Escl-2HA). Como se observa en la Figura 15A, la cepa EPEC WT/Escl-2HA sigue siendo sensible a cambios en la concentración de calcio, ya que la eliminación de este ion del medio de cultivo aumentó la secreción de Tir, pero no tuvo efecto sobre la secreción de EspA y Escl-2HA. Lo anterior es consistente con los datos obtenidos anteriormente, en donde demostramos que el calcio solo afecta la secreción de proteínas efectoras, por lo que podemos concluir que el calcio no tiene un efecto sobre la secreción de la proteína del eje, Escl. Como control adicional, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de Escl sin etiqueta en el perfil de proteínas secretadas por EPEC WT. Observamos que, a diferencia de Escl-2HA, la sobreexpresión de Escl sin etiqueta no afecta la secreción de EPEC WT (Figura 15B), lo cual sugiere que es la fusión de 2HA en el C-terminal de Escl lo que afecta la secreción y no la sobreexpresión de la proteína del eje. Por otro lado, al evaluar el efecto del calcio en el perfil de proteínas secretadas por EPEC WT transformada con Escl sin etiqueta, corroboramos que la secreción de Escl no se afecta en ausencia de calcio.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la eliminación de calcio del medio solo afecta de manera significativa la secreción de efectores, promoviendo un aumento en la secreción de los mismos.

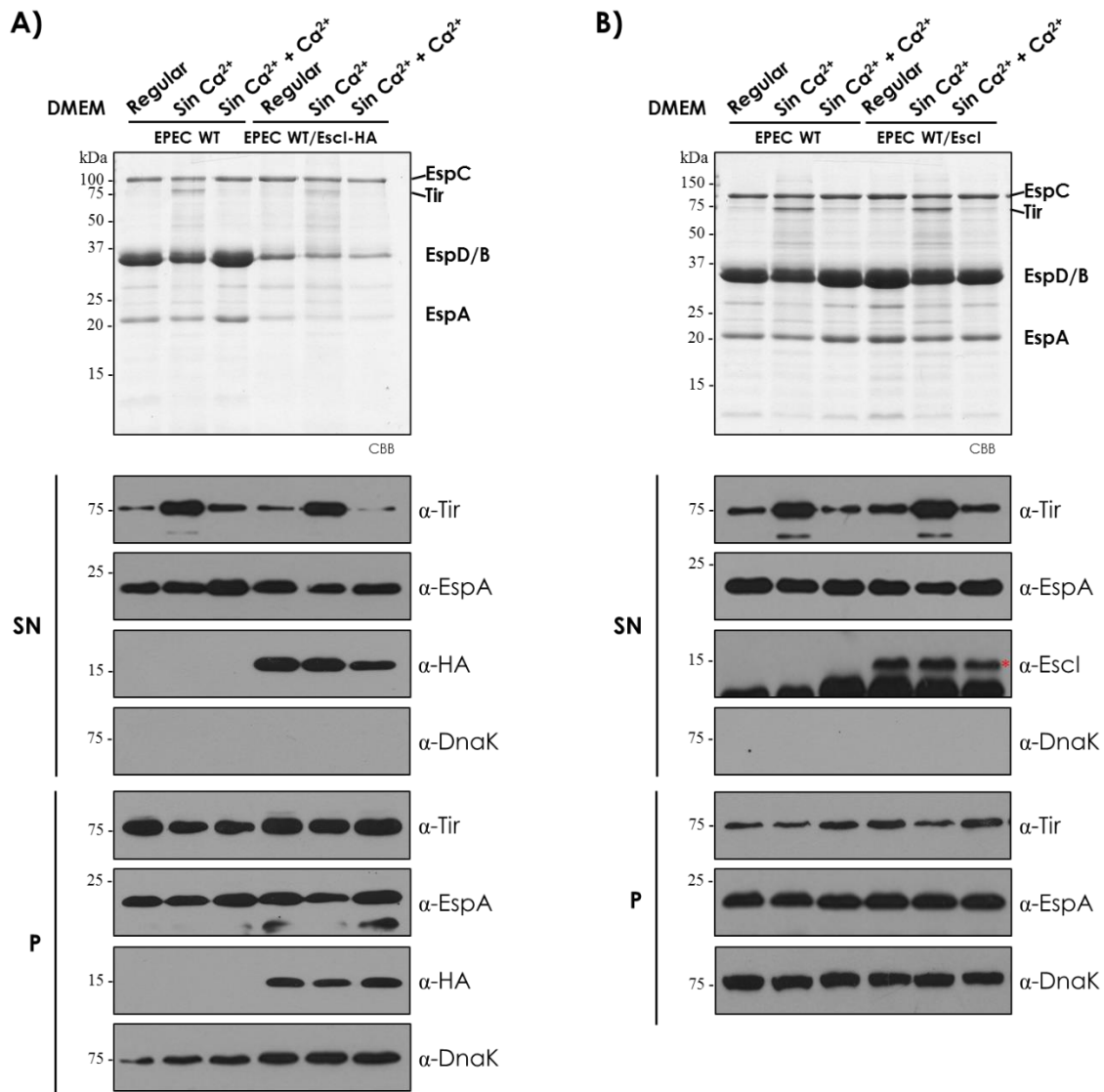


Figura 15. Efecto de la sobreexpresión de EscI-2HA o EscI en la secreción de EPEC y su sensibilidad a calcio. A) Perfil de proteínas secretadas por EPEC WT y EPEC WT transformada con EscI-2HA en DMEM regular (Regular, 1.8 mM de CaCl₂), DMEM sin calcio (Sin Ca²⁺) y DMEM sin calcio adicionado con 1.8 mM de CaCl₂ (Sin Ca²⁺ + Ca²⁺). Los perfiles de proteínas secretadas se analizaron mediante SDS-PAGE teñido con CBB. Adicionalmente, la secreción (SN) y producción (P) de proteínas se evaluó mediante inmunodetección de Tir, EspA, DnaK y el epítipo de HA. B) Perfil de proteínas secretadas por EPEC WT y EPEC WT transformada con EscI en los mismos medios que en A. La secreción de EscI se evaluó mediante inmunodetección empleando anticuerpos específicos contra la proteína.

Componentes estructurales del SST3 involucrados en la detección del calcio.

Ante una infección por EPEC, la translocación de efectores se promueve tras el contacto del SST3 con la célula hospedera. Como demostramos en la sección anterior, ciertas señales ambientales, como cambios en la concentración de calcio, también participan en la activación de esta fase de secreción. De hecho, la concentración de calcio en el medio extracelular del lumen intestinal es de aproximadamente 1 mM, mientras que al interior de la célula hospedera es de ~100 nM. Lo anterior nos llevó a pensar que las proteínas involucradas en la detección y transmisión de esta señal ambiental podrían ser aquellas que están en contacto directo con el hospedero, como es el caso de EspB y EspD que forman un poro en la membrana del enterocito, así como las que forman la estructuras que comunican el exterior de la célula con la base del SST3 (EspA: filamento, EscF: aguja y EscI: eje).

Para evaluar la hipótesis planteada analizamos el perfil de proteínas secretadas por cepas mutantes en los genes *espA*, *espB*, *espD*, *escF* y *escI* crecidas en presencia y ausencia de calcio (Figura 16 y 17).

El perfil de proteínas secretadas por EPEC no se afectó por la eliminación de *espA*, *espB* o *espD*. De igual manera, estas tres cepas siguen respondiendo a la ausencia de calcio, ya que se observa un aumento en la secreción de Tir bajo dicha condición. Como control de lisis se evaluó la presencia de DnaK en el sobrenadante así como la producción de esta y del efector Tir, comprobando

que la producción de proteínas no se afecta bajo las condiciones evaluadas (Figura 16). Estos resultados sugieren que a pesar de que el poro de translocación está en contacto directo con la célula hospedera, no está involucrado en la detección de los niveles de calcio. Así mismo, la proteína EspA, que forma el filamento que conecta el poro de translocación con la aguja de SST3, tampoco se encarga de la detección o transmisión de la señal ambiental que promueve la secreción de efectores.

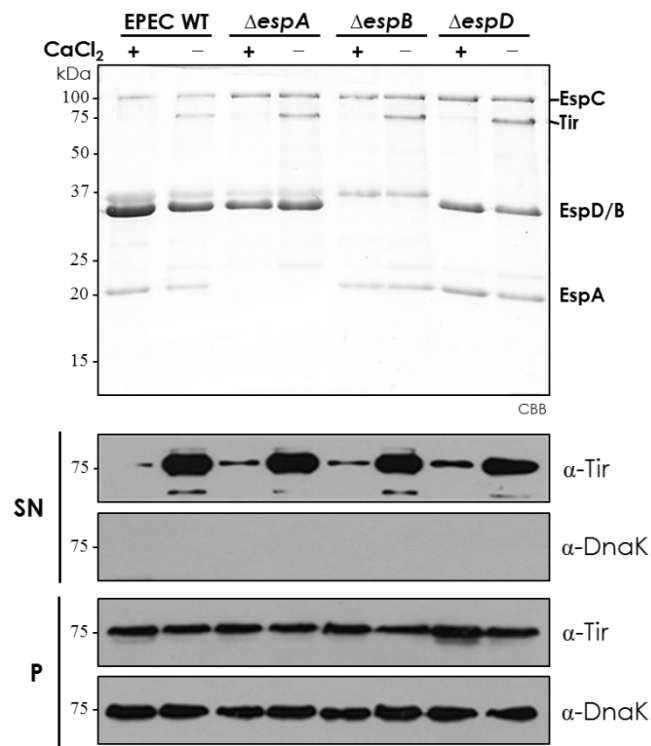


Figura 16. Los translocadores EspA, EspB y EspD no participan en la detección y/o transmisión de la señal de calcio. Perfil de proteínas secretadas por EPEC WT, $\Delta espA$, $\Delta espB$ y $\Delta espD$ en DMEM sin calcio (-) o DMEM sin calcio adicionado con 1.8 mM de $CaCl_2$ (+). Los perfiles de proteínas secretadas al medio se analizaron mediante SDS-PAGE teñido con CBB. Adicionalmente, la secreción (SN) y producción (P) de Tir y DnaK se evaluó mediante inmunodetección empleando anticuerpos específicos contra dichas proteínas.

Los otros dos componentes que comunican el exterior de la célula con la base del SST3 son EscF y EscI, sin embargo, dado que forman la aguja y eje,

respectivamente, estas proteínas son esenciales para la secreción a través del SST3, por lo que en un ensayo de secreción no se observa secreción de sustratos dependientes del SST3, solo se observa la banda correspondiente al autotransportador EspC (Figura 17A y 17B). Adicionalmente, demostramos que las mutantes ΔescF y ΔescI son incapaces de secretar sustratos aún en ausencia de calcio, y que la producción del efector EspF no se afecta en estas cepas o en las diferentes condiciones evaluadas (Figura 17B).

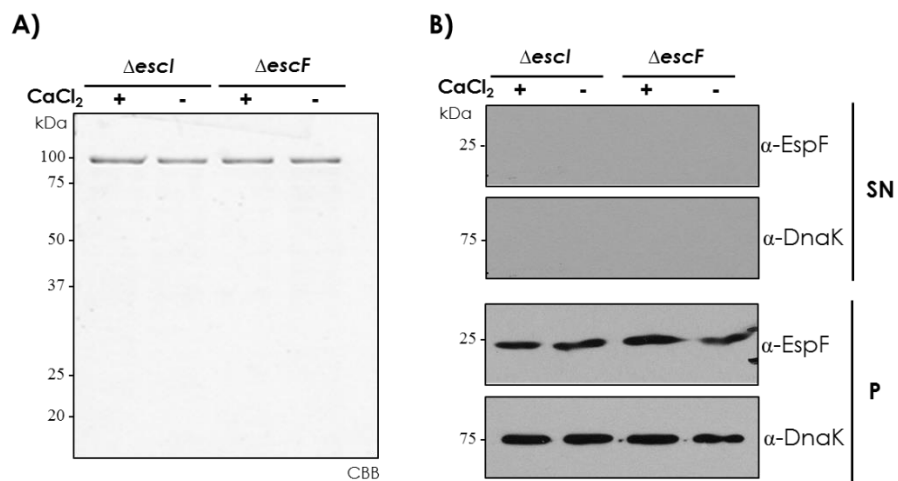


Figura 17. Componentes del SST3 involucrados en la detección de calcio. A) Perfil de proteínas secretadas por EPEC WT, ΔescI y ΔescF en DMEM sin calcio (-) o DMEM sin calcio adicionado con 1.8 mM de CaCl_2 (+). B) Inmunodetección de EspF y DnaK en sobrenadantes (SN) y pastillas celulares (P) de las muestras resueltas en A.

Todos estos datos sugieren que los translocadores EspA, EspB y EspD no están involucrados en la detección o transmisión de la señal de calcio *in vitro*. Por otro lado, estos experimentos no nos permiten descartar la posible participación de la aguja y/o el eje en la detección de esta señal ambiental.

Blancos citoplásmicos de la regulación por calcio.

Es claro que la eliminación de calcio del medio causa un aumento en la secreción de proteínas efectoras (Figuras 14, 15 y 16). Un efecto similar se observa al eliminar a los componentes que forman el complejo SepL/SepD/CesL en EPEC (Figura 11 y 14A). Estos datos, junto con el hecho de que las proteínas homólogas a las que forman este complejo en *Salmonella* están implicadas en la regulación de la secreción de sustratos en respuesta a un estímulo ambiental (pH), nos llevó a pensar que el complejo formado por las proteínas SepL, SepD y CesL podría regular la secreción de efectores en respuesta a cambios en la concentración de calcio. Para evaluar dicha hipótesis se decidió analizar la estabilidad, asociación y localización de los componentes del complejo regulatorio SepL/SepD/CesL en presencia y ausencia de calcio. Para ello, las proteínas SepL, SepD y CesL se fusionaron a diferentes epítomos en un fondo silvestre, empleando el protocolo descrito por Uzzau *et al* 2001 (Uzzau *et al.*, 2001), cuyos detalles se pueden encontrar en la sección de materiales y métodos.

Inicialmente se construyeron las siguientes cepas: EPEC *sepL*-3Flag::km, EPEC *sepD*-2HA::km y EPEC *cesL*-6His::km. Para ello, los casetes de resistencia a kanamicina con las etiquetas de 3-Flag, 2-HA y 6-His se amplificaron a partir de los vectores pSUB11, pSUB7 y pSU315, respetivamente, y posteriormente, se electroporaron en una cepa EPEC silvestre, previamente transformada con el vector pKD46 (que expresa a la recombinasa). La fusión de las etiquetas y la inserción del casete de kanamicina en el sitio deseado se verificaron mediante PCR (Figura 18). Adicionalmente, el casete de kanamicina de las cepas EPEC

sepL-3Flag::*km* y EPEC *sepD*-2HA::*km* se escindió (EPEC *sepL*-3Flag y EPEC *sepD*-2HA) empleando el plásmido pFLP2 como se describe en la sección de materiales y métodos.

