



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA Y FUNCIONAL DE LA
PROTEÍNA EscN DEL SISTEMA DE SECRECIÓN DE
EFECTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli*
ENTEROPATÓGENA”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Biól. ANGEL ANDRADE TORRES

Tutor: Dra. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 325 del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Bertha González Pedrajo, con el apoyo de los donativos 81847 de CONACyT y el IN224708 de la DGAPA, UNAM, así como un apoyo complementario de la Fundación Miguel Alemán.

Para la realización de este trabajo conté con una beca de CONACyT (registro 188862), además de un apoyo complementario por parte de la DGEP, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Bertha González Pedrajo por su excelente dirección y constante apoyo durante mi estancia en su laboratorio.

A la Dra. Norma Espinosa Sánchez por el apoyo técnico brindado a este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Rosa Laura Camarena, Dr. Dimitris Georgellis, Dr. Roberto Coria, Dr. José Luis Puente y al Dr. Germán Aguilar, por las aportaciones que contribuyeron a mejorar esta tesis.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Dimitris Georgellis y Dr. Carlos Eslava que semestre a semestre enriquecieron con sus observaciones y sugerencias este trabajo y mi formación doctoral.

A los Drs. Juan Pablo Pardo, Georges Dreyfus, Diego González, Gerardo Pérez, Xochitl Pérez, Jaime Mas, Dimitris Georgellis, así como a los miembros de sus respectivos laboratorios que en diferentes ocasiones amablemente me brindaron asesoría técnica, préstamo de equipo o material y se mostraron siempre disponibles.

A los compañeros de laboratorio que hacen del espacio un lugar más agradable; Mariana, Raúl, Julia, Ely y en especial a Miguel y a Meztli pues además de brindarme una gran amistad han contribuido al desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Laura Ongay Larios y sus colaboradoras, Biól. Minerva Mora y Biól. Guadalupe Códiz, de la Unidad de Biología Molecular por el apoyo técnico.

Al Ing. Juan Barbosa, Ivette Rosas y a toda la Unidad Cómputo del IFC por su apoyo técnico.

Después de los agradecimientos académicos quisiera reconocer a las personas que día con día han procurado mi desarrollo, que me han brindado su amistad y me han acompañado no sólo en los momentos de gozo sino también en situaciones difíciles y dolorosas.

En primer lugar a mi familia, en especial a mi querida madre Rocío Andrade y a mis hermanos Juan Salvador y Omar que siempre han sido mi más importante motivación.

A Faviola por su apoyo incondicional y compañía a lo largo de este complicado camino.

A todos mis tíos que en diferentes etapas han cuidado de mí y de mis hermanos. Así como a mis queridos primos.

A Josué y a toda la familia Ramírez Jarquín por su gran amistad y por adoptarme como un más de su familia.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	4
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	5
Modelo de infección por EPEC.....	5
Locus de esfacelamiento enterocítico de EPEC.....	8
Sistemas de secreción tipo III (SST3).....	10
Aparato de exportación tipo III.....	12
Componentes solubles y periféricos del aparato de exportación.....	13
Secreción tipo III y ATPasas asociadas a los SST3.....	15
El SST3 de EPEC.....	19
La ATPasa EscN del SST3 de EPEC.....	22
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	
Cepas bacterianas.....	26
Manipulación de DNA.....	27
Mutagénesis sitio-dirigida.....	28
Purificación de His-EscN y las mutantes puntuales.....	30
Purificación de His- Δ 50EscL y His- Δ 89EscL.....	31
Inmunoreconocimiento.....	31
Obtención de suero policlonal de conejo anti-EscN.....	32
Actividad enzimática.....	32
Cromatografía de exclusión molecular.....	33
Electroforesis nativa en geles de acrilamida y actividad de ATPasa <i>in situ</i> ..	33
Ensayo de secreción de proteínas.....	34
Análisis estructural de EscN y FliI.....	34
Ensayos de interacción proteína-proteína.....	35
Copurificación de His-EscL y EscN por cromatografía de afinidad.....	35
Copurificación de His-EscN y CesT o SepL por cromatografía de afinidad..	36

RESULTADOS	
I. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y OLIGOMERIZACIÓN DE EscN.....	37
Amplificación y clonación de <i>escN</i>	37
Purificación de His-EscN.....	38
Funcionalidad de His-EscN.....	40
Caracterización de la actividad de ATPasa de EscN.....	41
Oligomerización de EscN.....	43
II. LA PROTEÍNA EscL INTERACTÚA CON EscN E INHIBE SU	
ACTIVIDAD DE ATPasa.....	47
EscL como posible reguladora de la ATPasa en el SST3 de EPEC.....	47
Clonación y purificación de EscL.....	48
Interacción EscN-EscL e inhibición de la actividad de ATPasa.....	51
Región de EscN que participa en la interacción con EscL.....	53
III. ANÁLISIS MOLECULAR DEL DOMINIO C-TERMINAL DE EscN.....	57
Análisis de la estructura primaria de EscN.....	57
Análisis de la estructura terciaria de EscN.....	60
Generación de mutantes puntuales del C-terminal de EscN.....	64
Efecto de las mutaciones puntuales del C-terminal de EscN en la complementación de una cepa EPEC Δ <i>escN</i>	65
Caracterización de las mutantes puntuales de EscN con pérdida de función.....	68
Purificación y actividad de ATPasa de las mutantes de EscN.....	71
Interacción del complejo chaperona-efector con EscN.....	72
Interacción de la proteína SepL con EscN.....	75
DISCUSIÓN	
I. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y OLIGOMERIZACIÓN DE EscN.....	78
II. LA PROTEÍNA EscL INTERACTÚA CON EscN E INHIBE LA	
ACTIVIDAD DE ATPasa.....	81
III. ANÁLISIS MOLECULAR DEL DOMINIO C-TERMINAL DE EscN.....	84
CONCLUSIONES.....	93
PERSPECTIVAS.....	94
Apéndice 1.....	95
Apéndice 2.....	96
REFERENCIAS.....	98

RESUMEN

Múltiples bacterias patógenas utilizan un sistema de secreción tipo III (SST3) para inyectar efectores de virulencia a sus células hospederas, los cuales alteran diversas funciones celulares y eventualmente provocan diferentes cuadros clínicos. La inyección de estos efectores a las células eucariontes requiere de la actividad enzimática de una ATPasa especializada asociada al SST3. En este trabajo se realizó una caracterización de la proteína EscN, ATPasa asociada al SST3 de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). La funcionalidad de versiones recombinantes de EscN (fusionada a 10 histidinas y a la proteína GST en su extremo N-terminal) se corroboró mediante ensayos de complementación. Nuestros resultados indican que EscN es una ATPasa dependiente de Mg^{2+} (k_{cat} $0.35\ s^{-1}$), utilizando las condiciones óptimas que se obtuvieron para la reacción de hidrólisis. EscN presentó una actividad dependiente de la concentración de proteína lo que sugiere la activación de la enzima por oligomerización. La presencia de formas oligoméricas activas de EscN se demostró por medio de cromatografía de exclusión molecular y electroforesis en geles nativos.

Adicionalmente, se demostró la existencia de interacción entre las proteínas EscL y EscN. Se identificó que la región C-terminal de EscL reconoce la región N-terminal de EscN y que la formación de este complejo inhibe la actividad de ATPasa de EscN; éste representa el primer reporte que confirma experimentalmente que EscL es la proteína reguladora de la ATPasa del SST3 de EPEC.

Por otra parte, mediante alineamientos de secuencia múltiples de ATPasas de diferentes SST3, se identificaron residuos altamente conservados en el dominio C-terminal de esta familia de proteínas (localizados principalmente entre las α -hélices C1 y C2). La importancia de los residuos conservados del C-terminal de EscN se evaluó mediante mutagénesis sitio dirigida y ensayos de complementación. Se obtuvieron diferentes proteínas mutantes con pérdida de función de secreción, y se determinó que la integridad estructural de la α -hélice C1 es crítica para la función de la proteína. A su vez, nuestros resultados indican que las mutaciones del C-terminal de EscN no evitan la interacción con los complejos chaperona-efector, por lo que el defecto en su función puede

corresponder a la afectación de la interacción con otro componente del SST3, por ejemplo las identificadas por primera vez en este reporte con las proteínas SepL y Orf15.

Finalmente, se describe un modelo del posible mecanismo de acción de la ATPasa del SST3 y se discute la similitud de algunos componentes del SST3 con subunidades de la F_0F_1 -ATPasa así como un probable funcionamiento semejante de ambos complejos multiproteicos.

ABSTRACT

Many bacterial pathogens use a type III secretion system (T3SS) to inject virulence effector proteins into host cells, disrupting different cellular functions and enabling disease progression. The injection of these effectors into eukaryotic cells is dependent on the enzymatic activity of a specialized ATPase associated with the T3SS. In this work we report the characterization of EscN, the enteropathogenic *Escherichia coli* type III ATPase. Recombinant versions of EscN (10XHis- or GST- N-terminally tagged) were fully functional in complementation tests. Our results demonstrate that EscN is a Mg^{2+} -dependent ATPase (k_{cat} $0.35\ s^{-1}$). We also define optimal conditions for the hydrolysis reaction. EscN displays protein concentration-dependent activity, suggesting that the specific activity changes with the oligomeric state of the protein. The presence of active oligomers was revealed by size exclusion chromatography and native gel electrophoresis.

In addition, we demonstrate an EscL-EscN interaction, and showed that EscL C-terminal domain interacts with EscN N-terminal domain; and that the formation of this complex inhibits the ATPase activity of EscN. This is the first experimental report that confirms the role of EscL as the ATPase regulator protein of the T3SS in EPEC.

A multiple sequence alignment of different T3SS ATPases was generated and several C-terminal highly conserved residues were identified. The conserved residues are mainly localized between α -helix C1 and C2.

Conserved C-terminal residues of EscN were subjected to site-directed mutagenesis, and their functional relevance was confirmed by complementation tests. We have isolated several loss-of-function mutants and our results show a central role of the integrity of the α -helix C1 structure in protein function. In contrast with previous reports, we demonstrate that C-terminal mutations in EscN do not avoid the interaction with a chaperone-effector complex. Therefore, their loss-of-function could be due to a failure to interact with some other T3SS components, like the ones identified in this work: SepL and Orf15.

Finally a model describing the possible mechanism of action of the T3SS ATPase is presented, and the similarity between T3SS components and F_0F_1 -ATPase subunits as well as a probable resemblance in the function of both multiproteic complexes is discussed.

INTRODUCCIÓN

La bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* se encuentra normalmente en la microbiota del tracto gastrointestinal humano, lo coloniza durante las primeras horas de vida y a partir de ese momento la bacteria y su hospedero se benefician mutuamente [1,2]. Esta bacteria ha sido durante varias décadas un excelente modelo de estudio y actualmente es uno de los organismos procariontes mejor caracterizados.

Las cepas comensales de *E. coli* habitualmente son inofensivas en el lumen intestinal, sin embargo en algunas ocasiones pueden producir infecciones en hospederos inmunodeprimidos o cuando son alteradas las barreras gastrointestinales como por ejemplo en una peritonitis [1]. El nicho de las cepas comensales de *E. coli* es la capa mucosa del colon de mamíferos. Este microorganismo es un competidor altamente exitoso de dicha región intestinal y representa el anaerobio facultativo más abundante de la microbiota humana [3].

Sin embargo, a lo largo de la evolución, algunas cepas de *E. coli* han adquirido factores específicos de virulencia que les confieren una mayor capacidad para adaptarse a nuevos ambientes y provocar un amplio espectro de enfermedades. Estos atributos de virulencia frecuentemente están codificados en elementos genéticos que pueden ser movilizados a diferentes cepas (revisado en [4]).

Sólo las combinaciones más exitosas de factores de virulencia han persistido y dado lugar a los denominados “patotipos” de *E. coli*, capaces de provocar enfermedades en individuos sanos [5]. Las infecciones generadas por los diferentes patotipos de *E. coli* pueden desencadenar tres síndromes clínicos generales: i) infecciones del tracto urinario, ii) sepsis/meningitis y iii) padecimientos entéricos/diarreicos [1,6].

Entre las cepas de *E. coli* enteropatógenas se han descrito seis patotipos de acuerdo con sus factores de virulencia, patrones de adherencia celular e histopatología: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC) revisado en [1,5-7].

***Escherichia coli* enteropatógena**

E. coli enteropatógena (**EPEC** por sus siglas en inglés) fue el primer patotipo en ser descrito en el año de 1945, durante un importante brote de diarrea infantil en el Reino Unido [8]. Actualmente la infección por EPEC es una de las causas más comunes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo [5]. Diferentes estudios realizados en México y Brasil (entre otros países), indican que alrededor del 40% de los casos de diarrea infantil se deben a la infección por EPEC y se estima que provoca la muerte de miles de niños por año [1,2,9].

La infección ocasionada por EPEC desencadena diarrea de tipo acuoso que puede ocurrir en diversos grados de intensidad y es común que los niños infectados además presenten vómito y fiebre [10,11].

EPEC es un patógeno extracelular que induce una alteración histopatológica característica denominada “lesión A/E” (adherencia y esfacelamiento), la cual puede observarse en biopsias de pacientes o animales infectados y puede reproducirse en cultivos celulares [1,12,13]. Este destacado fenotipo A/E se caracteriza por la eliminación de las microvellosidades y la adherencia íntima de la bacteria a la membrana de la célula epitelial. A su vez, bajo el sitio de adhesión de la bacteria, se observan marcados cambios del citoesqueleto del enterocito, que incluyen principalmente la acumulación de actina polimerizada, originándose una estructura tipo “pedestal” que puede extenderse hasta 10 µm fuera de la célula epitelial [14].

Las bacterias *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), causante de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en humanos, y *Citrobacter rodentium*, causante de hiperplasia colónica murina en ratones, también pertenecen a la familia de patógenos capaces de inducir la lesión A/E [5].

Modelo de infección por EPEC

Para fines prácticos el modelo de patogénesis de EPEC se divide en tres etapas: i) adherencia inicial, ii) transducción de señales, y iii) adherencia íntima [2,15,16].

La **adherencia inicial** a las células enterocíticas es un proceso fundamental en la patogénesis de EPEC; una fimbria o pili tipo IV, denominado BFP (del inglés *bundle-forming pilus*), está directamente involucrado en dicho proceso.

La biogénesis del pili BFP requiere 14 genes codificados en el plásmido de virulencia EAF (del inglés *EPEC adherence factor*) [17-19]. El pili BFP permite que las bacterias se agrupen entre ellas y formen microcolonias, de esta manera se promueve el patrón de adherencia localizada (A/L) típico de EPEC [18] (figura 1A).

Además del pili BFP otros factores como el flagelo, la adhesina intimina y el filamento EspA se han referido durante la etapa de adherencia inicial de EPEC [20,21]. A su vez, durante esta primer etapa también ocurre la eliminación de las microvellosidades de los enterocitos.

Transducción de señales. Después de que EPEC se adhiere al enterocito, inyecta o transloca a la célula una serie de proteínas denominadas “efectores” mediante un sistema de secreción tipo III (SST3). Estos efectores de virulencia alteran diferentes vías de señalización del hospedero, afectan la integridad de las uniones estrechas lo que reduce la resistencia transepitelial celular, degradan la red de microtúbulos, modulan la estructura del citoesqueleto de actina, inducen la formación de filopodios y alteran la función mitocondrial [22-28] (ver el apéndice 1).

Un efector crucial en la patogénesis de EPEC es la proteína Tir (del inglés *translocated intimin receptor*), pues se ha demostrado que Tir es el único efector indispensable para colonizar el intestino e inducir la lesión A/E [29,30].

Después de que Tir es inyectado vía SST3, se inserta en la membrana plasmática del enterocito donde adopta una topología de asa en la que los extremos N- y C-terminal se mantienen citosólicos [31], mientras que su región central permanece extracelular y actúa como un receptor para una adhesina de membrana externa de EPEC, llamada intimina [32]. Este es el único ejemplo (el de los patógenos A/E), en el que la bacteria transloca su propio receptor para unirse a las células eucariontes.

Adherencia íntima. Una vez que ocurre la interacción entre Tir y la intimina de la superficie bacteriana, EPEC resulta firmemente adherida al enterocito. Además de su papel como receptor, Tir tiene funciones importantes de

señalización durante la nucleación de actina al ser fosforilado en la tirosina 474 por al menos dos cinasas del hospedero, Fyn y Abl.

La forma fosforilada de Tir genera un sitio de reclutamiento para las proteínas adaptadoras Nck1 y Nck2 (llamadas conjuntamente Nck). El dominio SH3 de Nck recluta y activa a la proteína N-WASP lo que conlleva a la subsiguiente activación del complejo remodelador de actina, Arp2/3, y a la acumulación de filamentos de actina por debajo del sitio de adhesión de la bacteria, dando lugar a la formación del pedestal característico de la lesión A/E [33,34] (figura 1B). Otras proteínas del citoesqueleto como vinculina, cortactina, talina y α -actinina también son reclutadas al pedestal [16].

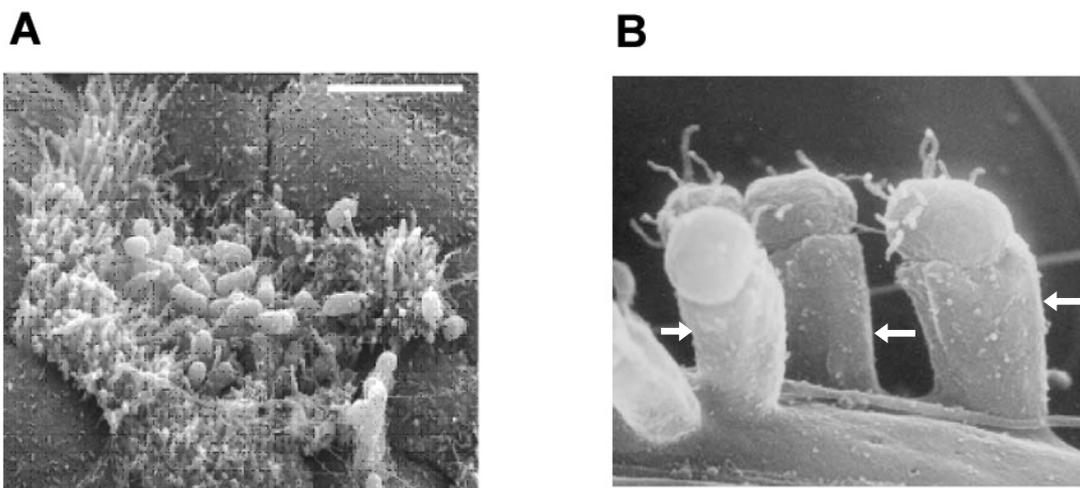


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (A) Patrón de adherencia localizada (A/L) en células HT-29 infectadas durante 3 h con EPEC WT (E2348/69), las flechas indican la formación de pedestales. Barra 2 μ m. (B) Lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E) en células epiteliales (HeLa) en cultivo, EPEC se ubica sobre el pedestal. Tomadas de [35] y [36] respectivamente .