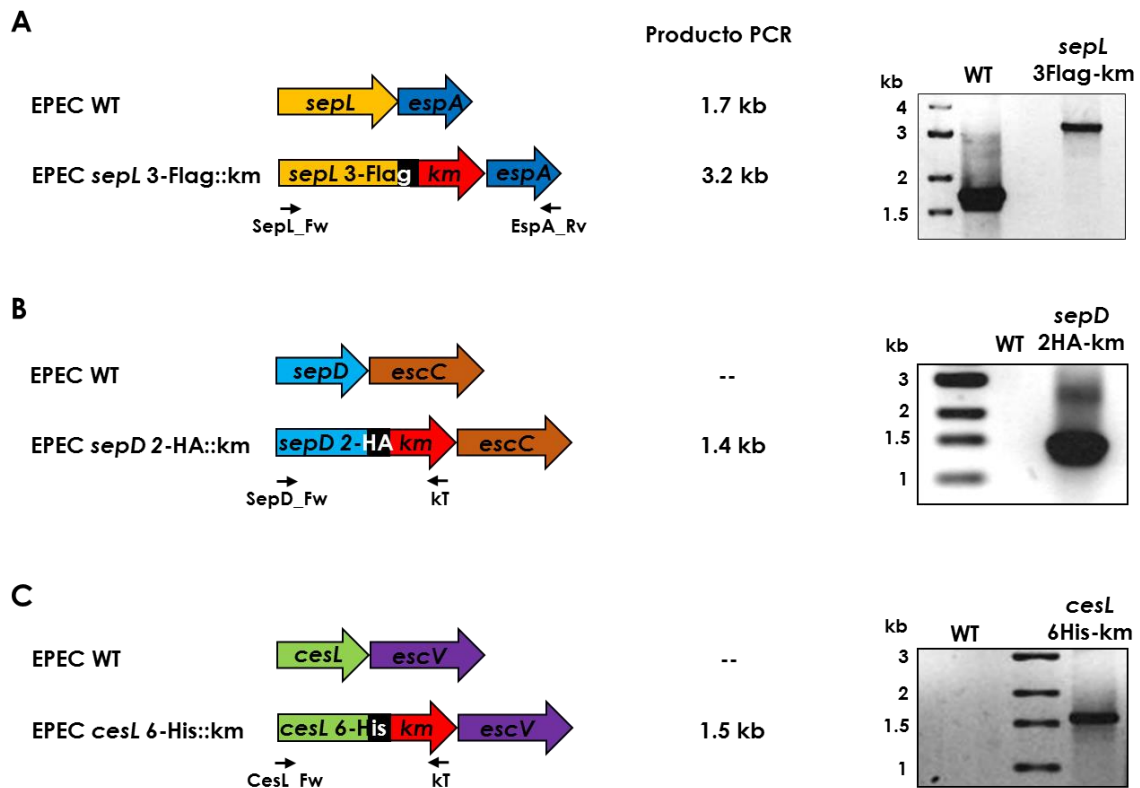


Figura 18. Análisis de la inserción del casete de kanamicina en las cepas etiquetadas en cromosoma. Esquema que muestra el contexto genético de *sepL* (A), *sepD* (B) y *cesL* (C) en la cepa WT así como las modificaciones que se introducen al etiquetar a los genes en cromosoma con 3-Flag, 2-HA y 6-His. En la parte inferior de cada esquema se indican con una flecha negra los oligonucleótidos que se emplearon para corroborar la integración del casete de kanamicina, mientras que en la columna central se indica el tamaño esperado para los productos de PCR. (A) En el caso de EPEC *sepL*-3Flag::*km* observamos un amplicon de 1.7 kb en la cepa WT y de 3.2 kb en la cepa etiquetada que corresponde a lo esperado. B) Con los oligonucleótidos SepD_Fw y kT no se observó ningún amplicon en la cepa WT, ya que no posee el casete de kanamicina que es donde se ancla el oligonucleótido kT, mientras que en la cepa EPEC *sepD*-2HA::*km* se obtuvo un producto de 1.4 kb. C) En la cepa EPEC *cesL*-6His::*km* se amplificó un producto de PCR de 1.5 kb empleando los oligonucleótidos CesL_Fw y kT, mientras que en la cepa WT no se obtuvo ningún amplicon.

Posteriormente, evaluamos el fenotipo de secreción de las cepas etiquetadas en cromosoma así como la producción de las proteínas recombinantes. Como se

aprecia en el panel superior de la Figura 19A, el perfil de proteínas secretas al medio por las cepas EPEC *sepL-3Flag::km* y EPEC *sepL-3Flag* es similar al de la cepa EPEC silvestre; adicionalmente, SepL-3Flag se puede visualizar mediante inmunodetección en las pastillas celulares usando anticuerpos contra el epítipo de Flag (Figura 19A, panel inferior). Por otro lado, la fusión de 2-HA al extremo C-terminal de SepD alteró el fenotipo de secreción, causando un aumento en la secreción del efector Tir (Figura 19B). Este fenotipo no se debe a un efecto del casete de kanamicina sobre los genes río abajo (*escC* y *cesD*), ya que la cepa que no tiene el casete de kanamicina (EPEC *sepD-2HA*) también secreta más Tir que la cepa silvestre. Cabe mencionar que en ambas cepas (con y sin casete) se pudo detectar a SepD-2HA en las pastillas celulares (Figura 19B, panel inferior). Finalmente, observamos que el perfil de proteínas secretadas por la cepa EPEC *cesL-6His::km* es similar al de la cepa silvestre, sin embargo la proteína CesL-6His no pudo ser detectada en las pastillas celulares (Figura 19C).

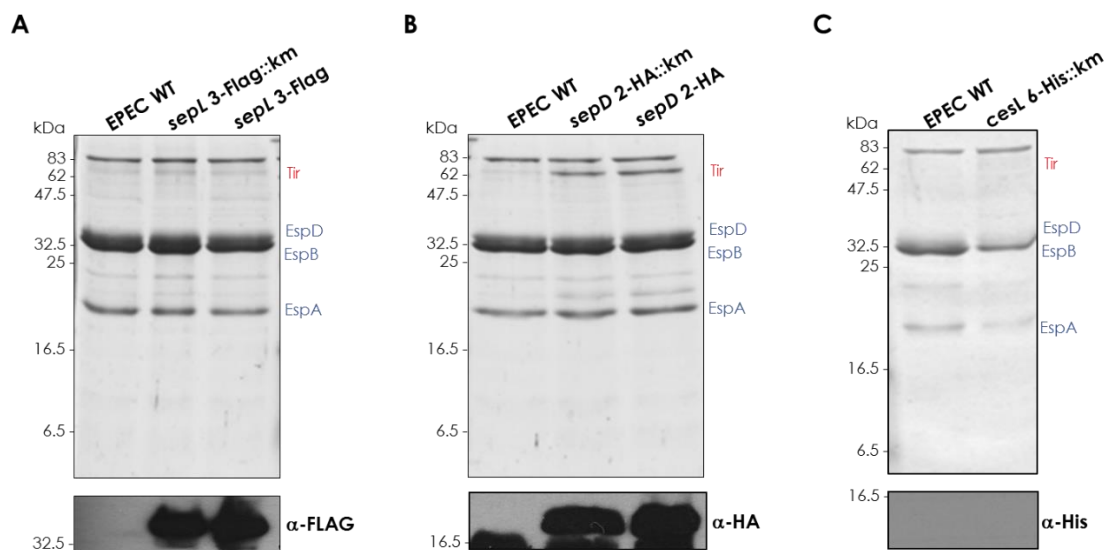


Figura 19. Fenotipo de secreción de las cepas etiquetadas en cromosoma. A) Fenotipo de secreción de EPEC WT, EPEC *sepL-3Flag::km* y EPEC *sepL-3Flag*. La producción de SepL-3Flag se evaluó mediante inmunodetección contra la etiqueta de 3-Flag. B) Perfil de

proteínas secretadas por EPEC WT, EPEC *sepD*-2HA::km y EPEC *sepD*-2HA. Se detectó la presencia de *SepD*-2HA en pastillas celulares con anticuerpos específicos contra el epítipo de HA. C) Fenotipo de secreción de EPEC WT y EPEC *cesL*-6His::km e inmunodetección en pastillas celulares empleando anticuerpos anti-His.

De manera alternativa, etiquetamos a *cesL* con 2-HA y construimos una cepa con los genes *sepL* y *cesL* etiquetados en cromosoma con 3-Flag y 2-HA, respectivamente. Como se observa en el panel superior de la Figura 20, el fenotipo de las cepas EPEC *cesL*-2HA::km y EPEC *sepL*-3Flag *cesL*-2HA::km es similar al de la cepa silvestre. Para comparación, se muestra el perfil de proteínas secretadas al medio por una mutante nula en el gen *escN*, que codifica para la ATPasa del SST3 y cuya presencia es esencial para la secreción, así como el de una mutante en *sepL*, la cual desregula la secreción de efectores y translocadores. Adicionalmente, demostramos que tanto *SepL*-3Flag como *CesL*-2HA pueden ser detectadas en las pastillas celulares mediante inmunodetección con anticuerpos específicos contra los epítipos de Flag y HA, respectivamente (Figura 20, panel inferior).

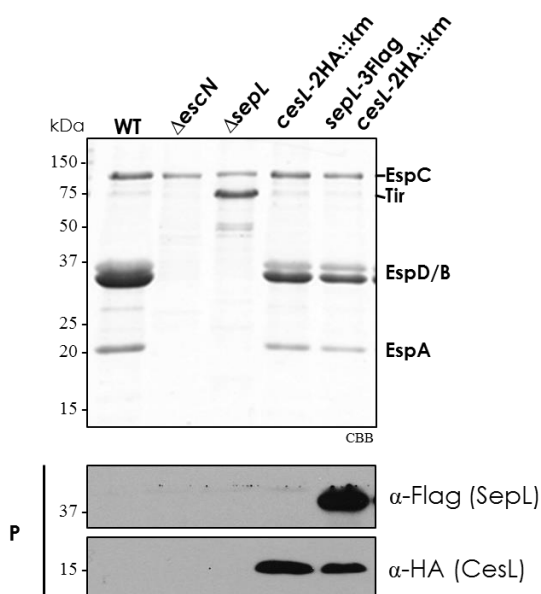


Figura 20. Las cepas EPEC *cesL*-2HA::km y EPEC *sepL*-3Flag *cesL*-2HA::km tienen un fenotipo de secreción similar al de EPEC WT. Perfil de proteínas secretadas por EPEC WT, $\Delta escN$, $\Delta sepL$, EPEC *cesL*-2HA::km y EPEC *sepL*-3Flag *cesL*-2HA::km. La producción de *SepL*-3Flag y *CesL*-2HA se evaluó en las pastillas celulares (P) mediante inmunodetección contra la etiqueta de 3-Flag y 2-HA, respectivamente.

La estabilidad de los componentes del complejo SepL/SepD/CesL no se afecta en respuesta a cambios en la concentración de calcio. Para evaluar el efecto del calcio en la estabilidad de SepL y CesL, la síntesis de novo de proteínas se inhibió mediante la adición de cloranfenicol a cultivos de la cepa EPEC *sepL*-3Flag *cesL*-2HA::km crecida en presencia y ausencia de calcio (Figura 21A). Como se observa en la Figura 21B, a pesar de que tanto la estabilidad de SepL-3Flag como de CesL-2HA disminuye con el tiempo, este perfil es similar en ambas condiciones (presencia o ausencia de calcio), por lo que podemos concluir que el calcio no induce la degradación de las proteínas SepL y CesL.

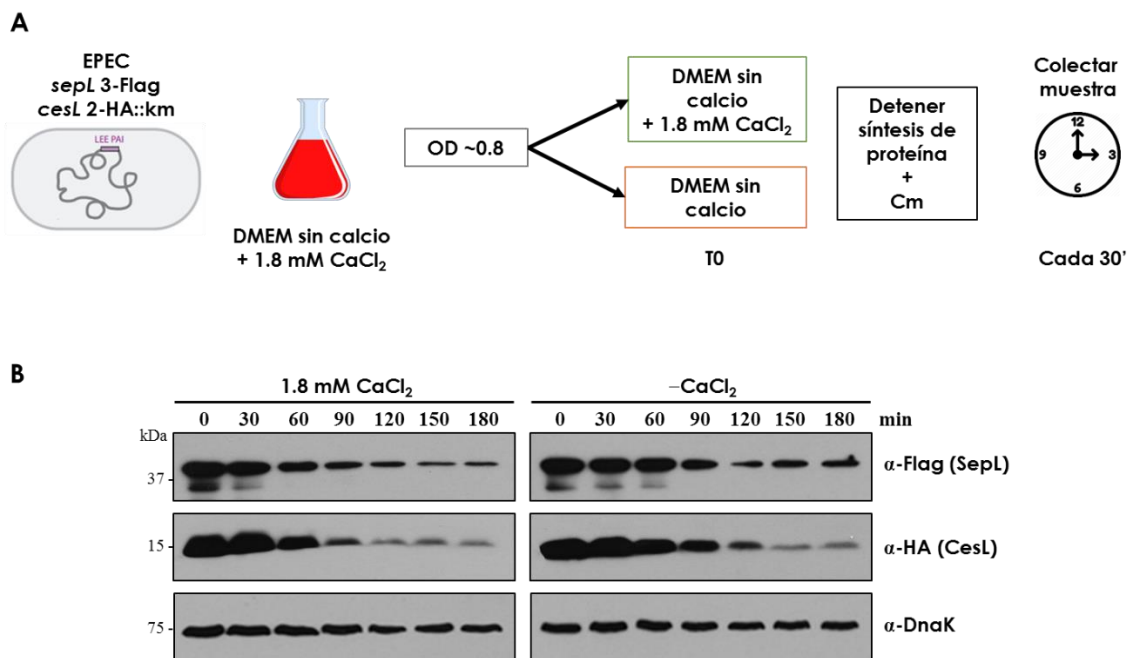


Figura 21. El perfil de estabilidad de SepL-3Flag y CesL-2HA no cambia en respuesta a calcio. A) La cepa EPEC *sepL*-3Flag *cesL*-2HA se creció en DMEM con 1.8 mM de CaCl₂ hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.8, posteriormente, las células se lavaron y resuspendieron en DMEM sin CaCl₂ o suplementado con 1.8 mM de CaCl₂. Se agregó cloranfenicol para detener la síntesis de proteínas y se tomaron muestras cada 30 minutos. B) La estabilidad de SepL y CesL se analizó mediante inmunodetección contra las etiquetadas de Flag y HA, respectivamente. Como control se visualizó la estabilidad de la chaperona DnaK en ambas condiciones.

Si la eliminación de calcio del medio de cultivo indujera la degradación de las proteínas del complejo SepL/SepD/CesL, esperaríamos que la sobreexpresión de SepL, SepD o CesL aliviara el aumento en la secreción de efectores que se induce al eliminar el calcio, sin embargo, en este trabajo demostramos que la sobreexpresión de estas proteínas no revierte el efecto del calcio en el perfil de proteínas secretadas por EPEC (Figura 22). Adicionalmente, observamos que la sobreexpresión de CesL en un fondo EPEC WT reduce la secreción. Con estos resultados corroboramos, de manera indirecta, que la estabilidad del complejo no se ve comprometida al eliminar el calcio del medio.

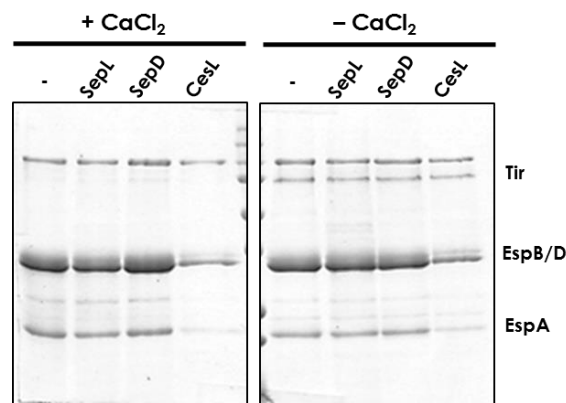


Figura 22. La sobreexpresión de SepL, SepD o CesL no revierte el efecto del calcio en el fenotipo de secreción de EPEC. Perfil de proteínas secretadas por EPEC WT transformada con el vector vacío (-) o con *sepL*, *sepD* y *cesL* clonados en pTrc99A_FF4, crecidas en presencia o ausencia de calcio.

El complejo SepL/SepD/CesL no se disocia en respuesta a la eliminación de calcio. Dado que tanto la eliminación de calcio del medio (Figura 14) como la eliminación de los componentes del complejo (Figura 11) resulta en el incremento de la secreción de efectores, planteamos la hipótesis de que la eliminación del calcio podría afectar al complejo SepL/SepD/CesL, probablemente induciendo su disociación, como ocurre con el complejo SsaL/SpiC/SsaM de *Salmonella* en

respuesta al pH (Yu et al., 2010). Para evaluar dicha hipótesis decidimos analizar la formación del complejo SepL/SepD/CesL en presencia y ausencia de calcio.

Primero crecimos a la cepa EPEC *sepL-3Flag cesL-2HA::km* en presencia o ausencia de calcio y después de romper las células inmunoprecipitamos a SepL-3Flag. Mediante inmunodetección demostramos que SepD y CesL-2HA coimmunoprecipitan con SepL-3Flag tanto en presencia como en ausencia de calcio, no así la chaperona DnaK que se empleó como control negativo (Figura 23A). Adicionalmente, al realizar las coimmunoprecipitaciones con la cepa EPEC *cesL-2HA::km*, observamos que SepD, CesL-2HA y DnaK no se unen de manera inespecífica a la resina acoplada a anti-Flag (Figura 23B). Los resultados anteriores sugieren que el complejo SepL/SepD/CesL es insensible a calcio.