A pesar de los avances conseguidos en el entendimiento de los mecanismos moleculares que inducen la lesión A/E y la formación de los pedestales de actina, todavía no se ha esclarecido el mecanismo global que genera la diarrea producida por EPEC.

Locus de esfacelamiento enterocítico de EPEC

Todos los genes necesarios para inducir la lesión A/E en EPEC están codificados en una región cromosomal llamada “locus de esfacelamiento enterocítico” (LEE) que es una isla de patogenicidad de 35.6 kb que contiene 41 marcos de lectura abiertos, agrupados principalmente en 5 operones policistrónicos (LEE1 a LEE5) [37,38] (figura 2).

En el LEE se codifican los componentes que forman el SST3, reguladores transcripcionales, proteínas efectoras (que son translocadas a las células hospedadoras), las proteínas involucradas en la adherencia íntima, chaperonas y algunas otras proteínas cuya función aun se desconoce [37].

Los operones LEE1, LEE2 y LEE3 contienen principalmente los genes que codifican los componentes estructurales del SST3, el LEE4 codifica las proteínas translocadoras (ver más adelante) y el LEE5 codifica los genes involucrados en la adherencia íntima (figura 2).

En cuanto a la regulación transcripcional de la isla LEE la proteína H-NS tiene un papel crucial, ésta regula de manera negativa los operones LEE1-LEE3 y LEE5 [39], mientras que el producto del primer gen del operón LEE1, *Ler* (del inglés *LEE encoded regulator*), actúa como un desrepressor (desplaza a H-NS) y promueve la transcripción de los operones LEE2-LEE5. El operón bicistrónico *grlRA* codifica para las proteínas GrlA y GrlR (del inglés *global regulator of LEE Activator* y *Repressor* respectivamente). GrlA se requiere para la transcripción de *ler* mientras que el mecanismo de represión mediado por GrlR aun se desconoce [40-42].

Los genes presentes en la isla LEE de EPEC son suficientes para inducir la lesión A/E, ya que si se transfieren a una cepa comensal de *E. coli*, ésta es capaz de generar dicho fenotipo [43]. Homólogos del LEE también están presentes en las bacterias EHEC y *C. rodentium* de la familia de patógenos A/E.

Además, cabe mencionar que en los diferentes patógenos A/E se han identificado múltiples efectores codificados fuera de la isla LEE denominados Nle's (del inglés *non-LEE-encoded effectors*) localizados en distintas islas de patogenicidad a lo largo del cromosoma [15,44].

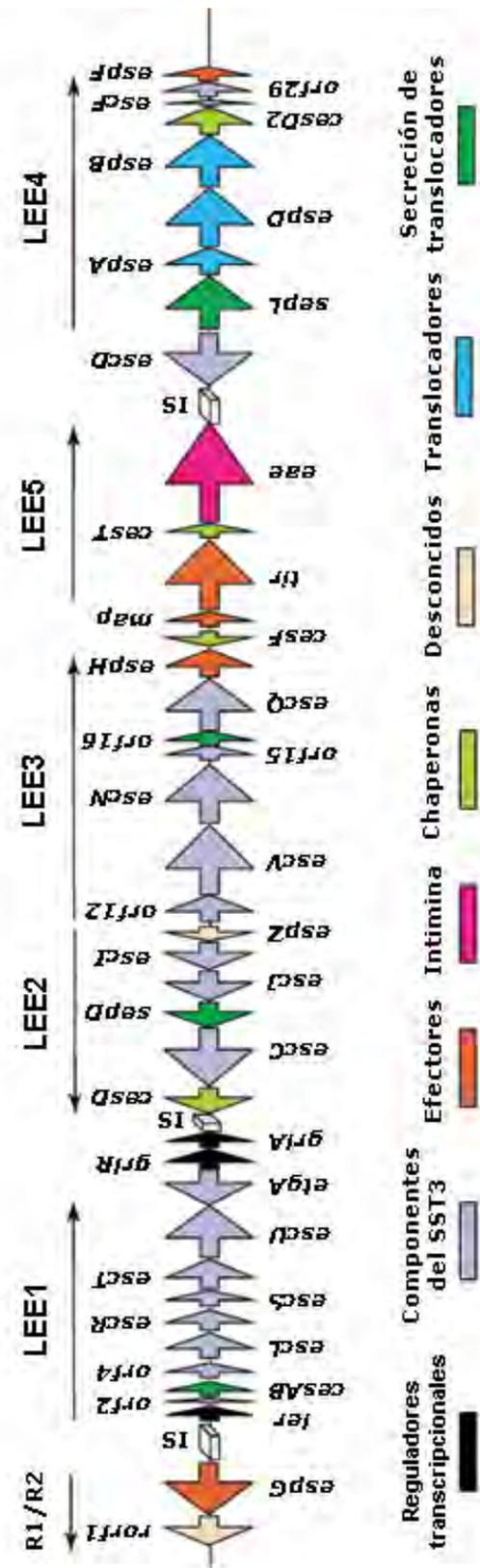


Figura 2. Organización de los genes de la isla de patogenicidad LEE en EPEC, modificado de [44].

Sistemas de secreción tipo III (SST3)

Los SST3 o inyectisomas se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias Gram-negativas y son esenciales en la virulencia de patógenos tanto de animales (*Escherichia*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, entre otros) como de plantas (*Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, entre otros). Estos complejos de secreción se caracterizan por actuar como jeringas moleculares que permiten la “translocación” de proteínas bacterianas, nombradas efectores, al citoplasma de células eucariontes (sin intermediarios periplásmicos) donde afectan diversas vías de señalización (revisado en [45,46]). Cabe señalar que los inyectisomas no sólo participan en patogenicidad bacteriana sino también en diversas asociaciones simbióticas [47].

Adicionalmente, un SST3 participa en la biogénesis del flagelo, aparato locomotor bacteriano cuya rotación es energizada por el gradiente electroquímico membranal [48]. Ambos, inyectisoma y flagelo, comparten un grupo de ocho proteínas altamente conservadas por lo que se propone están relacionados evolutivamente y comparten un ancestro común [49].

El inyectisoma y el flagelo también son semejantes en su estructura; se componen por un cuerpo basal cilíndrico, que contiene un par de anillos embebidos en la membrana interna (MI) y un anillo en la membrana externa (ME) bacteriana, unidos por un eje periplásmico. Además de un apéndice extracelular denominado aguja o pilus Hrp en el caso de inyectisomas de patógenos de animales y plantas respectivamente; y gancho-filamento en el flagelo [50,51] (figura 3).

Además, asociadas a la aguja o pilus Hrp en todos los inyectisomas, existe un grupo de proteínas denominadas translocadoras, que son capaces de establecer una conexión física entre la punta del apéndice y la membrana plasmática del hospedero formando un poro en esta última, necesario para la translocación de los efectores al interior de la célula [46].

Las subunidades que componen los SST3 son transportadas a través de un canal central continuo, con un diámetro de 2-3 nm, formado a lo largo de la estructura naciente [52]. Las dimensiones de dicho canal restringen el paso de las proteínas completamente plegadas, lo que sugiere que éstas necesitan ser transportadas de forma desplegada o parcialmente plegada [53].

La secreción tipo III ocurre de una manera ordenada o jerárquica, es decir, existen diferentes categorías de sustratos tipo III de acuerdo con la parte del sistema que formen y por lo tanto la secreción de los mismos es diferencial de acuerdo con la etapa de ensamblaje en la que se encuentre el sistema (flagelo o inyectisoma) [54,55]. Dicho orden es dictado en parte por un cambio del aparato de exportación en la especificidad por los sustratos del eje/gancho hacia las subunidades del filamento en el flagelo; o de las subunidades de la aguja hacia los translocadores y efectores en el inyectisoma [56,57] (ver más adelante) (figura 3).

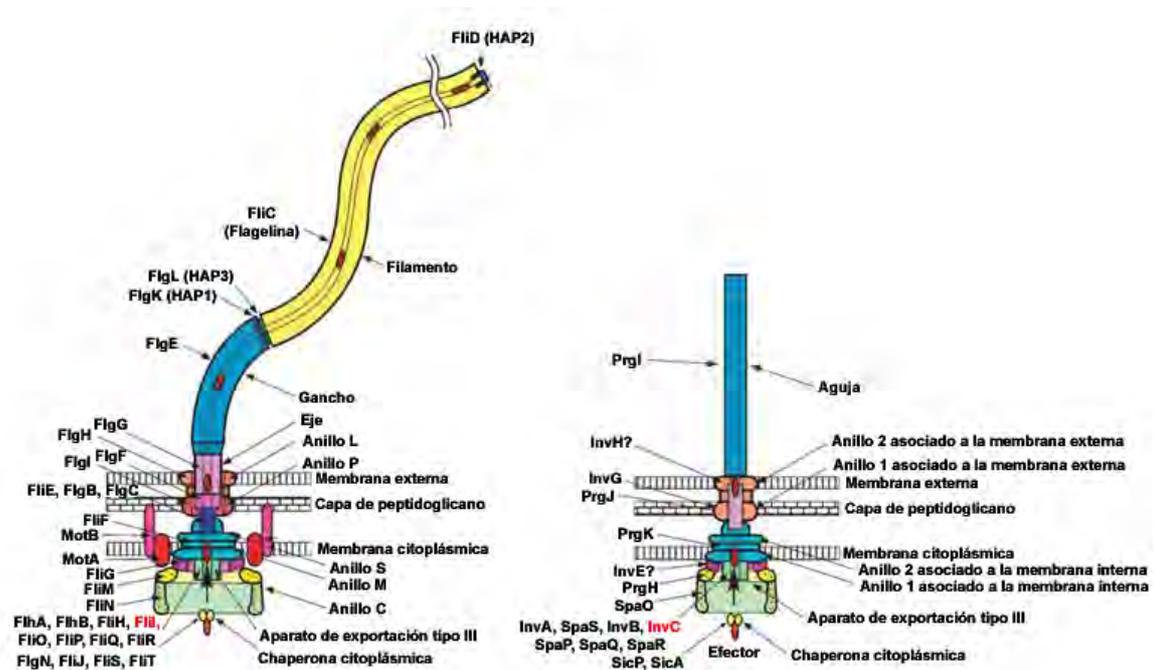


Figura 3. Diagramas esquemáticos del flagelo (izquierda) y el inyectisoma (derecha) de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, en rojo se nombra a la ATPasa asociada a cada sistema. Modificada de [58].

Además, ya que los sustratos proteicos que se secretan vía SST3 (la mayoría de los componentes estructurales y las proteínas translocadoras y efectoras), carecen de una secuencia señal identificable, se conoce poco acerca de cómo éstos son reconocidos y categorizados para poder secretarse de manera diferencial.

Diferentes estudios confirman que la señal de secreción se localiza en el extremo amino terminal de los sustratos (en los primeros ~20 residuos) y se propone que un carácter anfipático o motivo estructural no ordenado en dicha región es lo que reconoce el aparato secretor tipo III [54,59-61].

A su vez, se ha identificado un grupo de proteínas chaperonas específicas que están asociadas en el citoplasma bacteriano a la mayoría de los sustratos proteicos tipo III, y que previenen su degradación y los estabilizan, además de asistirlos en el direccionamiento hacia el aparato secretor y conferirles especificidad por su respectivo SST3 [54,62-65].

Las proteínas chaperonas se caracterizan por ser pequeñas (< 170 aa), generalmente ácidas (pI < 5.5) y de estructura helicoidal [63,66]. La asociación de estas proteínas con sus sustratos resulta en la formación de los denominados complejos: chaperona-translocador y chaperona-efector en el caso del inyectisoma; y chaperona-sustrato en el caso del flagelo.

Aparato de exportación tipo III

La mayoría de las proteínas homólogas presentes en todos los SST3 (tabla 1) se ubican en la parte basal del sistema y son proteínas integrales o asociadas a la MI; que constituyen lo que en el flagelo se nombró como aparato de exportación, ya que son indispensables para la secreción de todos los sustratos [67].

Tabla 1. Componentes conservados en los SST3, las proteínas marcadas en negritas adicionalmente comparten similitud a nivel de estructura primaria en los diferentes SST3.

Proteína flagelar	Estructura/función	Proteína del inyectisoma funcionalmente relacionada		
		<i>Escherichia</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Salmonella</i>
FliA	Aparato de exportación/ entrada al canal secretor	EscV	Yscv	InvA
FliB	Aparato de exportación/ entrada al canal secretor y <i>switch</i> de secreción de sustratos	EscU	YscU	SpaS
FliP	Aparato de exportación / ?	EscR	YscR	SpaP
FliQ	Aparato de exportación / ?	EscS	YscS	SpaQ
FliR	Aparato de exportación / ?	EscT	YscT	SpaR
FliO	Aparato de exportación / ?			
FliI	Aparato de exportación / ATPasa	EscN	YscN	InvC
FliH	Aparato de exportación / regulador de la ATPasa	EscL	YscL	OrgB
FliJ	Aparato de exportación / chaperona general ?	Orf15?	YscO	InvI
FliF	Anillo MS/ localiza el aparato de exportación	EscJ	YscJ	PrgK
FliN	Anillo C/ determina el sentido de rotación flagelar, localiza el complejo ATPasa-regulador	EscQ	YscQ	SpaO

A pesar de que se conoce muy poco acerca de la función, ubicación precisa y estequiometría de la mayoría de estas proteínas, se piensa que se localizan al interior del anillo ubicado en la MI, con una proyección citosólica que compone la entrada al canal secretor y que participan en el reconocimiento de las proteínas que serán secretadas [48,51,68,69] (figura 3). Con excepción de la proteína FliO, el resto de los componentes membranales del aparato de exportación flagelar tienen sus ortólogos en el inyectisoma (tabla 1).

Las proteínas membranales del aparato de exportación más estudiadas son las de la familia FlhA/YscV y FlhB/YscU (tabla 1), ambas tienen un dominio amino hidrofóbico en el que se predicen 8 y 4 cruces transmembranales respectivamente y un dominio carboxilo soluble [50].

El dominio soluble de FlhA tiene una masa molecular de 38 kDa y se piensa que representa una plataforma de reconocimiento para las proteínas que serán secretadas [70]. Se sabe que FlhA interactúa con la proteína FliF del anillo MS [71], y con diferentes componentes del aparato de exportación [70,72-74].

Por otra parte, las proteínas de la familia FlhB/YscU participan en el cambio de la especificidad de secreción de sustratos. Esto lo realizan a través de la autoproteólisis de su dominio citosólico (de 23 kDa) y de la interacción con una proteína involucrada en determinar la longitud del gancho en el flagelo (FliK) y de la aguja en el inyectisoma (YscP) [75-78].

El mecanismo mediante el cual la interacción entre estas proteínas regula el orden de secreción de sustratos es poco entendido; sin embargo, se sugiere que FlhB/YscU mediante un cambio conformacional evita la secreción de una clase de sustratos y promueve la secreción de una clase distinta [76,79]. Mutaciones en el sitio de autoproteólisis de FlhB evitan el cambio en la especificidad por los sustratos denominados tardíos (que forman el filamento) [78], mientras que mutaciones equivalentes en YscU evitan la secreción de las proteínas translocadoras [76].

Componentes solubles y periféricos del aparato de exportación

Otros dos componentes del aparato de exportación, que se pueden encontrar tanto en el citosol como asociados de forma periférica a la MI, son la ATPasa del SST3, cuya oligomerización y actividad hidrolítica se requiere para

la biogénesis eficiente del sistema y la secreción de efectores a través de éste [80,81], y la proteína reguladora de la ATPasa [82] (tabla 1). Ambas proteínas forman un complejo muy estable, que ha sido estudiado principalmente en el flagelo, en donde se compone por las proteínas FliI-FliH (ATPasa-regulador) [82-84].

Se piensa que la formación de dicho complejo evita la oligomerización de la ATPasa ya que *in vitro* FliH inhibe la actividad enzimática de FliI, por lo que se propone que de este modo se previene el consumo de ATP hasta que el aparato de exportación flagelar esté capacitado para acoplar la energía de hidrólisis con la secreción de los sustratos [82,85]. Recientemente se describió que la interacción de las proteínas ortólogas y el mecanismo de regulación de la ATPasa se encuentra conservado también en el inyectisoma [86].

Sin embargo, es probable que *in vivo* la proteína reguladora desempeñe un papel adicional al de la inhibición de la ATPasa pues dicha actividad se requiere para la exportación proteica y, aunque a la fecha se desconoce, se piensa que el complejo FliH-FliI se mantiene a lo largo del proceso de secreción [58].

De acuerdo con lo anterior, debido a que una cepa mutante en *fliH*, mantiene el nado, aunque a niveles muy bajos en relación con una cepa silvestre, y éste puede ser incrementado sustancialmente al sobreproducir a la ATPasa o mediante otras mutaciones en los genes *flhA* o *flhB* [87]; y además ya que FliH sola o en complejo con la ATPasa interactúa con la proteína del anillo citosólico, FliN [88,89]; se cree que la formación del complejo ATPasa-regulador también es un mecanismo que facilita o incrementa el reclutamiento de la ATPasa a la base del sistema. La interacción de las proteínas ortólogas de FliH y FliN también se presenta en el inyectisoma [90-92].

Adicionalmente, las proteínas FliI y FliH interaccionan con las regiones citoplásmicas de las proteínas FlhA y FlhB [72], éstas últimas probablemente representan la entrada al canal de secreción, por lo que se propone que el complejo ATPasa-regulador asiste en la liberación de los sustratos tipo III al canal secretor [58].

El componente restante del aparato de exportación flagelar es la proteína FliJ (tabla 1), ésta es esencial para la secreción tipo III y presenta características de una chaperona [93]. También se sabe que FliJ interactúa con

la ATPasa, y que su región C-terminal participa en la interacción con la proteína reguladora, FliH; mientras que su región central interactúa con la región citosólica de la proteína FlhA [72,74] sin embargo, su función y la de sus contrapartes en el inyectisoma todavía resulta poco entendida en ambos SST3.

Recientemente se propuso una función de la proteína FliJ en la exportación de las subunidades tardías del flagelo, en dicho modelo FliJ, asociada a la base del aparato de exportación, puede unir y reciclar las proteínas chaperonas de las subunidades de acople del gancho y el filamento, FlgK y FlgL (denominadas HAP's) las cuales deben secretarse y ensamblarse antes del gran número de subunidades de flagelina (figura 3). De este modo FliJ favorece la formación de la estructura de acoplamiento entre el gancho y el filamento [94].