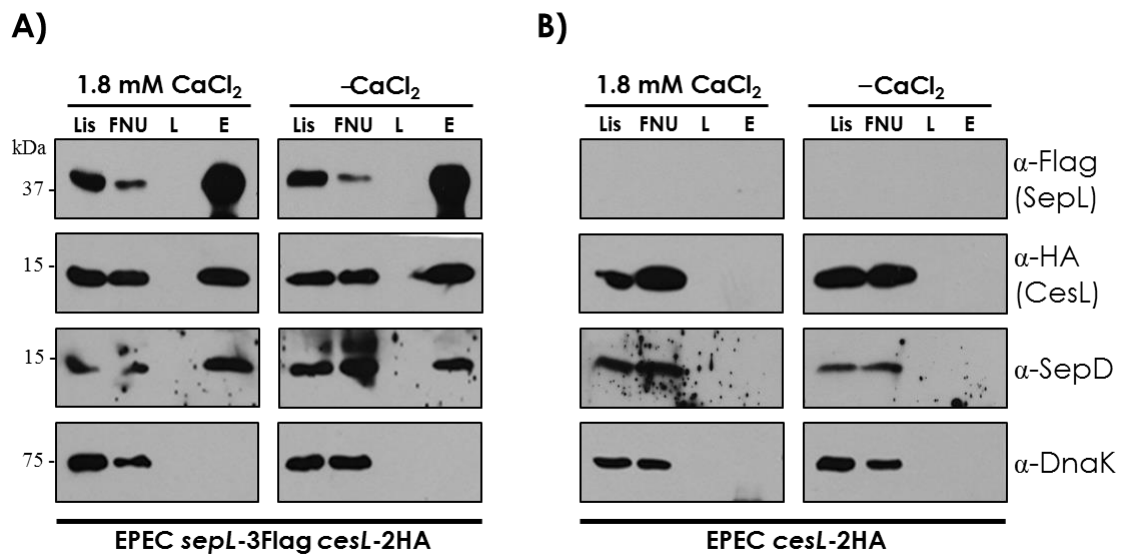


Figura 23. La asociación del complejo SepL/SepD/CesL no se afecta con la eliminación de calcio del medio. A) Inmunoprecipitación de SepL-3Flag a partir de la cepa EPEC *sepL-3Flag cesL-2HA* crecida en presencia y ausencia de calcio. La coimmunoprecipitación de CesL-2HA y SepD se corroboró con anticuerpos anti-HA y anti-SepD, respectivamente. Como control negativo se evaluó la coimmunoprecipitación de la chaperona DnaK con SepL-3Flag. B) Para descartar la unión inespecífica de CesL-2HA, SepD y DnaK a la perlas acopladas a anti-Flag, se realizó la coimmunoprecipitación a partir de la cepa EPEC *cesL-*

2HA. Se emplean las siguientes abreviaturas: lisado celular (Lis), fracción no unida (FNU), lavado (L) y elución (E).

Recientemente se propuso que las señales ambientales, tales como el calcio, podrían difundir a través del canal del SST3 y actuar sobre un blanco citoplásmico en la base del inyectisoma (Notti & Stebbins, 2016, Portaliou, Tsolis et al., 2016, Shaulov, Gershberg et al., 2017, Yu et al., 2010). Es por ello que investigamos si la adición de calcio directo al complejo SepL/SepD/CesL afecta la formación del complejo. Para ello realizamos ensayos de copurificación tipo *pull-down* en presencia o ausencia de calcio, como se describe en la sección de Materiales y métodos. Los resultados demuestran que el calcio no afecta de manera directa la formación del complejo SepL/SepD/CesL *in vitro* (Figura 24). Lo anterior es consistente con el hecho de que ninguna de las proteínas del complejo posee dominios de unión a calcio (no mostrado).

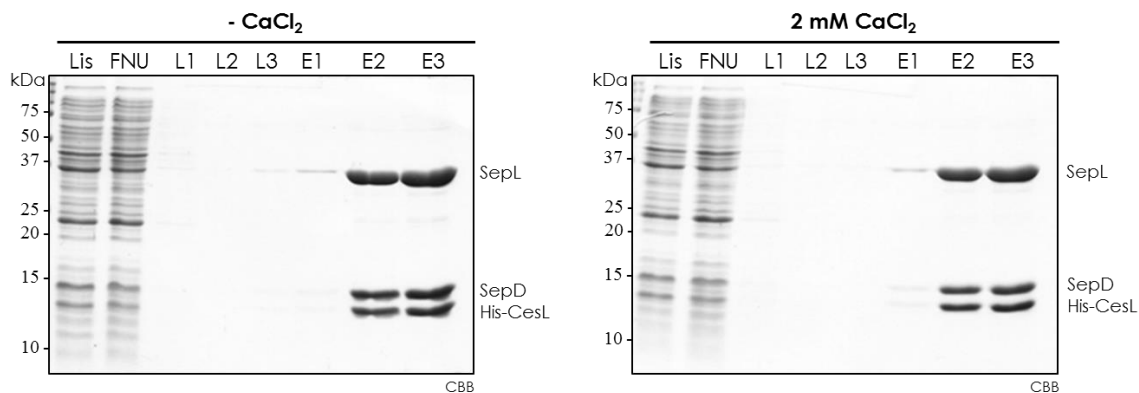


Figura 24. La adición directa de calcio al complejo SepL/SepD/CesL no afecta su formación. Copurificación de SepL y SepD con His-CesL mediante cromatografía de afinidad por níquel realizada en presencia y ausencia de calcio. Se emplean las siguientes abreviaturas: lisado celular (Lis), fracción no unida (FNU), lavado (L) y elución (E).

El calcio no afecta la localización celular de los componentes del complejo

SepL/SepD/CesL. Finalmente evaluamos la localización de los componentes del

complejo SepL/SepD/CesL. Para ello, realizamos fraccionamiento celular de la cepa EPEC *sepL-3Flag cesL-2HA::km* crecida en presencia o ausencia de calcio (Figura 25A). Demostramos que SepL y CesL son proteínas citoplásmicas que se asocian a membrana, sin embargo, contrario a lo esperado, esta distribución no cambia en respuesta a cambios en la concentración de calcio (Figura 25B). Como marcadores de citoplasma y membrana empleamos a las proteínas DnaK y EscJ, respectivamente.

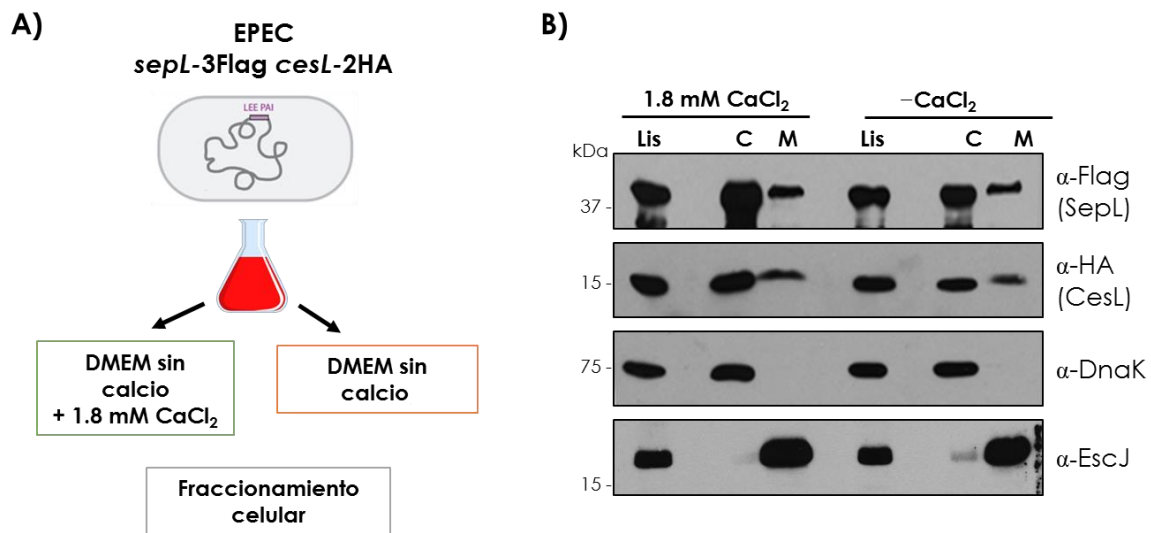


Figura 25. La localización celular de SepL y CesL no se altera en respuesta a calcio. A) La cepa EPEC *sepL-3Flag cesL-2HA* se creció en DMEM sin calcio solo o adicionado con 1.8 mM de CaCl₂. Posteriormente se realizó fraccionamiento celular como se describe en materiales y métodos. B) La localización celular de SepL y CesL se analizó mediante inmunodetección contra las etiquetas de Flag y HA, respectivamente. Como control para evaluar la pureza de cada fracción, se analizó la presencia de la chaperona DnaK y de la proteína EscJ en citoplasma y membrana, respectivamente. Se emplean las siguientes abreviaturas: lisado celular (Lis), fracción citoplásmica (C) y fracción membranal (M).

En conjunto, nuestros resultados indican que el mecanismo molecular a través del cual se aumenta la secreción de efectores al eliminar el calcio del medio no involucra cambios en la estabilidad, formación o localización del complejo regulatorio SepL/SepD/CesL.

A pesar de que el complejo SepL/SepD/CesL y el calcio no actúan sobre una misma vía de regulación, es claro que ambos participan en el control de la secreción de efectores. Para poder elucidar el mecanismo a través del cual cada una de estas vías regula la secreción nos propusimos identificar nuevos blancos de regulación de la secreción, para ello evaluamos la interacción de SepL con diversos componentes del SST3.

Componentes del SST3 que interactúan con SepL.

SepL pertenece a una familia de proteínas denominadas "portero", su nombre se debe a que estas proteínas controlan el acceso de diferentes sustratos al SST3 y con ello su secreción. Se ha demostrado que la interacción de los homólogos de SepL (SctW) con otros componentes del SST3, como son la ATPasa (SctN), la subunidad del eje (StcI) y el componente principal de la puerta de exportación (SctV), es importante para su función como reguladores de la secreción (Botteaux et al., 2009, Cherradi et al., 2013, Lee et al., 2014, Roehrich, Bordignon et al., 2017, Shen & Blocker, 2016, Stone, Bulir et al., 2011). Con base en lo anterior, evaluamos la capacidad de SepL de interactuar con algunos componentes del SST3 y la influencia del calcio en las interacciones observadas.

SepL interactúa de manera independiente de calcio con EscN, EscO, EscL, EscI y EscV. Mediante ensayos de copurificación tipo *pull-down*, realizados en presencia o ausencia de calcio, demostramos que SepL se une, de manera independiente de calcio, a la ATPasa (EscN), su regulador positivo (EscO), una versión soluble del regulador negativo de EscN (EscL Δ 89) y la subunidad del eje

(EscI) (Figura 26). Como control negativo, demostramos que SepL no se une de manera inespecífica a la resina de níquel (Figura 26, Control -).

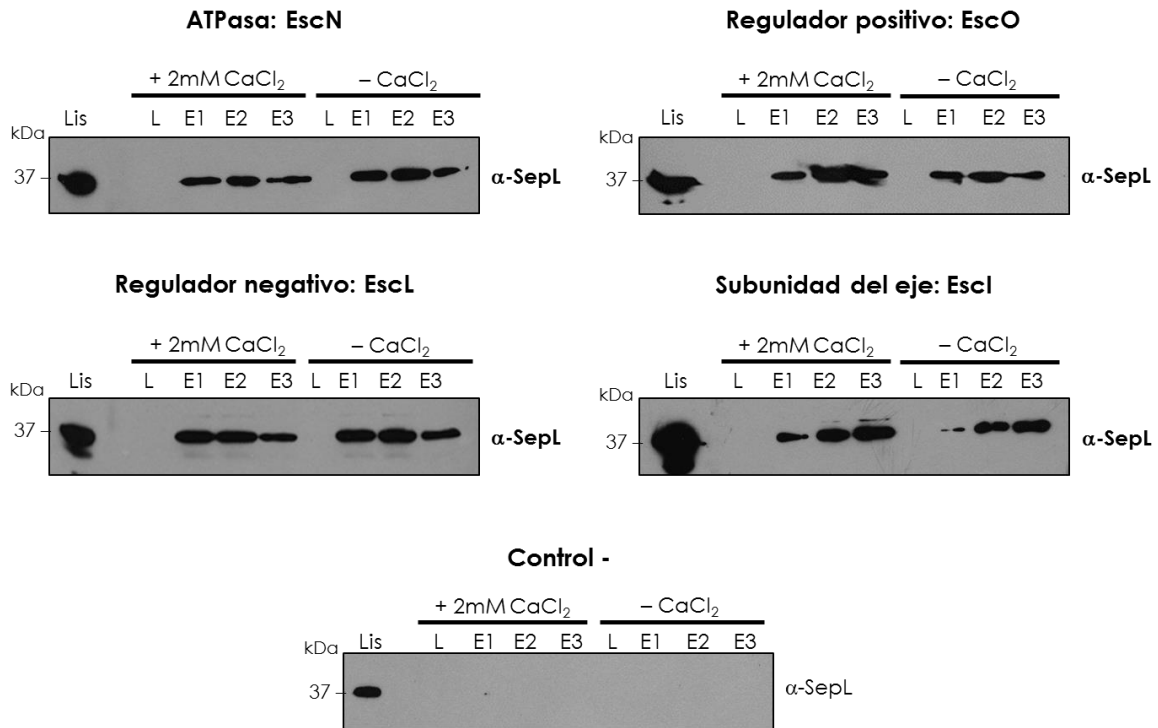


Figura 26. SepL interacciona con EscN, EscO, EscL y EscI de manera independiente de calcio. Copurificación de SepL con His-EscN, His-EscO, His-EscL Δ 89 y His-EscI mediante cromatografía de afinidad por níquel realizada en presencia y ausencia de calcio. La copurificación de SepL con los componentes del SST3 mencionados se analizó mediante inmunodetección, empleando anticuerpos específicos contra SepL. Como control negativo se evaluó la interacción de SepL a la resina de níquel (Control -). Se emplean las siguientes abreviaturas: lisado celular (Lis), lavado (L) y elución (E).

Adicionalmente, demostramos que SepL también se une de manera independiente de calcio al dominio citoplásmico del componente principal de la puerta de exportación, EscV (Figura 27).

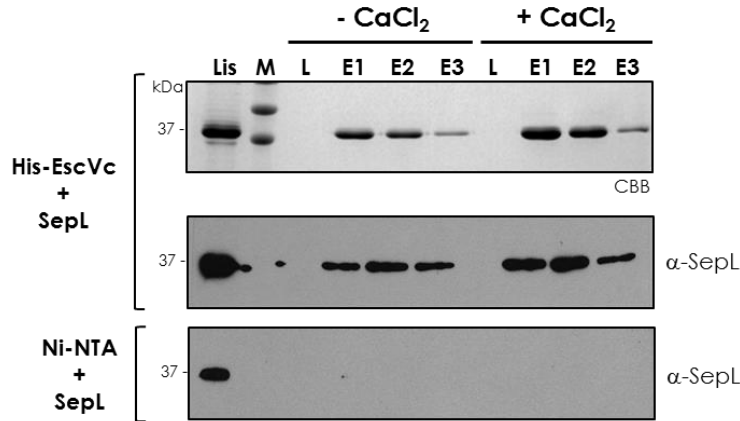


Figura 27. SepL interacciona con el dominio citoplásmico de EscV de manera independiente de calcio. Copurificación de SepL con His-EscVc mediante cromatografía de afinidad por níquel realizada en presencia y ausencia de calcio. His-EscVc se visualizó mediante SDS-PAGE teñido con CBB y la copurificación de SepL se analizó mediante inmunodetección, empleando anticuerpos específicos contra SepL. Como control negativo se evaluó la interacción de SepL a la resina de níquel (Ni-NTA + SepL). Se emplean las siguientes abreviaturas: lisado celular (Lis), marcador de peso molecular (M), lavado (L) y elución (E).

Nuevamente, demostramos que SepL no se une de manera inespecífica a la resina de níquel (Figura 27). Sin embargo, como control adicional de la interacción EscV-SepL, evaluamos la capacidad de His-EscVc de interactuar con una versión soluble de la proteína EscK (MBP-EscK), elegimos a este componente del SST3 ya que en un reporte previo se demostró, mediante ensayos de doble híbrido en levadura, que estas dos proteínas no interactúan (Soto et al., 2017). Como se observa en la Figura 28, His-EscVc interacciona con SepL (Figura 28A) pero no con MBP-EscK (Figura 28B), y ninguna de estas dos proteínas se une de manera inespecífica a la resina de níquel.