De acuerdo con lo anterior, se demostró que las proteínas InvI e YscO, ortólogas de FliJ en los inyectisomas de *Salmonella* y *Yersinia* respectivamente (tabla 1), interactúan con las chaperonas de las proteínas translocadoras, necesarias para la subsiguiente exportación de efectoras al citoplasma eucarionte; y no reconocen a las chaperonas de las proteínas efectoras [95]. Estos resultados sugieren que las proteínas de la familia FliJ/YscO facilitan la secreción de una determinada clase de sustratos; sin embargo, con este modelo no es posible explicar la pérdida en la secreción de los sustratos tempranos en ausencia de estas proteínas [96,97] lo que indica que muy probablemente éstas tengan un papel adicional en la secreción tipo III.

Finalmente, a pesar del gran avance obtenido en años recientes en el estudio de las proteínas que componen el aparato de exportación, el entendimiento actual de la compleja y dinámica red de interacciones que permiten la secreción vía SST3 aun es escaso. Adicionalmente, es probable que varias de estas proteínas realicen más de una función.

Secreción tipo III y ATPasas asociadas a los SST3

El estudio de las ATPasas y la bioenergética de los SST3 ha tenido un gran auge en los últimos años. Durante el desarrollo de este proyecto se publicaron las primeras evidencias que esclarecen la función de estas ATPasas, el posible mecanismo de acoplamiento de la energía de hidrólisis de ATP y el proceso de secreción, así como el papel de la fuerza protón motriz (FPM) en la secreción

tipo III [98-101]. Además, se obtuvieron las primeras estructuras cristalográficas de proteínas pertenecientes a esta familia de ATPasas [102,103].

La ATPasa es uno de los componentes más conservados en todos los SST3, presenta similitud de secuencia con el dominio central de las subunidades α y β del sector F_1 de la F_0F_1 -ATPasa. A nivel de su estructura atómica, estas ATPasas también muestran una destacada similitud con las subunidades α y β a lo largo de las moléculas completas [102,103] (figura 4).

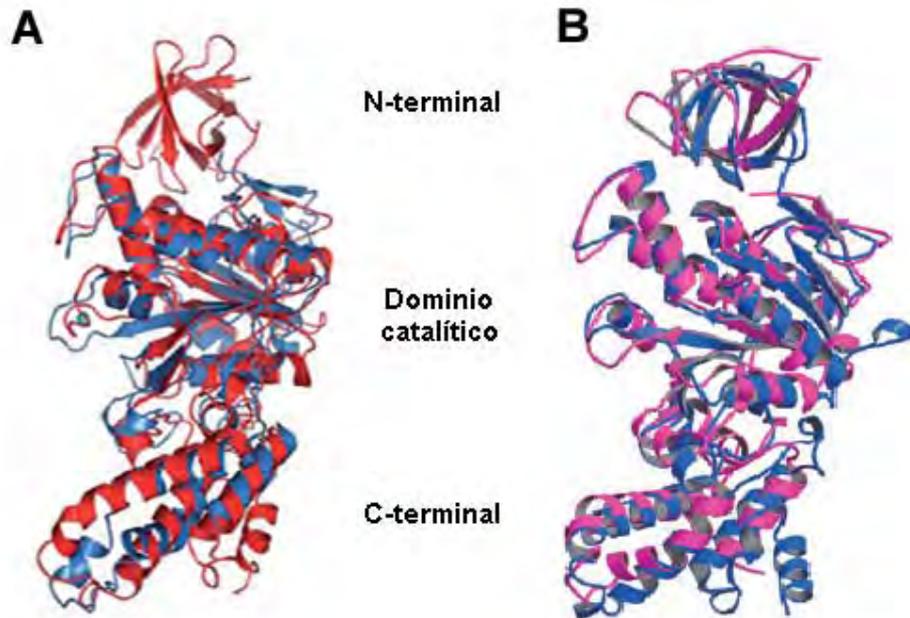


Figura 4. Alineamiento estructural de la ATPasa de SST3 y la subunidad β de F_0F_1 -ATPasa, (A) EscN Δ 1-102 V393P (ATPasa del inyectisoma de EPEC) en azul y subunidad β en rojo, tomada de [103] y (B) FliI Δ 1-18 (ATPasa flagelar) en azul y subunidad β en magenta, tomada de [58].

Asimismo, la unión de nucleótidos al asa-P (*P-loop*) en las ATPasas de los SST3, es semejante a la que se observa en las subunidades α y β , lo que sugiere que el mecanismo catalítico es similar en ambas familias de ATPasas [102,103].

Actualmente se sabe que las ATPasas de los SST3 se asocian periféricamente a la membrana plasmática por medio de su extremo amino terminal [104,105] y que participan en múltiples interacciones proteína-proteína, como las que tienen lugar con los diferentes componentes del aparato de exportación (antes descritas) [54,61,72,82,92,98,99,106-109].

La activación de estas ATPasas está asociada con su oligomerización, probablemente con la formación de homohexámeros que asemejan al compuesto por las subunidades α/β de F_1 [80,81,105]. Sin embargo, también se ha propuesto un ensamblaje dodecamérico compuesto por dos anillos hexaméricos asociados a través de los extremos C-terminales de las subunidades [110,111].

La estructura cuaternaria de estas ATPasas se modeló usando como templado las coordenadas atómicas del heterohexámero $\alpha_3\beta_3$ del sector F_1 . Los modelos revelaron que la estructura de las interfases entre subunidades y el canal central electronegativo del anillo están conservados, mientras que las regiones que difieren entre las ATPasas del SST3 y las subunidades α/β de F_1 se localizan en la superficie externa del hexámero [102,103] (figura 5).

Se especula que un canal interno altamente cargado, como el observado para el homohexámero de estas ATPasas, podría potencialmente facilitar la rápida difusión de polipéptidos desplegados con regiones hidrofóbicas expuestas mediante fuerzas repulsivas [112] y que el poro de la ATPasa puede acoplarse con el canal secretor proveyendo un conducto continuo para las proteínas a secretarse [103].

En cuanto al mecanismo de acción de estas enzimas, recientemente se describió en el flagelo, que la ATPasa es el componente del aparato secretor que reconoce a los complejos chaperona-sustrato, y se ha demostrado que éstos convergen en el aparato de exportación de manera dependiente de la ATPasa Flil, pero independientemente de su actividad hidrolítica [54,99]. Asimismo, se observó para InvC (ATPasa del inyectisoma de *Salmonella*), que el extremo C-terminal participa en el reconocimiento de los complejos chaperona-efector, y que dicha interacción tampoco requiere de la actividad hidrolítica [98].

Posterior a la etapa de reconocimiento de los complejos por la ATPasa, se reportó que, de manera dependiente de la hidrólisis de ATP, esta enzima se encarga de disociar a la chaperona del complejo chaperona-efector, y de desplegar parcialmente al efector para que pueda ser conducido a través del canal de secreción, cuyo diámetro es de sólo 2 nm [98,109]. Este mecanismo