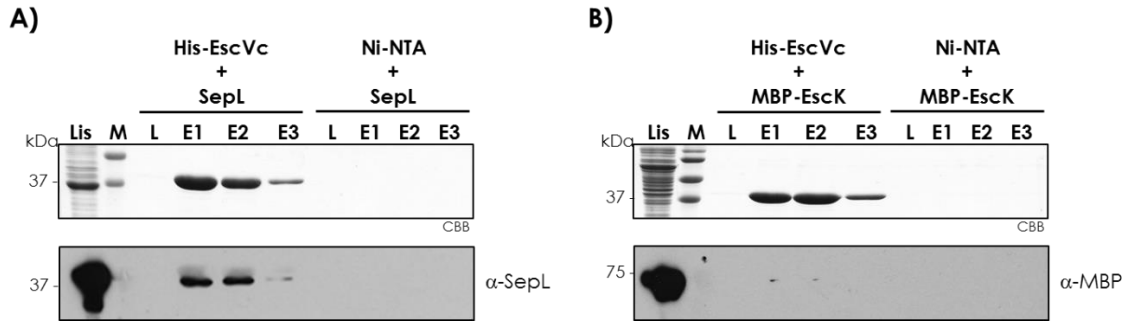


Figura 28. El dominio citoplásmico de EscV interacciona con SepL pero no con MBP-EscK.

Copurificación de SepL (A) y MBP-EscK (B) con His-EscVc mediante cromatografía de afinidad por níquel. His-EscVc se visualizó mediante SDS-PAGE teñido con CBB y la copurificación de SepL y MBP-EscK se analizó mediante inmunodetección, empleando anticuerpos específicos contra SepL y la etiqueta de MBP. Como control negativo se evaluó la interacción de SepL y MBP-EscK con la resina de níquel (A: Ni-NTA + SepL, B: Ni-NTA + MBP-EscK). Se emplean las siguientes abreviaturas: lisado celular (Lis), marcador de peso molecular (M), lavado (L) y elución (E).

Los resultados anteriores indican que SepL tiene la capacidad de unirse a la subunidad del eje (EscI), a los componentes del complejo ATPasa (EscN, EscO y EscL) y al dominio citoplásmico del componente principal de la puerta de exportación (EscV) y que ninguna de estas interacciones depende del calcio. Sin embargo, no se sabe si estas interacciones están involucradas en la regulación de la secreción de sustratos en EPEC.

En *P. aeruginosa* y *S. flexneri* se reportó que los homólogos de SepL interaccionan con los homólogos de EscV a través del C-terminal, y que la eliminación de la interacción SctW-SctV resulta en la desregulación de la secreción (Lee et al., 2014, Roehrich et al., 2017, Shen & Blocker, 2016). Lo anterior sugiere que la interacción SepL-EscV podría participar en la regulación de la secreción de sustratos.

Dissección molecular de la interacción SepL-EscVc. En esta sección analizamos la interacción de EscV con diversas versiones truncas de SepL generadas en el laboratorio (Benítez G. M., Tesis de maestría, 2018, Figura 29A) así como su capacidad de restaurar el fenotipo de secreción de una mutante nula en el gen *sepl*.

Mediante ensayos de copurificación tipo *pull-down* observamos que la eliminación de los últimos 11 (SepL Δ C11) ó 75 aminoácidos de SepL (SepL Δ C75) abate la interacción con EscV. Por el contrario, la versión trunca de SepL que carece de los aminoácidos 319 a 334 conserva su habilidad de interactuar con EscV (Figura 29B). Cabe mencionar que ninguna de estas versiones se une de manera inespecífica a la resina de níquel. Lo anterior sugiere que los últimos 11 aminoácidos de SepL son indispensables para la interacción con EscV.

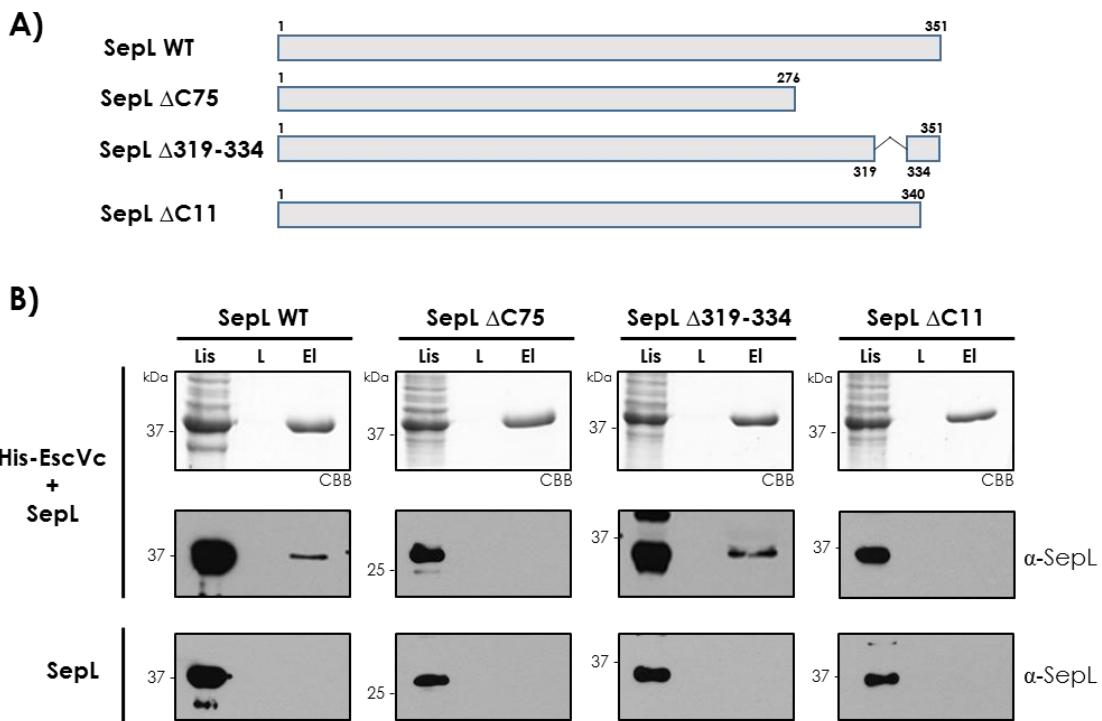


Figura 29. El C-terminal de SepL es indispensable para su interacción con His-EscVc. A) Esquema que representa las versiones truncas de SepL empleadas en los ensayos de copurificación. B) Copurificación de SepL WT, SepL Δ C75, SepL Δ 319-334 y SepL Δ C11 con His-EscVc mediante cromatografía de afinidad por níquel (His-EscVc + SepL). His-EscVc se visualizó mediante SDS-PAGE teñido con CBB y la copurificación de las versiones truncas de SepL se analizó mediante inmunodetección contra SepL. Como control negativo se evaluó la interacción de SepL WT y las versiones truncas a la resina de níquel (SepL). Se emplean las siguientes abreviaturas: lisado celular (Lis), lavado (L) y elución (E1).

Por otra parte, demostramos que a pesar de que Δ C11 pierde la capacidad de interaccionar con EscV, aún puede formar el complejo SepL/SepD/CesL (Figura 30).

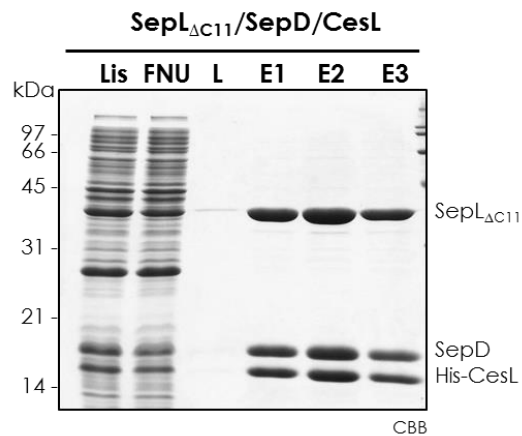


Figura 30. SepL Δ C11 se asocia a SepD y CesL. Copurificación de SepL Δ C11 y SepD con His-SepL evaluada mediante cromatografía de afinidad por níquel. El complejo se visualizó mediante SDS-PAGE teñido con CBB. Se emplean las siguientes abreviaturas: lisado celular (Lis), fracción no unida (FNU), lavado (L) y elución (E).

Finalmente, mediante ensayos de complementación de la cepa Δ sepL con SepL WT, SepL Δ C75, SepL Δ 319-334 y SepL Δ C11 demostramos que a pesar de que todas las versiones truncas se producen a niveles similares al de SepL completa, no son capaces de restaurar el fenotipo de una mutante nula en el gen sepL. Por su parte, SepL Δ C75, SepL Δ 319-334 y SepL Δ C11 solo redujeron ligeramente la hipersecreción de efectores (Figura 31).

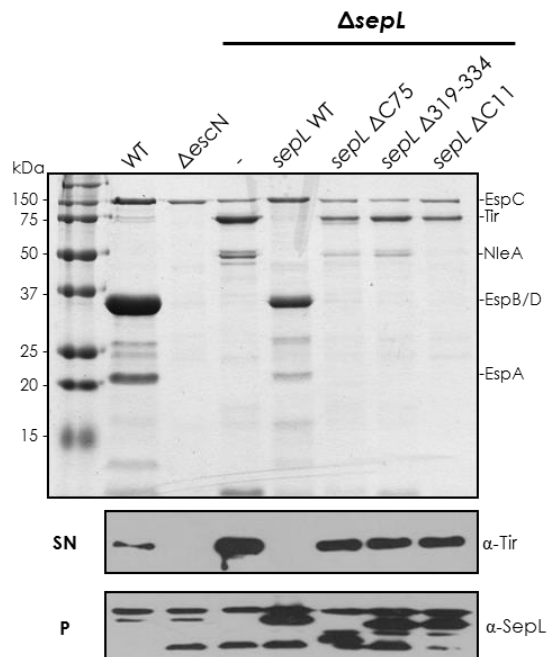


Figura 31. Las deleciones del C-terminal de SepL no complementan el perfil de proteínas secretadas por $\Delta sepL$. Perfil de proteínas secretadas por EPEC WT, $\Delta escN$, $\Delta sepL$ sola o transformada con el vector vacío (-), *sepL* WT, *sepL* $\Delta C75$, *sepL* $\Delta 319-334$ y *sepL* $\Delta C11$ clonados en pTrc99A_FF4. Todas las proteínas secretadas se visualizaron mediante SDS-PAGE teñido con CBB, mientras que la secreción (SN) del efector Tir y la producción (P) de SepL Wt y las distintas versiones trucas se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos contra Tir y SepL.

Los resultados anteriores sugieren que SepL interacciona con EscVc a través del C-terminal, el cual es importante para la regulación de la secreción.

En *S. flexneri* y *P. aeruginosa* se demostró que mutaciones que interfieren con la interacción entre los homólogos de SepL y EscV (MxiC/MxiA y Pcr1/PcrD, respectivamente) resultan en la desregulación de la secreción de efectores, lo cual sugiere que esta interacción es importante para la regulación de la secreción. Adicionalmente, se ha observado que los homólogos de EscV en otros sistemas (tanto en el inyectisoma como en el flagelo) están involucrados en el reclutamiento de sustratos. En *Xanthomonas* spp. se reportó que el dominio

citoplásmico de HrcV interacciona con sustratos tempranos, tardíos y algunas de sus chaperonas (Alegria, Docena et al., 2004, Buttner, Lorenz et al., 2006, Hartmann & Buttner, 2013), de igual manera, se ha demostrado que el dominio citoplásmico del homólogo flagelar de EscV (FlhA) se une a diferentes complejos de chaperona/sustrato (Bange, Kummerer et al., 2010, Kinoshita, Hara et al., 2013). Con base en lo anterior, decidimos evaluar si el dominio citoplásmico de EscV (EscVc) también interacciona con sustratos del SST3 de EPEC.

El dominio citoplásmico de EscV participa en el reconocimiento de sustratos.

Realizamos ensayos de secreción de las cepas EPEC $\Delta sepL$ (hipersecreta efectores) y $\Delta grIR$ (aumenta la producción y secreción de translocadores y efectores). Las proteínas secretadas al medio por las cepas antes mencionadas se incubaron con His-EscVc acoplado a una resina de níquel. La interacción entre el dominio citoplásmico de EscV y algunos sustratos secretados a través del SST3 de EPEC se analizó mediante inmunodetección. Observamos que EscVc interacciona con los translocadores EspA y EspD, así como con el efector Tir (Figura 32). A manera de control, también evaluamos la interacción de los sustratos mencionados al dominio citoplásmico de EscD (EscD_N), la proteína que forma uno de los anillos de membrana interna, y a la resina sola. Como se observa la Figura 32, únicamente el dominio citoplásmico de EscV funge como sitio de unión de sustratos del SST3, sugiriendo que esta interacción es específica.

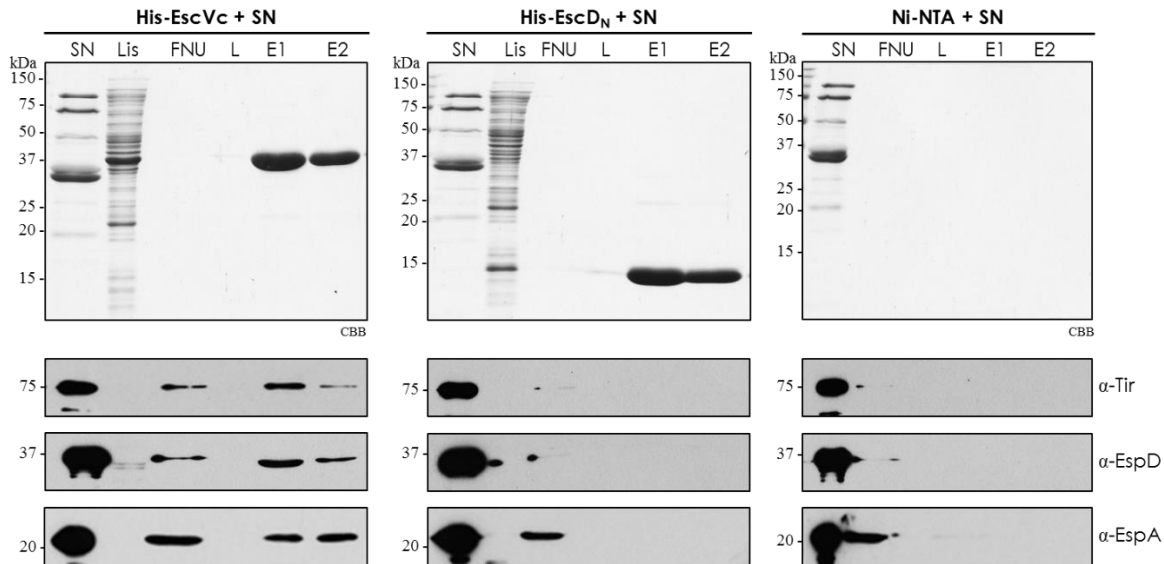


Figura 32. El dominio citoplásmico de EscV sirve como sitio de unión de sustratos. Copurificación tipo *pull-down* de sustratos secretados a través del SST3 con los dominios citoplásmicos de EscV (His-EscVc) y EscD (His-EscD_N). Se acoplaron las proteínas recombinantes His-EscVc y His-EscD_N a la resina Ni-NTA y se mezclaron con el sobrenadante de los ensayos de secreción de las cepas EPEC $\Delta sepL$ y $\Delta grlR$ (SN). Después de lavar extensivamente (L), las proteínas se eluyeron (E). La copurificación de Tir, EspD y EspA con His-EscVc o His-EscD_N se analizó mediante inmunodetección, empleando anticuerpos específicos contra cada proteína. Como control negativo se analizó la unión inespecífica de Tir, EspD y EspA a la resina de níquel (Ni-NTA + SN). Se emplean las siguientes abreviaturas: sobrenadante (SN), lisado celular (Lis), fracción no unida (FNU), lavado (L) y elución (E).

El hecho de que EscV sirva como sitio de anclaje tanto de la proteína reguladora SepL como de diversos sustratos previo a su secreción sugiere que EscV podría funcionar como punto de regulación de la secreción.

Los componentes de la plataforma de clasificación interactúan con sustratos.

Además de los puntos de regulación de la secreción mencionados a lo largo de este trabajo, en *Salmonella* se reportó la existencia de un complejo molecular, formado por las proteínas SpaO, OrgA y OrgB (EscQ, EscK y EscL en EPEC), que se encarga de la clasificación de sustratos previo a su secreción. Este complejo

proteico, denominado “plataforma de clasificación” interacciona de manera secuencial con los sustratos del SST3, estableciendo así un orden temporal en la secreción de sustratos (Lara-Tejero et al., 2011). En EPEC, las proteínas EscQ, EscK y EscL también forman un complejo que se propone podría estar involucrado en el reclutamiento de sustratos previo a su secreción (Biemans-Oldehinkel et al., 2011, Soto et al., 2017), sin embargo, no se ha demostrado la interacción directa de los componentes de la plataforma con sustratos del SST3.

Empleando la metodología descrita para evaluar la interacción del dominio citoplásmico de EscV con las proteínas secretadas a través del SST3, demostramos que His-EscQ, His-EscK y His-EscL $\Delta 89$ interaccionan tanto con sustratos intermedios (EspA) como tardíos (Tir) (Figura 33). Como controles positivo y negativo, se analizó también la unión de sustratos a His-EscV_C y His-EscD_N o la resina de níquel, respectivamente.

A pesar de que los ensayos realizados no son cuantitativos, se observó una ligera diferencia en la cantidad de proteína que coeluye con cada uno de los componentes de la plataforma de clasificación (Figura 33), lo que nos hace suponer que estos participan de manera diferencial en el reconocimiento de cada clase de sustratos, sin embargo se requieren ensayos más sensibles para poder cuantificar la afinidad de unión de cada sustrato a EscK, EscQ y EscL.

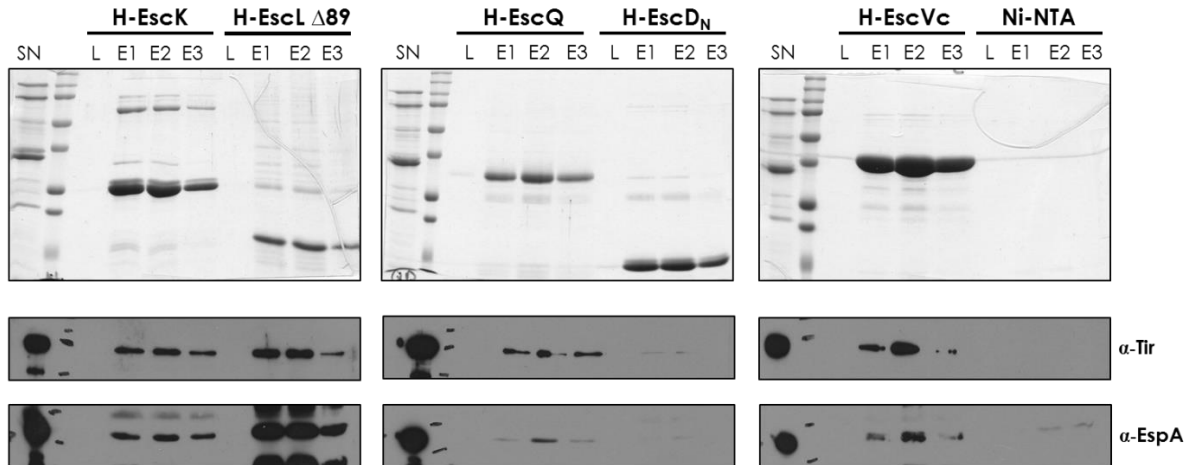


Figura 33. EscK, EscL $\Delta 89$ y EscQ participan en el reconocimiento de sustratos. Copurificación tipo *pull-down* de sustratos secretados a través del SST3 con His-EscK, His-EscL $\Delta 89$, His-EscQ, His-EscD_N y His-EscVc. Las proteínas recombinantes se acoplaron a la resina Ni-NTA y se mezclaron con el sobrenadante de los ensayos de secreción de las cepas EPEC $\Delta sepL$ y $\Delta grlR$ (SN). La copurificación de Tir y EspA con His-EscK, His-EscL $\Delta 89$, His-EscQ, His-EscD_N y His-EscVc se analizó mediante inmunodetección, empleando anticuerpos específicos contra cada proteína. Como control negativo se analizó la unión inespecífica de Tir y EspA a la resina de níquel (Ni-NTA). Se emplean las siguientes abreviaturas: sobrenadante (SN), lavado (L) y elución (E).

Podemos concluir que al igual que el dominio citoplásmico de EscV, los componentes de la plataforma de clasificación EscQ, EscK y EscL también participan en el reconocimiento de sustratos.

Resultados adicionales.

Pruebas de cristalización del complejo SepL/SepD/CesL.

Inicialmente, uno de los objetivos del proyecto era elucidar la estructura del complejo SepL/SepD/CesL. De acuerdo a los antecedentes, la región amino de los homólogos de SepL es una región desordenada, que por su dificultad de empaquetarse de manera ordenada, genera cristales cuya resolución de difracción es de mala calidad (Archuleta & Spiller, 2014, Deane, Roversi et al., 2008, Schubot, Jackson et al., 2005), por ello, decidimos realizar las pruebas de cristalización con el complejo WT y con una versión de SepL que carece de los primeros 30 aminoácidos.

Purificamos los complejos SepLWT/SepD/CesL y SepL Δ 30/SepD/CesL por cromatografía de afinidad por níquel y posteriormente los purificamos por cromatografía de exclusión molecular, empleando la columna HiLoad Superdex 200 16/20. En ambos casos, obtuvimos un solo pico que corresponde al complejo WT y Δ 30 respectivamente (Figura 34, panel superior), para comprobar la pureza de las purificaciones corrimos las fracciones correspondientes a cada pico en SDS PAGE (Figura 34, panel inferior). A pesar de que se obtuvo un solo pico en la purificación del complejo Δ 30, en el SDS-PAGE se observa otra banda de alrededor de 50 kDa (Figura 34B), se mandó a secuenciar por espectrometría y los resultados arrojaron la secuencia de SepL y CesL, por lo que probablemente es una forma del complejo que no se disoció a 100 °C con β -mercaptoetanol.

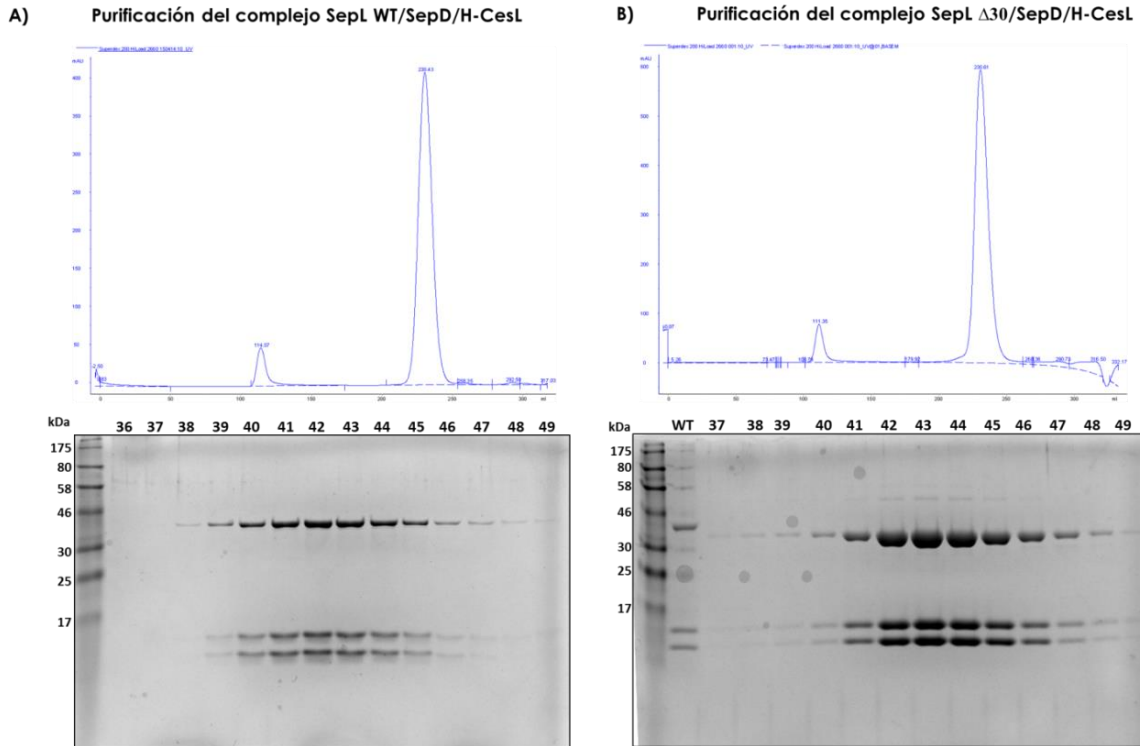


Figura 34. Purificación por cromatografía de exclusión molecular del complejo A) SepL WT/SepD/CesL y B) SepL Δ 30/SepD/CesL. En la parte superior se muestra el perfil de exclusión y en los paneles inferiores en análisis por SDS PAGE del pico mayoritario.

Se realizaron pruebas de cristalización empleando el método de difusión de vapor en gota sentada. Empleamos tres diferentes concentraciones: 5 mg/mL, 7 mg/mL y 8 mg/mL y los siguientes estuches comerciales: Crystal Screen HT, Wizard I & II (Emerald BioSystems), Cryo I & II (Emerald BioSystems), Crystal Screen I & II e Index HT (Hampton Research). Las placas se incubaron a 20 y 4°C. No se obtuvieron cristales bajo ninguna condición.

Proteólisis limitada y espectrometría de masas.

Con el fin de determinar experimentalmente las regiones sensibles a proteasa de las proteínas SepL, SepD y CesL en complejo, realizamos ensayos de proteólisis limitada con tripsina, empleando distintas relaciones de proteína:proteasa (1:50,

1:100, 1:250, 1:500, 1:750 y 1:1000). Las reacciones se dejaron por 2 horas a temperatura ambiente y se tomó muestra a los 5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos.

En la Figura 35 se pueden apreciar cuatro bandas (señaladas con flechas rojas) de aproximadamente 35, 28, 22 y 4 kDa. Estas cuatro bandas se mandaron a secuenciar por espectrometría de masas (Tabla 10).

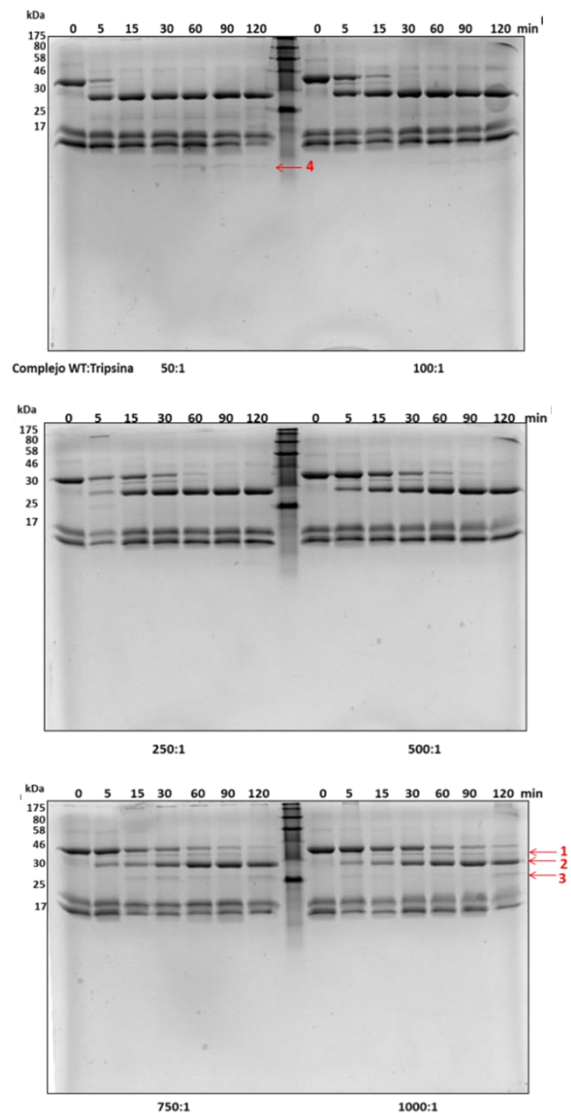


Figura 35. Proteólisis limitada del complejo SepL WT/SepD/CesL con tripsina.

Las bandas 1, 2 y 3 corresponden a diversas versiones truncas de SepL, mientras que en la banda 4 se identificaron dos péptidos correspondientes con secuencia similar a SepD y CesL.

Tabla 10.
Péptidos del complejo SepL/SepD/CesL
resistentes a proteólisis por tripsina

No. de banda	Péptidos identificados	Masa molecular predicha
1	SepL 73-351	32 kDa
2	SepL 127-342	25 kDa
3	SepL 211-333	14.5 kDa
4	SepD 61-69 CesL 7-26	3.6 kDa 3.6 kDa

SepL es una proteína de 351 aminoácidos, el fragmento SepL 127-342, que corresponde a la banda 2, es el más estable, lo cual sugiere que tanto la región amino como carboxilo de SepL son susceptibles a proteólisis. Sin embargo, la eliminación de los primeros 75 aminoácidos de SepL evita la formación del complejo SepL/SepD/CesL (dato no mostrado), por lo que es probable que SepL 127-342 tampoco sea capaz de formar complejo. Por otro lado, de acuerdo a la estructura del complejo YopN/SycN/YscB (Schubot et al., 2005), la región de interacción en YopN (SepL) con sus chaperonas abarca de los aminoácidos 32 al 76 y esta región no está presente en SepL 127-342.

Finalmente, el hecho de que en la banda 4 se hayan identificado dos péptidos correspondientes SepD y CesL, sugiere que probablemente parte del complejo SepL/SepD/CesL se está dissociando y el hecho de que estas dos proteínas se

encuentren en una misma banda podría indicar que probablemente estas regiones son importantes para la formación del heterodímero SepD/CesL.

Determinación de la estequiometría del complejo.

Para determinar la estequiometría del complejo SepL/SepD/CesL, realizamos experimentos de ultracentrifugación analítica. La ultracentrifugación analítica (AUC) es un método para el análisis cuantitativo de macromoléculas en solución que se basa en la detección de la sedimentación en tiempo real. En un experimento de velocidad de sedimentación, las macromoléculas se someten a un campo centrífugo elevado que promueve el transporte de macromoléculas hacia el fondo de la celda. Este método hidrodinámico de transporte permite fraccionar las macromoléculas con base en las diferencias en los coeficientes de sedimentación. Esto nos da información acerca del tamaño y forma de las macromoléculas y permite con ello estimar la estequiometría.

Realizamos experimentos de velocidad de sedimentación con los complejos SepL WT/SepD/CesL y SepL $\Delta 30$ /SepD/CesL. En la Figura 36 se observa la distribución de los coeficientes de sedimentación encontrados en cada complejo, para el complejo WT (Figura 36A) se encontraron dos poblaciones. El pico 1 corresponde a un complejo de 71.014 kDa, lo cual coincide con la masa molecular predicha para el complejo WT: 72.82 kDa, esto nos indica que la estequiometría del complejo en solución es 1:1:1 (SepL:SepD:CesL). El pico dos no es significativo pues representa solo el 3 % de la muestra. Para el caso del complejo $\Delta 30$, también se identificaron dos poblaciones, la mayoritaria tiene una masa molecular de 67.406

kDa, que coincide con la estimada para el complejo SepL Δ 30/SepD/CesL: 69.5 kDa, nuevamente observamos una estequiometría 1:1:1. El segundo pico observado es de 33.094 kDa, en este caso representa el 12.8 % de la muestra total. Probablemente se trate de una subpoblación del complejo que se disoció, la masa molecular de SepL Δ 30 es de 36.66 kDa, mientras que la del heterodímero SepD/CesL es de 32.8 kDa. El complejo Δ 30 parece ser menos estable que el WT. Cuando se cristalizó el complejo YopN/YscB/SycN en *Yersinia* se observó que la región amino de YopN (aminoácidos 32 al 76) unen a las chaperonas SycN/YscB (Schubot et al., 2005). Probablemente la delección de los primeros 30 aminoácidos de SepL desestabiliza un poco el sitio de unión a sus chaperonas.

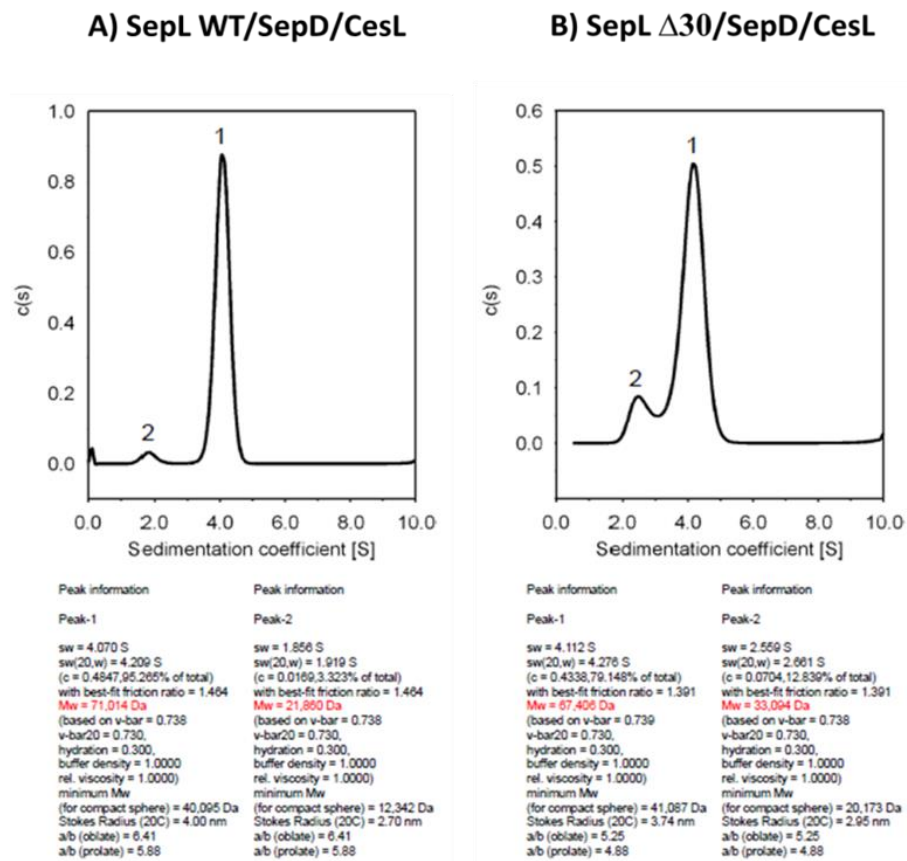


Figura 36. Distribución de los coeficientes de sedimentación del complejo SepL WT/SepD/CesL (A) y SepL Δ 30/SepD/CesL (B).