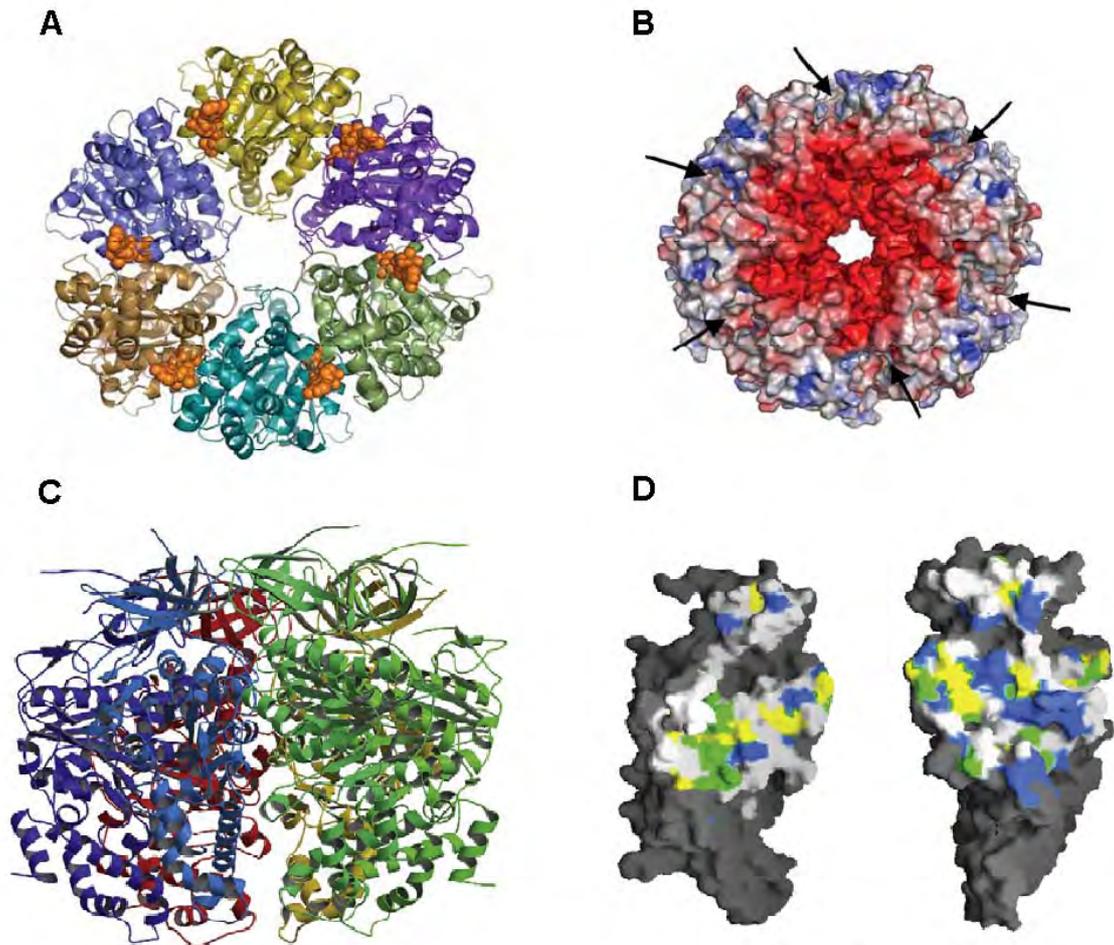


Figura 5. Modelo del homohexámero de la ATPasa de SST3. (A y B) Vista superior del hexámero de EscNΔ1-102 V393P, en (A) cada subunidad señalada en diferente color y la molécula de ATP marcada en naranja en (B) representación electrostática que denota el poro central electronegativo (en rojo las cargas negativas y en azul las positivas), las flechas señalan los sitios de unión de nucleótido. Ambas imágenes tomadas de [103]; (C) Vista lateral del hexámero de FliIΔ1-18; y (D) vista de las interfaces en dos subunidades opuestas en el modelo del hexámero de FliIΔ1-18, se destacan las áreas de superficies de contacto entre subunidades adyacentes. Los residuos conservados con las subunidades α, β, y ambas se señalan en color amarillo, azul y verde respectivamente. (D y C) Tomadas de [113].

asemeja el descrito en la familia de ATPasas AAA+ (ATPasas asociadas a múltiples actividades celulares), enzimas que acoplan la hidrólisis de ATP con movimientos mecánicos que les permiten desplegar diferentes proteínas [114].

Una vez que el efector es incorporado al aparato secretor, las chaperonas se mantienen en el citosol bacteriano. Se piensa que los sustratos tipo III, conforme son parcialmente desplegados, son también internalizados al poro

central del homohexámero de la ATPasa y posteriormente liberados en la entrada del canal secretor [100,102].

Dado que mutantes nulas en el gen que codifica para estas ATPasas o incluso mutaciones puntuales que abaten su actividad hidrolítica, evitan la secreción tipo III, se consideró que la ATPasa aportaba la energía para el proceso de internalización de las proteínas al canal de secreción y su direccionamiento a través del mismo hasta el medio extracelular [115,116]. No obstante, recientemente se demostró que el flagelo, aunque a una frecuencia muy baja, puede ensamblarse aún en ausencia de las proteínas FliI y FliH (ATPasa y regulador), lo que indica que la ATPasa flagelar no es absolutamente esencial para el proceso de secreción [100,101].

En este sentido, se ha demostrado que la secreción vía SST3 se inhibe por el tratamiento con desacoplantes, por lo que se sugiere que estos sistemas son energizados principalmente por la fuerza protón motriz y que la ATPasa sólo participa en la etapa inicial del proceso de exportación disociando los complejos chaperona-sustrato y facilitando la incorporación de los sustratos al canal secretor [100,101,117,118]. Es probable que movimientos Brownianos unidimensionales participen en el sucesivo desplegamiento y la rápida conducción de los polipéptidos desplegados a través del canal central del SST3 [58].

Sin embargo, en el caso del inyectisoma, no existen evidencias de que la secreción pueda ocurrir en ausencia de la ATPasa, incluso en un fondo genético doble mutante de los genes *hrcN* y *hrcL* (correspondientes a la ATPasa y su reguladora) [109].

El SST3 de EPEC

Como se mencionó previamente, la patogénesis de EPEC se encuentra estrechamente relacionada con un SST3 o inyectisoma codificado en la isla de patogenicidad LEE [119].

El inyectisoma de EPEC ha sido purificado y caracterizado mediante microscopía electrónica de transmisión [120,121], siendo su arquitectura general semejante a la reportada para otros inyectisomas [52,122,123]. Estos sistemas, también llamados complejos aguja, se componen por dos regiones;

(i) un cuerpo basal cilíndrico (semejante al cuerpo basal flagelar) y (ii) una aguja que extrude a partir de la ME bacteriana [46] (figura 3).

El cuerpo basal les permite a estos sistemas atravesar ambas membranas bacterianas así como el espacio periplásmico, se compone por un anillo ubicado en la ME, un anillo en la MI además de un eje central que conecta ambos anillos originando un canal continuo [122]. En EPEC la proteína EscC (perteneciente a la familia de las secretinas) forma el anillo en la ME [124], y la lipoproteína EscJ forma un anillo asociado a la MI con una proyección periplásmica; este anillo puede representar el sitio de anclaje de las proteínas membranales del aparato de exportación, EscR, EscS, EscT, EscU y EscV [125] (figura 6A).

Adicionalmente, la proteína EscD (esencial para la secreción tipo III) se asocia a la MI sin embargo se desconoce si se ensambla como otro anillo [121,126]. En el inyectisoma de *Chlamydomphila pneumoniae* se ha demostrado que la proteína CdsD (proteína ortóloga de EscD) interactúa con CdsQ, proteína de la familia YscQ [92]. Al parecer las proteínas de la familia YscQ forman un anillo citosólico asociado periféricamente a la MI, que recluta al complejo ATPasa-reguladora [92,127]. En EPEC, la proteína EscQ es el componente correspondiente que ensamblaría dicho anillo y localizaría al complejo EscN-EscL en la base del sistema [128] (figura 6A).

Por otro parte, es probable que la proteína EscI conforme el eje periplásmico que comunica los anillos de MI y ME, de manera similar a su ortólogo YscI en *Yersinia* [129].

En cuanto a la porción extracelular del inyectisoma, la proteína EscF polimeriza para dar lugar a la aguja, estructura rígida y hueca de una longitud aproximada de 50 nm [130]. Una característica específica del SST3 de EPEC, y del resto de los patógenos A/E, es la polimerización de la proteína translocadora EspA, en la punta o región distal de la aguja [131]. EspA forma un filamento que se extiende como un puente físico, de hasta 800 nm, que posibilita el contacto entre la bacteria y la membrana de la célula [132] (figura 6). Se piensa que hasta que EPEC hace contacto con la célula hospedera las proteínas translocadoras EspB y EspD son secretadas a través del sistema, ambas proteínas se ubican en la punta del filamento EspA y se insertan en la membrana plasmática del hospedero para formar un poro que permitirá la

translocación de las proteínas efectoras al citoplasma de la célula eucarionte [133,134] (figura 6A).

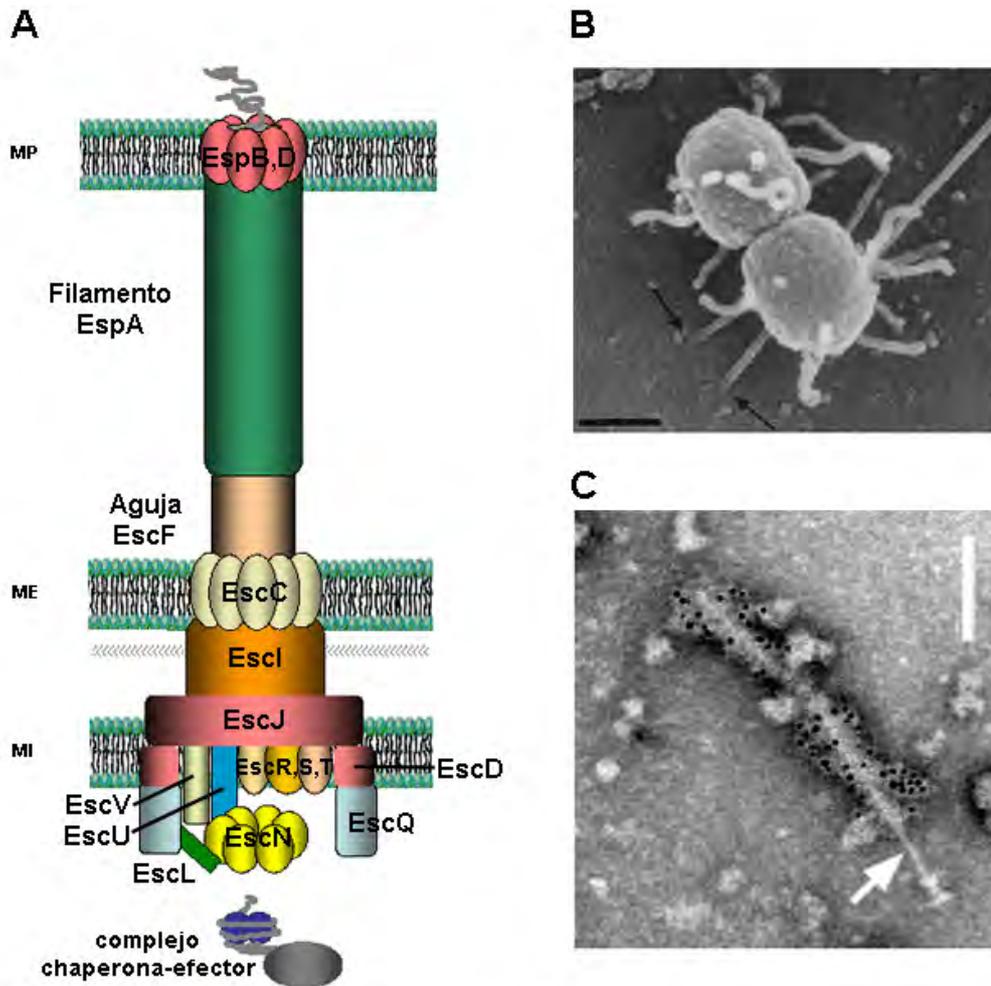


Figura 6. (A) Esquema del inyectisoma de EPEC. (B) Imagen de microscopía electrónica de barrido de EPEC infectando células HEL, las flechas señalan el filamento EspA. Barra 0.25 μm , tomada de [135]. (C) Imagen de microscopía electrónica de transmisión del inyectisoma de EPEC purificado, el filamento EspA fue marcado con anticuerpos anti-EspA acoplados a partículas de oro, la flecha señala la aguja. Barra 0.1 μm , tomada de [120].