En 2015 se publicó el trabajo “Structural analysis of SepL, an enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion-system gatekeeper protein” en donde se determinó la estructura de SepL cuando se encuentra en complejo con SepD (Figura 37 (Burkinshaw, Souza et al., 2015)).

El modelo de SepL abarca los aminoácidos 80 a 348. La estructura consta de tres dominios similares en forma de X formados por 5 α -hélices, conectados por un asa.

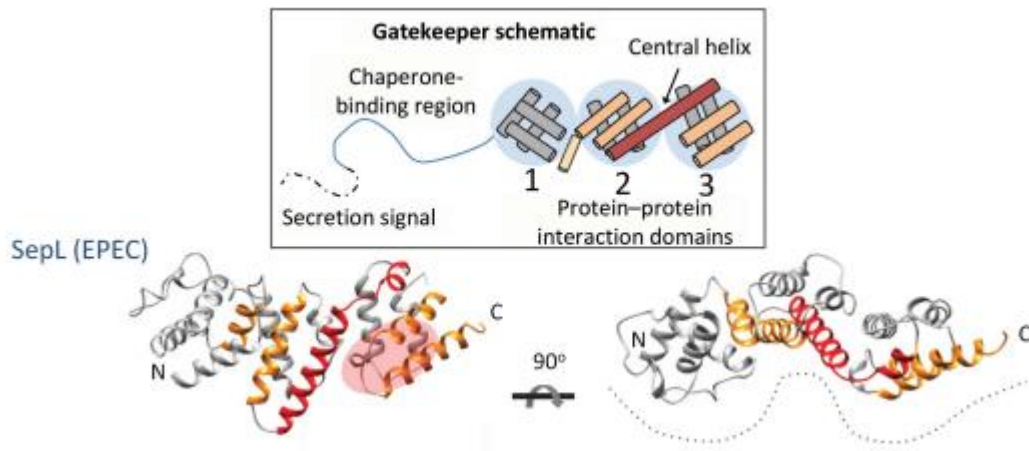


Figura 37. Representación plana y modelo tridimensional de la estructura terciaria de SepL. Tomada de (Burkinshaw et al., 2015).

DISCUSIÓN

El SST3 es un dispositivo multi-proteico complejo, su correcto ensamblaje y funcionamiento depende de la secreción ordenada de sustratos. Para que los efectores sean translocados directamente a la célula hospedera, primero se deben secretar y ensamblar las proteínas que forman el filamento y el poro de translocación (translocadores). Dado que todas las proteínas codificadas en el LEE, que son secretadas vía SST3 (EscI, EscF, EspA, EspB, EspD, EspG, EspZ, EspH, Map, Tir y EspF), se expresan al mismo tiempo (Yerushalmi et al., 2014), debe existir un mecanismo post-transcripcional que dicte el orden en que estas son secretadas. En EPEC, el complejo proteico SepL/SepD/CesL promueve la secreción de translocadores, y al mismo tiempo, evita la secreción prematura de efectores (Deng et al., 2005, Deng et al., 2004, Gaytan et al., 2016, Portaliou et al., 2017, Wang et al., 2008, Younis et al., 2010). Adicionalmente, se ha propuesto que la secreción de efectores en EPEC se activa en respuesta a cambios en la concentración de calcio (Deng et al., 2005, Shaulov et al., 2017). Sin embargo, se desconoce tanto el mecanismo molecular a través del cual el complejo SepL/SepD/CesL regula la secreción de sustratos como la participación del calcio en dicho proceso. Por lo anterior, en este trabajo evaluamos la conexión entre el calcio y la regulación de la secreción por el complejo SepL/SepD/CesL.

En trabajos anteriores se demostró que la eliminación de calcio del medio de cultivo reduce la secreción de translocadores e incrementa la secreción de efectores a través del SST3 de patógenos A/E (Deng et al., 2005, Ide et al., 2003,

Shaulov et al., 2017). En este trabajo observamos que la ausencia de calcio en el medio de crecimiento de EPEC incrementa la secreción de efectores codificados dentro y fuera del LEE, sin embargo, aunque la secreción de translocadores tiende a reducirse en ausencia de calcio, este cambio no es estadísticamente significativo (Figura 14). Esta discrepancia en el efecto del calcio sobre la secreción de translocadores podría atribuirse a diferencias en las condiciones experimentales o bien, al uso de agentes quelantes, como EGTA y BAPTA para eliminar el calcio (Deng et al., 2005, Ide et al., 2003), ya que estos se unen a otros cationes multivalentes como el hierro y el magnesio, lo cuales también influyen en la secreción de sustratos dependiente del SST3 (Gode-Potratz, Chodur et al., 2010, Kenny et al., 1997a, Sarty, Baker et al., 2012). Los resultados que obtuvimos son consistentes con un trabajo previo en donde se reportó que los niveles de calcio afectan la secreción de efectores pero no la de translocadores a través del SST3 de *P. aeruginosa* (Cisz, Lee et al., 2008), de hecho, recientemente se propuso que la secreción de translocadores y efectores podría estar regulada por distintas señales ambientales (Roehrich et al., 2017). Adicionalmente, demostramos por primera vez, que la secreción del sustrato temprano Escl no es regulada por calcio (Figuras 14 y 15), por lo que podemos concluir que el calcio solo afecta la secreción de sustratos tardíos.

Se ha propuesto que el ensamblaje del poro de translocación en la membrana de la célula hospedera permite la detección de las señales ambientales que activan la translocación de efectores (Deng et al., 2005, Lee, Mazmanian et al., 2001). Ante este escenario, era lógico pensar que los componentes del poro de

translocación, expuestos directamente a los cambios en la concentración de calcio, estarían involucrados en la detección de la señal que induce la secreción de efectores, mientras que las estructuras que conectan el poro de translocación con la base del SST3 (filamento, aguja y eje) podrían estar involucradas en la transmisión de dicha señal. Sin embargo, contrario a lo esperado, en este trabajo demostramos que las proteínas que forman el poro de translocación y el filamento (EspB, EspD y EspA) no están implicadas en la detección o transmisión del estímulo de bajo calcio (Figura 16). Lo anterior también se ha observado en *S. enterica* y *P. aeruginosa*, donde se demostró que cambios en señales químicas como el pH y la concentración de calcio, respectivamente, inducen la secreción de efectores aún en ausencia de los translocadores (Cisz et al., 2008, Yu et al., 2010). El hecho de que los translocadores sean esenciales para la translocación de efectores tras el contacto celular *in vivo* (Armentrout & Rietsch, 2016, Cisz et al., 2008, Urbanowski, Brutinel et al., 2007), pero dispensables para la activación de la secreción de efectores en respuesta a cambios en la concentración de calcio *in vitro* (Cisz et al., 2008, Lee, Stopford et al., 2010) nos hace cuestionar la participación del calcio en la activación de la secreción *in vivo* y suponer que el efecto que observamos *in vitro* probablemente se dé por la detección del calcio a través de la aguja o el eje, como se ha demostrado en *S. flexneri* y *Y. pestis* (Deane, Roversi et al., 2006, El Hajjami, Moussa et al., 2017, Kenjale, Wilson et al., 2005, Torruellas, Jackson et al., 2005). Sin embargo, no se pudo analizar la participación de estos dos componentes en la transmisión de la señal de bajo calcio ya que la eliminación de EscI o EscF resulta en la pérdida total de la secreción (Figura 17). Una alternativa que se ha propuesto en fechas recientes es

que las señales químicas podrían difundir a través del canal de secreción, modificando así de manera directa a las proteínas del SST3 involucradas en la regulación de la secreción (Notti & Stebbins, 2016, Portaliou et al., 2016, Shaulov et al., 2017, Yu et al., 2010).

El efecto que tiene la eliminación de calcio sobre la secreción de sustratos es similar al fenotipo de secreción de las mutantes nulas en los genes *sepL*, *sepD* y *cesL* (Figuras 11 y 14, (Deng et al., 2005)). El complejo formado por las proteínas SepL, SepD y CesL es homólogo al complejo SsaL/SpiC/SsaM de *S. enterica* (Younis et al., 2010). *S. enterica* es un patógeno intracelular que se replica en vacuolas ácidas, bajo estas condiciones (pH 5), el complejo SsaL/SpiC/SsaM se asocia a la membrana y evita la secreción de efectores mientras promueve la salida de translocadores. Las proteínas translocadoras forman un poro en la membrana de la vacuola que permite la detección de un cambio en el pH (de 5 en el lumen de la vacuola a 7.2 en el citosol), este cambio promueve la disociación y degradación del complejo SsaL/SpiC/SsaM lo cual resulta en la secreción de efectores (Yu et al., 2010). SepL y SsaL comparten más del 40 % de similitud de secuencia y ninguna de estas dos proteínas es secretada través del sistema, adicionalmente, SepL es capaz de complementar parcialmente el fenotipo de una mutante nula en el gen *ssaL* (Coombes, Brown et al., 2004, Younis et al., 2010). Lo anterior nos llevó a pensar que el complejo SepL/SepD/CesL podría regular la secreción de sustratos en respuesta a cambios en la concentración de calcio empleando un mecanismo similar al del complejo SsaL/SpiC/SsaM. Sin embargo, nuestros resultados arrojaron que el calcio no tiene un efecto sobre la formación

del complejo SepL/SepD/CesL o el perfil de estabilidad y distribución celular de sus componentes (Figura 21, 23, 24 y 25), indicando que el complejo regulatorio SepL/SepD/CesL no es blanco de regulación por calcio.

El efecto del calcio sobre la secreción de efectores parece ser un tema general, ya que se ha observado en bacterias filogenéticamente distantes como *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Chlamydia*, *Vibrio* y patógenos A/E (Cisz et al., 2008, Deng et al., 2005, Gode-Potratz et al., 2010, Ide et al., 2003, Jamison & Hackstadt, 2008, Kim, Ahn et al., 2005, Michiels, Wattiau et al., 1990, Sarty et al., 2012, Shaulov et al., 2017). Además, considerando que los translocadores no detectan la señal de calcio y que el complejo regulatorio SepL/SepD/CesL no está involucrado en la inducción de la secreción de efectores en respuesta a bajas concentraciones de calcio, proponemos que el mecanismo molecular que induce la secreción de efectores al eliminar el calcio del medio *in vitro* es distinto al que promueve la translocación de proteínas *in vivo*, tras el contacto celular. Esta hipótesis se sustenta en el trabajo realizado por Cisz *et al*, donde se demuestra que el incremento en los niveles intracelulares de calcio no afecta la translocación de efectores hacia la célula hospedera *in vivo* (Cisz et al., 2008). En conclusión, la influencia del calcio sobre la secreción de efectores solo es un efecto *in vitro* que parece no tener relevancia fisiológica, sin embargo se requieren más estudios para comprobar esta aseveración en EPEC.

Durante la realización de este trabajo, se publicó un artículo en el que se demuestra que la proteína SepL interacciona con EscP de manera dependiente

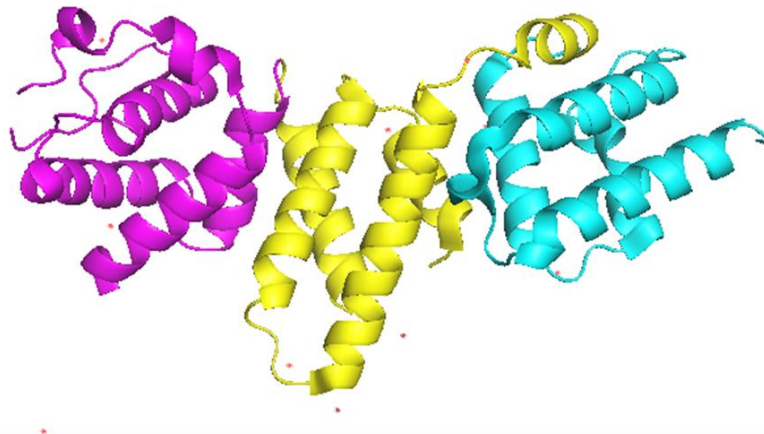
de calcio (Shaulov et al., 2017). La proteína EscP funciona como una regla molecular que regula la longitud de la aguja, sin embargo, también está implicada en la regulación de la secreción de sustratos ya que la eliminación del gen *escP* resulta en la disminución de la secreción de translocadores y en el aumento en la secreción de efectores (Monjaras Feria et al., 2012). El modelo de regulación propuesto por Shaulov et al plantea que el flujo de calcio a través del canal de secreción cambia la concentración local de este ion en la base del SST3, cuando esta se reduce, se induce la disociación del complejo SepL/EscP y esto a su vez, activa la secreción de efectores (Shaulov et al., 2017).

Los datos anteriores sugieren que el mecanismo molecular que induce la secreción de efectores *in vitro* ocurre de manera independiente de los translocadores (Figura 16) e involucra al complejo SepL/EscP (Shaulov et al., 2017), sin embargo, los elementos y el mecanismo a través del cual se regula la translocación de efectores *in vivo* aún son desconocidos. Como un primer acercamiento, decidimos identificar nuevos blancos de regulación de la secreción, para ello, evaluamos la interacción de SepL con diversos componentes del SST3.

Se sabe que SepL y sus homólogos interaccionan con varios componentes del SST3 (Archuleta & Spiller, 2014, Botteaux et al., 2009, Cherradi et al., 2013, Day & Plano, 1998, Kubori & Galan, 2002, Lee et al., 2014, Roehrich et al., 2017, Shen & Blocker, 2016, Silva-Herzog et al., 2011, Stone, Johnson et al., 2008). En EPEC, además de formar el complejo SepL/SepD/CesL, SepL se une al efector Tir, al

dominio citoplásmico de la proteína EscD (Wang et al., 2008) y a la regla molecular EscP (Shaulov et al., 2017). En este trabajo demostramos mediante ensayos de copurificación *in vitro*, que SepL tiene la capacidad de interactuar con los componentes del complejo ATPasa: EscN, EscO y EscL, así como con la subunidad del eje (EscI) y con el dominio citoplásmico del componente principal de la puerta de exportación, EscV (Figuras 26 y 27).

SepL es una proteína de 351 aminoácidos, su estructura, al igual que la de sus homólogos, consta de tres dominios formados por 5 α -hélices ordenadas en forma de X (Figura 38)(Archuleta & Spiller, 2014, Burkinshaw et al., 2015, Deane et al., 2008, Nawrotek, Guimaraes et al., 2014, Schubot et al., 2005). La similitud estructural de sus tres dominios sugiere que podrían ser el resultado de un evento de duplicación génica. Esta estrategia ha sido empleada a lo largo de la evolución para la ampliación del área de superficie expuesta de diversas proteínas. Esta característica es típica de proteínas de andamiaje que participan en el reclutamiento de múltiples proteínas (Andrade, Perez-Iratxeta et al., 2001, Deane et al., 2008). Adicionalmente, SepL tiene una estructura elongada y posee una superficie cargada negativamente (Burkinshaw et al., 2015, Deane et al., 2008, Roehrich, Guillosoy et al., 2013). Todas estas características sugieren que SepL tiene la capacidad intrínseca de unirse a múltiples parejas de interacción, por lo que es importante evaluar la relevancia fisiológica de las interacciones descritas en este trabajo.



Porcentaje de identidad de secuencia de los dominios de SepL

	Dominio 2	Dominio 3
Dominio 1	20.59 %	21.21 %

Figura 38. Esquema de la estructura terciaria de SepL. El modelo de SepL (PDB: 5C9E) está formado por tres dominios de 5 α -hélices ordenadas en forma de X. El dominio 1 (magenta) abarca los aminoácidos 80-172. El segundo dominio (amarillo) comprende los aminoácidos 173 a 266, mientras que el dominio 3 (cian) va del 267 al 350. El modelo se editó en PyMOL. En la parte inferior se muestra una matriz de identidad de secuencia de los dominios de SepL generada con Clustal 2.1.

Interacción de SepL con la subunidad del eje Escl. La interacción entre SepL y la subunidad del eje está conservada en los SST3 de *Salmonella* (InvE-PrgJ), *Yersinia* (YopN-YscI) y *Shigella* (MxiC-MxiI); en este último se demostró que la disociación del complejo MxiC-MxiI promueve la salida de efectores (Cherradi et al., 2013). Esto se corroboró en un trabajo reciente en donde se observó que una mutante puntual en el eje (MxiI T82R/K), que pierde su capacidad de interactuar con MxiC, desregula la secreción de sustratos, por lo que los autores sugieren que la señal que activa la secreción de sustratos se transmite a través del eje hasta MxiC (El Hajjami et al., 2017).

Interacción de SepL con los componentes del complejo ATPasa. A pesar de que la proteína SepL no se secreta, tiene, al igual que cualquier sustrato del SST3, una señal de secreción en el extremo N-terminal y además, se une a dos proteínas (SepD y CesL) que se cree funcionan como chaperonas, por lo anterior, a SepL se le denominó como un efector aberrante (Younis et al., 2010). Además de proveer la energía para la secreción, las ATPasas de los SST3 se encargan del reconocimiento de sustratos, el cual está mediado, en parte, por la señal de secreción (Andrade et al., 2007, Gauthier & Finlay, 2003, Sorg, Blaylock et al., 2006). Por lo anterior, es posible que la ATPasa EscN esté reconociendo a SepL como un sustrato de secreción. Esto mismo ocurre en *Shigella*, en donde el homólogo de SepL (MxiC) interacciona con la ATPasa Spa47 a través de su señal de secreción (Botteaux et al., 2009, Cherradi et al., 2013).

En este trabajo identificamos por primera vez la interacción de SepL con los otros dos componentes del complejo ATPasa: EscL y EscO, que fungen como reguladores negativo y positivo de la ATPasa, respectivamente (Romo-Castillo et al., 2014). Se ha demostrado que ambos tienen la capacidad de interactuar con sustratos del SST3 (Ku, Lio et al., 2009, Lin, Sun et al., 2014), por lo que es probable que SepL también sea reconocida por estas dos proteínas como un sustrato de secreción.

Interacción de SepL con EscV y su papel en el reconocimiento de sustratos.

Además de los componentes del complejo ATPasa, en otros sistemas se ha demostrado que los homólogos de EscV están involucrados en el reconocimiento

de sustratos (Bange et al., 2010, Hartmann & Buttner, 2013, Kinoshita et al., 2013, Minamino, Kinoshita et al., 2012). De hecho, en el sistema flagelar se observó que la afinidad de unión de los complejos chaperona-sustrato por FlhA (homólogo de EscV) refleja el orden en que estos son secretados (Kinoshita et al., 2013). En este trabajo demostramos que el dominio citoplásmico de EscV tiene la capacidad de interactuar tanto con sustratos intermedios como con sustratos tardíos (Figura 32).

Por otro lado, se sabe que los homólogos de EscV en *P. aeruginosa* (PcrD) y *S. flexneri* (MxiA) interactúan con el homólogo de SepL (PopN/Pcr1 y MxiC, respectivamente) (Lee et al., 2014, Shen & Blocker, 2016). A diferencia de las otras interacciones descritas, esta es la única que se ha probado en presencia y ausencia de calcio, y al igual que nosotros, en *Pseudomonas* encontraron que esta interacción no es sensible a calcio (Lee et al., 2014). Interesantemente, se observó que mutaciones en PcrD y MxiA que interfieren con su unión a Pcr1 o MxiC, respectivamente, provocan la desregulación de la secreción de efectores (Lee et al., 2014, Shen & Blocker, 2016), sugiriendo que esta interacción es relevante para la regulación de la secreción. En este trabajo demostramos que SepL interactúa con EscV (Figura 27), y mapeamos esta interacción a los últimos 11 aminoácidos de SepL (Figura 29). Notablemente, SepL Δ C11 es incapaz de complementar el fenotipo de secreción de una mutante nula en el gen *sepL* (Figura 31). Sin embargo, no podemos concluir que existe una correlación directa entre la incapacidad de SepL Δ C11 de complementar una Δ *sepL* y su inhabilidad de interactuar con EscV puesto que se ha reportado que los últimos 11

aminoácidos de SepL también median su interacción con las proteínas EscD y Tir (Wang et al., 2008). De acuerdo al modelo propuesto por Wang *et al* la interacción de SepL con Tir retrasa la secreción de efectores (ya que la secreción de Tir es requerida la secreción de otros efectores (Thomas, Deng et al., 2007)), mientras que su interacción con EscD libera a Tir, permitiendo su secreción (Wang et al., 2008).

A pesar de que SepL tiene la capacidad de interactuar con múltiples componentes del SST3, el hecho de que al menos tres de estas proteínas interactúen con la misma región de SepL sugiere que la asociación de SepL con sus parejas de interacción podría ser dinámica. Esta compleja red de interacciones en la que participa SepL podría ser el reflejo de las diferentes capas de regulación requeridas para orquestar la secreción de sustratos.

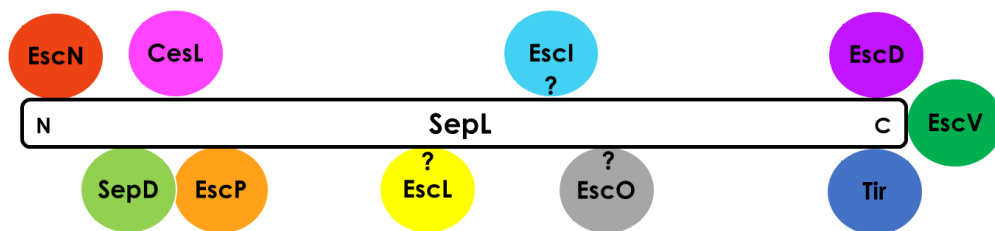


Figura 39. Esquema lineal de las interacciones de SepL. Por reportes previos se sabe que SepL interactúa con CesL y SepD entre los aminoácidos 30 al 75 y que las interacciones de SepD y EscP con SepL son excluyentes (Shaulov et al., 2017), mientras que Wang *et al* reportó que el dominio C-terminal de SepL media la interacción con EscD y Tir (Wang et al., 2008). En este trabajo demostramos que SepL se une a EscN (probablemente a través del N-terminal) y a EscV a través de los últimos 11 aminoácidos de SepL. Adicionalmente, se reportó la interacción de SepL con EscL y EscO, sin embargo aún no se tienen indicios de los sitios de interacción. La interacción entre SepL y la subunidad del eje, EscI, está mediada por el aminoácido 206 de MxiC, el homólogo de SepL en *Shigella*, por lo que se representó alrededor de la región cercana al aminoácido 200 de SepL.

Finalmente, en este trabajo identificamos la unión directa de sustratos a las proteínas que forman la plataforma de clasificación EscQ, EscK y EscL (Figura 33). Datos preliminares del laboratorio indican que SepL también tiene la capacidad de interaccionar con EscK, agregando una capa más de complejidad a la regulación de la secreción de sustratos.

La mayoría de las parejas de interacción de SepL están involucradas en el reconocimiento de sustratos (EscN, EscO, EscL, EscV y EscK) lo cual probablemente se deba a que SepL tiene todas las características de los sustratos de secreción. Lo anterior nos llevó a proponer que SepL podría actuar como un caballo de Troya que se hace pasar por sustrato para ser reconocido por toda la maquinaria de exportación, pero al no poder ser secretado bloquea al sistema en los distintos puntos de regulación de la secreción.

La proteína SepL lleva a cabo dos funciones: promueve la salida de translocadores y al mismo tiempo bloquea la secreción de efectores, por lo que es posible que la regulación de la secreción ejercida por SepL se lleve a cabo a través de dos mecanismos: por un lado, que al ser reconocido como efector bloquee de manera física el sitio de unión de otros efectores y que a su vez, esta unión aumente la afinidad de sus proteínas blanco (EscN, EscO, EscL, EscV y EscK) por translocadores. En el caso particular de EscV, recientemente se publicó un trabajo en donde reportan que su interacción con SepL aumenta la afinidad de los complejos chaperona-translocador por EscV, en cambio, en ausencia de SepL

los complejos chaperona-efector son reconocidos con mayor afinidad que los complejos chaperona-translocador (Portaliou et al., 2017).

Dada la complejidad de la red de interacciones que regula la secreción de sustratos así como su naturaleza dinámica es importante realizar estudios *in vivo* que permitan analizar, en un contexto fisiológico, la importancia de cada una de las interacciones descritas en el proceso de translocación de sustratos a través del SST3 de EPEC.

CONCLUSIONES

- La eliminación de calcio del medio de cultivo induce únicamente la secreción de sustratos tardíos (efectores) a través del SST3 de EPEC.
- Las proteínas translocadoras (EspA, EspB y EspD) no participan en la detección de los niveles de calcio.
- El complejo regulatorio SepL/SepD/CesL es insensible a variaciones en la concentración de calcio.
- SepL interacciona, de manera independiente de calcio, con EscN, EscO, EscL, EscI y EscV.
- Los últimos 11 aminoácidos de SepL median su interacción con EscV.
- El dominio C-terminal de SepL es importante para la regulación de la secreción.
- El componente principal de la puerta de exportación EscV y los integrantes de la plataforma de clasificación (EscK, EscL y EscQ) sirven como sitios de unión de sustratos intermedios y tardíos.

PERSPECTIVAS

- Determinar si cambios en la concentración intracelular de calcio afectan la translocación de efectores *in vivo*, a través del SST3 de EPEC.
- A pesar de que la ausencia de calcio activa la secreción de efectores *in vitro*, aún se desconoce la verdadera señal fisiológica que promueve el cambio en la secreción de sustratos intermedios a tardíos, por lo que es de vital importancia identificarla.
- Cada día hay más evidencias de que el mero contacto físico entre el SST3 y la membrana de la célula hospedera induce cambios en el sistema. Sin embargo, falta evaluar los cambios que sufren las proteínas formadoras del poro (EspB y EspD) o aquellas que ensamblan los apéndices que funcionan como puente entre la bacteria y la célula hospedera (EspA, EscF y EscI) tras el contacto celular así como su papel en la detección o transmisión de dicha señal.
- Dado el fenotipo de las mutantes en los componentes del complejo SepL/SepD/CesL es imposible descartar su participación en la regulación de la secreción, pero queda para un futuro demostrar su implicación en los procesos de infección por EPEC. Es decir, si *in vivo*, probablemente en respuesta al contacto celular, el complejo sufra alguna modificación que altere su función regulatoria.

- Evaluar la relevancia fisiológica de las interacciones descritas así como su naturaleza dinámica.
- Mapear el sitio de interacción de SepL y otros efectores en los blancos de unión de SepL implicados en el reconocimiento de sustratos (EscN, EscL, EscO y EscV) para determinar si SepL y los efectores compiten por el mismo sitio de unión.
- Evaluar la afinidad de las distintas clases de sustratos (intermedios y tardíos) por EscV, EscN, EscO, EscL, EscK y EscQ solas o en complejo con SepL.

REFERENCIAS

- Abby SS, Rocha EP (2012) The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. *PLoS Genet* 8: e1002983
- Akeda Y, Galan JE (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* 437: 911-5
- Alegria MC, Docena C, Khater L, Ramos CH, da Silva AC, Farah CS (2004) New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri. *J Bacteriol* 186: 6186-97
- Andrade A, Pardo JP, Espinosa N, Perez-Hernandez G, Gonzalez-Pedrajo B (2007) Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Arch Biochem Biophys* 468: 121-7
- Andrade MA, Perez-Iratxeta C, Ponting CP (2001) Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J Struct Biol* 134: 117-31
- Archuleta TL, Spiller BW (2014) A Gatekeeper Chaperone Complex Directs Translocator Secretion during Type Three Secretion. *PLoS Pathog* 10: e1004498
- Armentrout EI, Rietsch A (2016) The Type III Secretion Translocation Pore Senses Host Cell Contact. *PLoS Pathog* 12: e1005530
- Arnold R, Brandmaier S, Kleine F, Tischler P, Heinz E, Behrens S, Niinikoski A, Mewes HW, Horn M, Rattei T (2009) Sequence-based prediction of type III secreted proteins. *PLoS Pathog* 5: e1000376
- Bange G, Kummerer N, Engel C, Bozkurt G, Wild K, Sinning I (2010) FlhA provides the adaptor for coordinated delivery of late flagella building blocks to the type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11295-300
- Biemans-Oldehinkel E, Sal-Man N, Deng W, Foster LJ, Finlay BB (2011) Quantitative proteomic analysis reveals formation of an EscL-EscQ-EscN type III complex in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 193: 5514-9
- Botteaux A, Sory MP, Biskri L, Parsot C, Allaoui A (2009) MxiC is secreted by and controls the substrate specificity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Mol Microbiol* 71: 449-60
- Bray J (1945) Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neopolitanum* from summer diarrhoea of infants. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 57: 239-247
- Burkinshaw BJ, Souza SA, Strynadka NC (2015) Structural analysis of SepL, an enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion-system gatekeeper protein. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 71: 1300-8
- Buttner D (2012) Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 262-310
- Buttner D, Lorenz C, Weber E, Bonas U (2006) Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* 59: 513-27
- Cisz M, Lee PC, Rietsch A (2008) ExoS controls the cell contact-mediated switch to effector secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190: 2726-38
- Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, Knutton S (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150: 527-38
- Coburn B, Sekirov I, Finlay BB (2007) Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev* 20: 535-49
- Connolly JP, Finlay BB, Roe AJ (2015) From ingestion to colonization: the influence of the host environment on regulation of the LEE encoded type III secretion system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 6: 568

Coombes BK, Brown NF, Valdez Y, Brumell JH, Finlay BB (2004) Expression and secretion of Salmonella pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J Biol Chem* 279: 49804-15

Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4: 811-25

Creasey EA, Delahay RM, Daniell SJ, Frankel G (2003) Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 149: 2093-106

Crepin VF, Collins JW, Habibzay M, Frankel G (2016) *Citrobacter rodentium* mouse model of bacterial infection. *Nat Protoc* 11: 1851-76

Crepin VF, Prasannan S, Shaw RK, Wilson RK, Creasey E, Abe CM, Knutton S, Frankel G, Matthews S (2005) Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ. *Mol Microbiol* 55: 1658-70

Crepin VF, Shaw R, Abe CM, Knutton S, Frankel G (2005) Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. *J Bacteriol* 187: 2881-9

Cheng LW, Kay O, Schneewind O (2001) Regulated secretion of YopN by the type III machinery of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 183: 5293-301

Cherradi Y, Schiavolin L, Moussa S, Meghraoui A, Meksem A, Biskri L, Azarkan M, Allaoui A, Botteaux A (2013) Interplay between predicted inner-rod and gatekeeper in controlling substrate specificity of the type III secretion system. *Mol Microbiol* 87: 1183-99

Dale C, Young SA, Haydon DT, Welburn SC (2001) The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *P Natl Acad Sci USA* 98: 1883-1888

Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-5

Day JB, Plano GV (1998) A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* 30: 777-88

Dean P, Kenny B (2009) The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol* 12: 101-9

Deane JE, Roversi P, Cordes FS, Johnson S, Kenjale R, Daniell S, Booy F, Picking WD, Picking WL, Blocker AJ, Lea SM (2006) Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12529-33

Deane JE, Roversi P, King C, Johnson S, Lea SM (2008) Structures of the *Shigella flexneri* type 3 secretion system protein MxiC reveal conformational variability amongst homologues. *J Mol Biol* 377: 985-92

Deng W, Li Y, Hardwidge PR, Frey EA, Pfuetzner RA, Lee S, Gruenheid S, Strynadka NC, Puente JL, Finlay BB (2005) Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun* 73: 2135-46

Deng W, Li Y, Vallance BA, Finlay BB (2001) Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect Immun* 69: 6323-35

Deng W, Marshall NC, Rowland JL, McCoy JM, Worrall LJ, Santos AS, Strynadka NCJ, Finlay BB (2017) Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 15: 323-337

Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P, Ashman K, Lee S, Goode D, Pawson T, Finlay BB (2004) Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3597-602

Deng W, Yu HB, de Hoog CL, Stoyinov N, Li Y, Foster LJ, Finlay BB (2012) Quantitative proteomic analysis of type III secretome of enteropathogenic *Escherichia coli* reveals an expanded effector repertoire for attaching/effacing bacterial pathogens. *Mol Cell Proteomics* 11: 692-709