Otras dos proteínas del SST3 de EPEC son las proteínas SepD y SepL, que actúan regulando el cambio en la especificidad de sustratos. Mutantes en los genes *sepD* y *sepL* incrementan la secreción de efectores y abaten la exportación de las proteínas translocadoras [40,136]; sin embargo, el mecanismo mediante el cual estas proteínas operan aún es poco entendido. Se sabe que SepD y SepL interactúan entre sí y se propone que SepL evita la salida de proteínas efectoras al secuestrar a Tir (primer efector en secretarse)

hasta el momento en que se detecte la señal que permite la secreción de los efectores [137-139] .

Cabe mencionar que los componentes estructurales del SST3 de los patógenos A/E adicionalmente podrían incluir uno o más de los marcos de lectura abiertos codificados en LEE cuya función se desconoce y que resultan esenciales para la secreción tipo III [40].

La ATPasa EscN del SST3 de EPEC

La identificación de la proteína **EscN** como la ATPasa asociada al SST3 de EPEC y el resto de patógenos A/E, se realizó con base en la similitud de secuencias con otras ATPasas del SST3 y las subunidades α/β de la F_0F_1 -ATPasa [128]. Adicionalmente se observó que una cepa mutante del gen *escN* evita la secreción vía SST3 [124]; sin embargo la actividad enzimática no se había demostrado experimentalmente.

Por otra parte, el análisis de los marcos de lectura abiertos de la isla LEE de EPEC nos permitió sugerir que el producto del gen *orf5* pudiera corresponder a la proteína reguladora de la ATPasa en EPEC, posteriormente un análisis bioinformático de la isla LEE de EHEC llegó a la misma hipótesis renombrando al *orf5* como *escL* [128].

Con base en estos antecedentes, en este trabajo nos planteamos confirmar ambas hipótesis y desarrollar una caracterización detallada de la actividad de ATPasa de EscN, así como estudiar la oligomerización de la enzima.

Asimismo, considerando algunos resultados publicados recientemente para otras ATPasas del SST3 [54,61,98,103] y a través de alineamientos múltiples de diferentes enzimas pertenecientes a esta familia de proteínas, se llevó a cabo un análisis mutacional del extremo C-terminal de EscN con el propósito de conocer la función de este dominio y evaluar su posible papel en la interacción con los diferentes sustratos que son secretados, con el objetivo de obtener un mejor entendimiento del proceso de reconocimiento y selectividad de las proteínas exportadas vía SST3.

JUSTIFICACIÓN

A pesar del conocimiento acumulado y la gran importancia de la ATPasa asociada a los SST3 en el proceso de transporte de proteínas, su papel específico apenas comienza a dilucidarse. Aún resulta poco entendido el mecanismo de acción de esta enzima, el proceso de reconocimiento selectivo de las proteínas que serán exportadas, así como el de acoplamiento entre la energía química derivada de la hidrólisis de ATP y el proceso de secreción. Sin embargo, estos eventos son fundamentales para el funcionamiento del SST3 y por lo tanto para la patogénesis de EPEC y la de diversos patógenos bacterianos.

Otro aspecto poco entendido de los SST3 es el papel de la proteína reguladora de la ATPasa en el proceso de secreción, para comenzar abordar el estudio de dicha proteína en EPEC se decidió corroborar experimentalmente que la proteína codificada por el *orf5* puede interactuar e inhibir la actividad de la ATPasa EscN.

Y por otra parte el dominio C-terminal de la ATPasa asociada al SST3 es el menos caracterizado sin embargo éste se considera fundamental para el proceso de reconocimiento de las proteínas a secretarse por lo que se decidió caracterizar dicho dominio por medio de la generación de mutaciones puntuales.

Consideramos, que el entendimiento detallado del funcionamiento de la proteína EscN podrá contribuir a una mejor comprensión del mecanismo mediante el que EPEC origina el cuadro clínico; además de que los resultados que se obtengan pueden ser aplicables a los SST3 de diferentes microorganismos. Se espera que a largo plazo, el conocimiento acumulado del estudio de estos sistemas, conlleve al desarrollo de fármacos que prevengan y eviten la patogénesis de diversas bacterias.

HIPÓTESIS

La proteína EscN del SST3 de EPEC es la ATPasa asociada al mismo y la proteína EscL actúa como la proteína reguladora de la actividad hidrolítica de EscN.

Los residuos conservados del extremo C-terminal de EscN no participan en la catálisis de la enzima, sin embargo, son importantes para la función de la ATPasa y muy probablemente están involucrados en el reconocimiento de los complejos chaperona-translocador/efector.

OBJETIVO

Realizar una caracterización enzimática de la proteína EscN del SST3 de EPEC y un estudio molecular de su dominio C-terminal, además de determinar que la proteína EscL es la reguladora de la ATPasa del SST3 de EPEC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Demostrar que la proteína EscN es una ATPasa y caracterizar su actividad enzimática.

Evaluar el estado oligomérico de la proteína EscN.

Determinar si la proteína EscL (Orf5) interactúa con EscN y si regula negativamente la actividad catalítica.

Aislar y caracterizar mutantes del C-terminal de EscN con pérdida de función de secreción.

Evaluar la interacción de las mutantes del C-terminal de EscN con diferentes proteínas del SST3 de EPEC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en este estudio se describen en la tabla 2. Las bacterias se cultivaron a 37 °C en medio Luria Bertani (LB, 10 g peptona, 5 g extracto de levadura, 10 g de NaCl) o en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, de Gibco). Cuando se requirió, el medio se suplementó con ampicilina (100 µg ml⁻¹), kanamicina (50 µg ml⁻¹), estreptomycin (50 µg ml⁻¹), cloranfenicol (25 µg ml⁻¹) y/o tetraciclina (25 µg ml⁻¹).

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio		
Cepa	Descripción	Fuente/referencia
Cepas de <i>E.coli</i>		
NovaBlue	Cepa derivada de K12. Mutante en la endonucleasa I, permite obtener una alta eficiencia de transformantes. Resistente a tetraciclina.	Novagen
Top-10	Cepa con una eliminación parcial del gen <i>lacZ</i> que permite la α -complementación. Tiene una alta eficiencia de transformación. Resistente a estreptomycin.	Invitrogen
XL1-Blue	Cepa derivada de K12. Mutante en la endonucleasa I. Resistente a tetraciclina.	Stratagene
BL21(λ DE3) pLysS	Cepa que posee el gen de la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> , el plásmido pLysS que codifica para la lisozima T7 (que reduce la capacidad de transcripción en células no inducidas), y tiene deficiencia en los genes de las proteasas <i>ompT</i> y <i>lon</i> . Resistente a cloranfenicol.	Novagen
M15 [pREP4]	Cepa derivada de K12, carece de una copia cromosomal del gen <i>lacI</i> . Posee el plásmido pREP4 que constitutivamente expresa el gen del represor <i>lac I</i> . Resistente a kanamicina.	Qiagen
Cepas de EPEC		
E2348/69	EPEC silvestre O127:H26. Resistente a estreptomycin.	[8]
Δ escN	E2348/69 conteniendo una eliminación en fase de <i>escN</i> . Resistente a estreptomycin.	[124] Donada por el Dr. J. L. Puente
Cepas de <i>Salmonella</i>		
SJW1368	Cepa no móvil, mutante en los genes reguladores flagelares <i>cheW</i> y <i>flhDC</i> .	[140]
JR501	Cepa mutante del gen <i>galE</i> que permite la incorporación de DNA plasmídico metilado.	[141]

Manipulación de DNA

Los genes *escN* y *escL* (*orf5*) se amplificaron mediante PCR a partir de DNA cromosomal de la cepa silvestre EPEC E2348/69 O:127 H:6, utilizando las DNA polimerasas *Pfu Turbo* (Stratagene) o *Taq* (Invitrogene). Los oligonucleótidos utilizados se describen en el apéndice 2. Todas las enzimas de restricción y la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) se utilizaron de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes.

La visualización de las moléculas de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Sigma). Los diferentes productos de PCR y de restricción enzimática se purificaron utilizando un estuche comercial de extracción de DNA del gel (Qiagen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Las cepas de *E. coli* NovaBlue y Top-10 se utilizaron como hospederas para transformar las diversas reacciones de ligación. Todas las construcciones se secuenciaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular y se compararon con las secuencias reportadas para los genes correspondientes [119].

En la tabla 3 se describen los plásmidos utilizados y las construcciones realizadas en este estudio.

La construcción pAUescN se generó clonando el amplificado del gen *escN* con los oligonucleótidos *escNFw* y *escNRv* como un fragmento *NdeI/BamHI* en el plásmido pUC18. A partir de esta construcción se subclonó el gen *escN* en los vectores pTrc99AFF4 y pET19b utilizando las enzimas *NdeI/BamHI*.