- Diepold A, Amstutz M, Abel S, Sorg I, Jenal U, Cornelis GR (2010) Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J* 29: 1928-40
- Donnenberg MS (2013) *Escherichia Coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis*, 2nd Edition. *Escherichia Coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis*, 2nd Edition: 1-576
- Donnenberg MS, Kaper JB (1992) Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 60: 3953-61
- Duncan MC, Lington RG, Auerbuch V (2012) Chemical inhibitors of the type three secretion system: disarming bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 5433-41
- El Hajjami N, Moussa S, Houssa J, Monteyne D, Perez-Morga D, Botteaux A (2017) The inner-rod component of *Shigella flexneri* type 3 secretion system, Mxil, is involved in the transmission of the secretion activation signal by its interaction with MxiC. *Microbiologyopen*
- Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Donnenberg MS, Kaper JB (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 28: 1-4
- Erhardt M, Mertens ME, Fabiani FD, Hughes KT (2014) ATPase-independent type-III protein secretion in *Salmonella enterica*. *PLoS Genet* 10: e1004800
- Erhardt M, Namba K, Hughes KT (2010) Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000299
- Fujii T, Cheung M, Blanco A, Kato T, Blocker AJ, Namba K (2012) Structure of a type III secretion needle at 7-A resolution provides insights into its assembly and signaling mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 4461-6
- Garcia-Angulo VA, Martinez-Santos VI, Villasenor T, Santana FJ, Huerta-Saquero A, Martinez LC, Jimenez R, Lara-Ochoa C, Tellez-Sosa J, Bustamante VH, Puente JL (2012) A distinct regulatory sequence is essential for the expression of a subset of *nle* genes in attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 194: 5589-603
- Gauthier A, Finlay BB (2003) Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 6747-55
- Gauthier A, Puente JL, Finlay BB (2003) Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* 71: 3310-9
- Gaytan MO, Martinez-Santos VI, Soto E, Gonzalez-Pedrajo B (2016) Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 6: 129
- Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254: 710-3
- Giron JA, Torres AG, Freer E, Kaper JB (2002) The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* 44: 361-79
- Gode-Potratz CJ, Chodur DM, McCarter LL (2010) Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 192: 6025-38
- Hartmann N, Buttner D (2013) The inner membrane protein HrcV from *Xanthomonas* spp. is involved in substrate docking during type III secretion. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 1176-89
- Hayward RD, Leong JM, Koronakis V, Campellone KG (2006) Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. *Nat Rev Microbiol* 4: 358-70
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP (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: 77-86
- Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433

- Ide T, Laarmann S, Greune L, Schillers H, Oberleithner H, Schmidt MA (2001) Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 3: 669-79
- Ide T, Michgehl S, Knappstein S, Heussipp G, Schmidt MA (2003) Differential modulation by Ca²⁺ of type III secretion of diffusely adhering enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 71: 1725-32
- Jamison WP, Hackstadt T (2008) Induction of type III secretion by cell-free *Chlamydia trachomatis* elementary bodies. *Microb Pathog* 45: 435-40
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123-40
- Kenjale R, Wilson J, Zenk SF, Saurya S, Picking WL, Picking WD, Blocker A (2005) The needle component of the type III secretion of *Shigella* regulates the activity of the secretion apparatus. *J Biol Chem* 280: 42929-37
- Kenny B (1999) Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* 31: 1229-41
- Kenny B, Abe A, Stein M, Finlay BB (1997a) Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 65: 2606-12
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB (1997b) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91: 511-20
- Kim J, Ahn K, Min S, Jia J, Ha U, Wu D, Jin S (2005) Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 151: 3575-87
- Kinoshita M, Hara N, Imada K, Namba K, Minamino T (2013) Interactions of bacterial flagellar chaperone-substrate complexes with FlhA contribute to co-ordinating assembly of the flagellar filament. *Mol Microbiol* 90: 1249-61
- Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G, Frankel G (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* 17: 2166-76
- Korotkov KV, Gonen T, Hol WG (2011) Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends Biochem Sci* 36: 433-43
- Kresse AU, Schulze K, Deibel C, Ebel F, Rohde M, Chakraborty T, Guzman CA (1998) Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180: 4370-9
- Ku CP, Lio JC, Wang SH, Lin CN, Syu WJ (2009) Identification of a third EspA-binding protein that forms part of the type III secretion system of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 284: 1686-93
- Kubori T, Galan JE (2002) *Salmonella* type III secretion-associated protein InvE controls translocation of effector proteins into host cells. *J Bacteriol* 184: 4699-708
- Lackner G, Moebius N, Hertweck C (2011) Endofungal bacterium controls its host by an hrp type III secretion system. *Isme J* 5: 252-261
- Lara-Tejero M, Kato J, Wagner S, Liu X, Galan JE (2011) A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science* 331: 1188-91
- Lee PC, Stopford CM, Svenson AG, Rietsch A (2010) Control of effector export by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion proteins PcrG and PcrV. *Mol Microbiol* 75: 924-41
- Lee PC, Zmina SE, Stopford CM, Toska J, Rietsch A (2014) Control of type III secretion activity and substrate specificity by the cytoplasmic regulator PcrG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2027-36
- Lee VT, Mazmanian SK, Schneewind O (2001) A program of *Yersinia enterocolitica* type III secretion reactions is activated by specific signals. *J Bacteriol* 183: 4970-8

- Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, Waterman DH, Hornick RB, Young CR, Sotman S (1978) *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* 1: 1119-22
- Lin CN, Sun WS, Lu HY, Ng SC, Liao YS, Syu WJ (2014) Protein interactions and regulation of EscA in enterohemorrhagic *E. coli*. *PLoS One* 9: e85354
- Liu LY, Nie P, Yu HB, Xie HX (2017) Regulation of type III secretion of translocon and effector proteins by the EsaB/EsaL/EsaM complex in *Edwardsiella tarda*. *Infect Immun*
- Loquet A, Sgourakis NG, Gupta R, Giller K, Riedel D, Goosmann C, Griesinger C, Kolbe M, Baker D, Becker S, Lange A (2012) Atomic model of the type III secretion system needle. *Nature* 486: 276-9
- Luo Y, Frey EA, Pfuetzner RA, Creagh AL, Knoechel DG, Haynes CA, Finlay BB, Strynadka NC (2000) Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* 405: 1073-7
- McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1664-8
- McDaniel TK, Kaper JB (1997) A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* 23: 399-407
- Mellies JL, Navarro-Garcia F, Okeke I, Frederickson J, Nataro JP, Kaper JB (2001) espC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect Immun* 69: 315-24
- Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert JM, Cornelis G (1990) Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* 58: 2840-9
- Mills E, Baruch K, Aviv G, Nitzan M, Rosenshine I (2013) Dynamics of the type III secretion system activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *MBio* 4
- Minamino T, Imada K, Namba K (2008) Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol Biosyst* 4: 1105-15
- Minamino T, Kinoshita M, Hara N, Takeuchi S, Hida A, Koya S, Glenwright H, Imada K, Aldridge PD, Namba K (2012) Interaction of a bacterial flagellar chaperone FlgN with FlhA is required for efficient export of its cognate substrates. *Mol Microbiol* 83: 775-88
- Minamino T, Shimada M, Okabe M, Saijo-Hamano Y, Imada K, Kihara M, Namba K (2010) Role of the C-terminal cytoplasmic domain of FlhA in bacterial flagellar type III protein export. *J Bacteriol* 192: 1929-36
- Monjaras Fera J, Garcia-Gomez E, Espinosa N, Minamino T, Namba K, Gonzalez-Pedrajo B (2012) Role of EscP (Orf16) in injectisome biogenesis and regulation of type III protein secretion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 194: 6029-45
- Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* 41: 1340-51
- Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201
- Nawrotek A, Guimaraes BG, Velours C, Subtil A, Knossow M, Gigant B (2014) Biochemical and structural insights into microtubule perturbation by CopN from *Chlamydia pneumoniae*. *J Biol Chem* 289: 25199-210
- Notti RQ, Stebbins CE (2016) The Structure and Function of Type III Secretion Systems. *Microbiol Spectr* 4
- O'Connell CB, Creasey EA, Knutton S, Elliott S, Crowther LJ, Luo W, Albert MJ, Kaper JB, Frankel G, Donnenberg MS (2004) SepL, a protein required for enteropathogenic *Escherichia coli* type III translocation, interacts with secretion component SepD. *Mol Microbiol* 52: 1613-25
- Ogino T, Ohno R, Sekiya K, Kuwae A, Matsuzawa T, Nonaka T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Abe A (2006) Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188: 2801-11

Ohnishi K, Fan F, Schoenhals GJ, Kihara M, Macnab RM (1997) The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly. *J Bacteriol* 179: 6092-9

Ohnishi K, Ohto Y, Aizawa S, Macnab RM, Iino T (1994) FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 176: 2272-81

Okuda J, Takeuchi Y, Nakai T (2014) Type III secretion system genes of *Edwardsiella tarda* associated with intracellular replication and virulence in zebrafish. *Dis Aquat Organ* 111: 31-9

Origgi FC, Benedicenti O, Segner H, Sattler U, Wahli T, Frey J (2017) *Aeromonas salmonicida* type III secretion system-effectors-mediated immune suppression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 60: 334-345

Pallen MJ, Beatson SA, Bailey CM (2005) Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol* 5: 9

Pearson JS, Giogha C, Wong Fok Lung T, Hartland EL (2016) The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. *Annu Rev Genet* 50: 493-513

Pires SM, Fischer-Walker CL, Lanata CF, Devleeschauwer B, Hall AJ, Kirk MD, Duarte AS, Black RE, Angulo FJ (2015) Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. *PLoS One* 10: e0142927

Portaliou AG, Tsolis KC, Loos MS, Balabanidou V, Rayo J, Tsigotaki A, Crepin VF, Frankel G, Kalodimos CG, Karamanou S, Economou A (2017) Hierarchical protein targeting and secretion is controlled by an affinity switch in the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO J* 36: 3517-3531

Portaliou AG, Tsolis KC, Loos MS, Zorzini V, Economou A (2016) Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. *Trends Biochem Sci* 41: 175-89

Preston GM (2007) Metropolitan microbes: Type III secretion in multihost symbionts. *Cell Host & Microbe* 2: 291-294

Rathinavelan T, Zhang L, Picking WL, Weis DD, De Guzman RN, Im W (2010) A repulsive electrostatic mechanism for protein export through the type III secretion apparatus. *Biophys J* 98: 452-61

Reis RS, Horn F (2010) Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathog* 2: 8

Robins-Browne RM (1987) Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev Infect Dis* 9: 28-53

Roehrich AD, Bordignon E, Mode S, Shen DK, Liu X, Pain M, Murillo I, Martinez-Argudo I, Sessions RB, Blocker AJ (2017) Steps for *Shigella* Gatekeeper Protein MxiC Function in Hierarchical Type III Secretion Regulation. *J Biol Chem* 292: 1705-1723

Roehrich AD, Guillosoy E, Blocker AJ, Martinez-Argudo I (2013) *Shigella* IpaD has a dual role: signal transduction from the type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation. *Mol Microbiol* 87: 690-706

Romo-Castillo M, Andrade A, Espinosa N, Monjaras Fera J, Soto E, Diaz-Guerrero M, Gonzalez-Pedrajo B (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. *J Bacteriol* 196: 2227-41

Ryu J, Hartin RJ (1990) Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2. *Biotechniques* 8: 43-5

Sal-Man N, Deng W, Finlay BB (2012) EscI: a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Biochem J* 442: 119-25

Saldana Z, Erdem AL, Schuller S, Okeke IN, Lucas M, Sivananthan A, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, Giron JA (2009) The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J Bacteriol* 191: 3451-61

- Sarty D, Baker NT, Thomson EL, Rafuse C, Ebanks RO, Graham LL, Thomas NA (2012) Characterization of the type III secretion associated low calcium response genes of *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633. *Can J Microbiol* 58: 1306-15
- Schmidt H, Hensel M (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17: 14-56
- Schubot FD, Jackson MW, Penrose KJ, Cherry S, Tropea JE, Plano GV, Waugh DS (2005) Three-dimensional structure of a macromolecular assembly that regulates type III secretion in *Yersinia pestis*. *J Mol Biol* 346: 1147-61
- Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C, Abe A (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11638-43
- Shaulov L, Gershberg J, Deng W, Finlay BB, Sal-Man N (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
- Shen DK, Blocker AJ (2016) MxiA, MxiC and IpaD Regulate Substrate Selection and Secretion Mode in the T3SS of *Shigella flexneri*. *PLoS One* 11: e0155141
- Silva-Herzog E, Joseph SS, Avery AK, Coba JA, Wolf K, Fields KA, Plano GV (2011) Scc1 (CP0432) and Scc4 (CP0033) function as a type III secretion chaperone for CopN of *Chlamydia pneumoniae*. *J Bacteriol* 193: 3490-6
- Sorg JA, Blaylock B, Schneewind O (2006) Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16490-5
- Soto E, Espinosa N, Diaz-Guerrero M, Gaytan MO, Puente JL, Gonzalez-Pedrajo B (2017) Functional Characterization of EscK (Orf4), a Sorting Platform Component of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Injectisome. *J Bacteriol* 199
- Spreter T, Yip CK, Sanowar S, Andre I, Kimbrough TG, Vuckovic M, Pfuetzner RA, Deng W, Yu AC, Finlay BB, Baker D, Miller SI, Strynadka NC (2009) A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* 16: 468-76
- Stebbins CE, Galan JE (2001) Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* 414: 77-81
- Stein M, Kenny B, Stein MA, Finlay BB (1996) Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol* 178: 6546-54
- Stone CB, Bulir DC, Emdin CA, Pirie RM, Porfilio EA, Slootstra JW, Mahony JB (2011) *Chlamydia pneumoniae* CdsL Regulates CdsN ATPase Activity, and Disruption with a Peptide Mimetic Prevents Bacterial Invasion. *Front Microbiol* 2: 21
- Stone CB, Johnson DL, Bulir DC, Gilchrist JD, Mahony JB (2008) Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN (Cpn0707) of *Chlamydia pneumoniae*. *J Bacteriol* 190: 6580-8
- Thomas NA, Deng W, Baker N, Puente J, Finlay BB (2007) Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 282: 29634-45
- Toruellas J, Jackson MW, Pennock JW, Plano GV (2005) The *Yersinia pestis* type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion. *Mol Microbiol* 57: 1719-33
- Urbanowski ML, Brutinel ED, Yahr TL (2007) Translocation of ExsE into Chinese hamster ovary cells is required for transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun* 75: 4432-9
- Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15264-9
- Vlisidou I, Dziva F, La Ragione RM, Best A, Garmendia J, Hawes P, Monaghan P, Cawthraw SA, Frankel G, Woodward MJ, Stevens MP (2006) Role of intimin-tir interactions

and the tir-cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 74: 758-64

Wagner S, Konigsmair L, Lara-Tejero M, Lefebvre M, Marlovits TC, Galan JE (2010) Organization and coordinated assembly of the type III secretion export apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17745-50

Wang D, Roe AJ, McAteer S, Shipston MJ, Gally DL (2008) Hierarchical type III secretion of translocators and effectors from *Escherichia coli* O157:H7 requires the carboxy terminus of SepL that binds to Tir. *Mol Microbiol* 69: 1499-512

Wilharm G, Lehmann V, Krauss K, Lehnert B, Richter S, Ruckdeschel K, Heesemann J, Trulzsch K (2004) *Yersinia enterocolitica* type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infection and Immunity* 72: 4004-4009

Wilson RK, Shaw RK, Daniell S, Knutton S, Frankel G (2001) Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 3: 753-62

World Health Organization W (2017) GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS.

Yang H, Shan Z, Kim J, Wu W, Lian W, Zeng L, Xing L, Jin S (2007) Regulatory role of PopN and its interacting partners in type III secretion of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 2599-609

Yerushalmi G, Litvak Y, Gur-Arie L, Rosenshine I (2014) Dynamics of expression and maturation of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 196: 2798-806

Yip CK, Kimbrough TG, Felise HB, Vuckovic M, Thomas NA, Pfuetzner RA, Frey EA, Finlay BB, Miller SI, Strynadka NC (2005) Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* 435: 702-7

Younis R, Bingle LE, Rollauer S, Munera D, Busby SJ, Johnson S, Deane JE, Lea SM, Frankel G, Pallen MJ (2010) SepL resembles an aberrant effector in binding to a class 1 type III secretion chaperone and carrying an N-terminal secretion signal. *J Bacteriol* 192: 6093-8

Yu XJ, McGourty K, Liu M, Unsworth KE, Holden DW (2010) pH sensing by intracellular *Salmonella* induces effector translocation. *Science* 328: 1040-3