La construcción pATHescN se realizó subclonando el inserto generado de la doble digestión de pAEscN con las enzimas *NcoI* y *BamHI* en el vector pTrc99A digerido con las mismas enzimas.

La construcción pAGescN se generó clonando el amplificado del gen *escN* utilizando los oligonucleótidos *escNGSTF* y *escNGSTR* como un fragmento *BamHI/XhoI* en el plásmido pGEX4T-2.

La construcción pARescLBS se realizó clonando directamente el amplificado del gen *escL* (*orf5*) con los oligonucleótidos *orf5BamF* y *orf5SalR* en el vector pCR-Blunt II-TOPO. La construcción pAQescL se realizó subclonando el inserto generado de la doble digestión de pARescLBS con las enzimas *BamHI/PstI* en el plásmido pQE30.

La construcción pAQ Δ 50escL se generó clonando el amplificado de los oligonucleótidos L51escL y escLPst como un fragmento *Bam*HI/*Pst*I en el plásmido pQE30. Y para la construcción pAQ Δ 89escL se utilizaron los oligonucleótidos R90escL y escLPst, el producto también se clonó como un fragmento *Bam*HI/*Pst*I en el plásmido pQE30.

La construcción pATeN Δ 1-42 se realizó clonando el amplificado de los oligonucleótidos escNGLY42 y escNRv como un fragmento *Nde*I/*Bam*HI en el plásmido pTrc99AFF4. Y para la construcción pATeN Δ 373-446 se utilizaron los oligonucleótidos escNFw y escNEND372, el producto se clonó como un fragmento *Nde*I/*Bam*HI en el plásmido pTrc99AFF4.

Mutagénesis sitio-dirigida

La mutagénesis dirigida de *escN* se realizó siguiendo la metodología del estuche QuickChange (Stratagene). Se utilizaron oligonucleótidos antisentido de 32 bases que contienen la mutación deseada en la parte media de la secuencia (apéndice 2), y como templado para las reacciones de PCR, se utilizaron las construcciones pAEescN y pATHescN. Los productos de las reacciones se digirieron con la enzima *Dpn*I durante 3 h a 37 °C para eliminar el DNA templado metilado, y posteriormente se transformaron en la cepa XL1-Blue. El DNA plasmídico se extrajo de las transformantes y las mutaciones de interés se corroboraron mediante la secuenciación del DNA. Las construcciones generadas con las diferentes mutaciones puntuales en *escN* se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos y construcciones utilizadas en este estudio		
Plásmidos	Descripción	Fuente/referencia
pCR-Blunt II-TOPO	Vector que permite la clonación directa de productos de PCR con extremos romos como los amplificados con la DNA polimerasa <i>Pfu</i> ; con sitio de multiclonación en el gen letal <i>ccdB</i> ; evita el crecimiento de colonias portadoras del plásmido sin inserto. Confiere resistencia a kanamicina y zeocina.	Invitrogen
pGEM-T Easy	Vector que permite la clonación directa de productos de PCR amplificados con la DNA polimerasa <i>Taq</i> ; sitio de multiclonación en el gen <i>lacZ</i> , permite el escrutinio por α -complementación. Confiere resistencia a ampicilina.	Promega

pUC18	Vector de clonación de tamaño pequeño y de alto número de copia. Sitio de multiclonación en el gen <i>lacZ</i> , permite el escrutinio por α -complementación. Confiere resistencia a ampicilina.	New England Biolabs
pQE30	Vector de expresión que fusiona una etiqueta de 6 histidinas en la región 5' del gen clonado, el que queda bajo el control del promotor T5. Confiere resistencia a ampicilina.	Quiagen
pTrc99A	Permite la expresión del gen bajo el control del promotor <i>trc</i> . Confiere resistencia a ampicilina.	Pharmacia
pTrc99AFF4	Vector pTrc99A con su único sitio <i>NdeI</i> eliminado y con el sitio <i>NcoI</i> de la región de multiclonación modificado a <i>NdeI</i> . Confiere resistencia a ampicilina.	[142]
pET19b	Vector de expresión que fusiona una etiqueta de 10 histidinas en la región 5' del gen clonado, el que queda bajo el control del promotor T7. Confiere resistencia a ampicilina.	Novagen
pGEX4T-2	Vector de expresión que fusiona la secuencia de la glutatión S-transferasa (GST) en la región 5' del gen clonado, el que queda bajo el control del promotor <i>tac</i> . Confiere resistencia a ampicilina.	Amersham Biosciences
Construcciones	Descripción	Fuente/referencia
pAUescN	Gen <i>escN</i> en el plásmido pUC18	Este estudio
pAEescN	Gen <i>escN</i> en el plásmido pET19b	Este estudio
pATescN	Gen <i>escN</i> en el plásmido pTrc99AFF4	Este estudio
pATHescN	Gen <i>escN</i> en el plásmido pTrc99A	Este estudio
pAGescN	Gen <i>escN</i> en el plásmido pGEX4T-2	Este estudio
pATeN _{Δ1-42}	Eliminación de los primeros 42 codones del gen <i>escN</i> en el plásmido pTrc99AFF4	Este estudio
pATeN _{Δ373-446}	Eliminación de los últimos 73 codones del gen <i>escN</i> en el plásmido pTrc99AFF4	Este estudio
pARescLBS	Gen <i>escL</i> en el plásmido pCR-Blunt II-TOPO	Este estudio
pAQescL	Gen <i>escL</i> en el plásmido pQE30	Este estudio
pAQ Δ 50escL	Eliminación de los primeros 50 codones del gen <i>escL</i> en el plásmido pQE30	Este estudio
pAQ Δ 89escL	Eliminación de los primeros 89 codones del gen <i>escL</i> en el plásmido pQE30	Este estudio
pAEeNK183E	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual K183E a partir del plásmido pAEescN	Este estudio
pATHeNV393A	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual V393A a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pATHeNV393N	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual V393N a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pATHeNV393P	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual V393P a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pATHeNL395D	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual L395D a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pATHeNG400A	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual G400A a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pATHeNE401A	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual E401A a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pATHeNY402A	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual Y402A a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pATHeNT403A	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual T403A a partir del plásmido pATHescN	Este estudio

pATHeNM404A	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual M404A a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pATHeND411A	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual D411A a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pATHeNI414A	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual I414A a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pATHeNI414P	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual I414P a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pATHeNQ426A	Gen <i>escN</i> con la incorporación de la mutación puntual Q426A a partir del plásmido pATHescN	Este estudio
pMTcT	Gen <i>cesT</i> en el plásmido pTrc99AFF4	[143]
pMTpL	Gen <i>sepL</i> en el plásmido pTrc99AFF4	Gaytán, M. No publicado

Purificación de His-EscN y las mutantes puntuales

Las versiones recombinantes de EscN se sobreprodujeron transformando la cepa de *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS (BDP) con los plásmidos pAEescN, pAEeNK183E, pATHeNV393P, pATHeNL395D, pATHeNE401A, pATHeNY402A y pATHeND411A. El cultivo de células se creció en medio LB con ampicilina a 30 °C, en agitación constante. Al alcanzar una DO_{600} de 0.7 se añadió IPTG a una concentración final de 0.1 mM, y después de 4 h más de incubación, las células se cosecharon por centrifugación y se conservaron a -20 °C. La pastilla se resuspendió en amortiguador de unión (BB) (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 M NaCl) adicionado con 20 mM de imidazol. Las células se rompieron utilizando la prensa de French (10 000 psi) y el lisado se centrifugó (38,000 x g 20 min) para desechar las membranas y las células intactas. El sobrenadante se centrifugó nuevamente (145,000 x g 60 min), y se descartó la pastilla. El sobrenadante se sometió a una cromatografía de afinidad por níquel, en una columna con 2 ml de la resina Ni-NTA-agarosa (Qiagen) preequilibrada con amortiguador BB. La columna se lavó exhaustivamente con 80 ml de amortiguador BB conteniendo 50 mM de imidazol y con 70 ml de BB con 70 mM de imidazol, y la mayor cantidad de proteína recombinante se eluyó a una concentración de 400 mM de imidazol (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl). La proteína purificada se dializó en el amortiguador TNED (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA y 1 mM DTT) para su uso en los ensayos posteriores.

En todos los casos la pureza de las proteínas recombinantes se verificó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS (SDS-

PAGE) y su concentración se determinó con el método de Bio-Rad *protein assay dye-binding reagent* (Bio-Rad).

Purificación de His- Δ 50EscL y His- Δ 89EscL

La cepa de *E. coli* M-15 [pREP4] se transformó con las construcciones pAQ Δ 50escL y pAQ Δ 89escL. La sobreproducción de las recombinantes His- Δ 50EscL y His- Δ 89EscL se realizó como se describió para His-EscN pero a una temperatura de inducción de 25 °C. Las pastillas se resuspendieron en amortiguador de unión BB* (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl), las células se rompieron por presión (10 000 psi) y el lisado se centrifugó (38,000 xg 30 min) para desechar las membranas y las células intactas. El sobrenadante se sometió a una cromatografía de afinidad por níquel como se describió para His-EscN. La columna se lavó con 60 y 15 ml de BB* adicionado con 40 y 60 mM de imidazol respectivamente, y las proteínas se eluyeron en BB* con 200 mM de imidazol. La proteína purificada se dializó en el amortiguador TNED.

Inmunoreconocimiento

Los ensayos de inmunoreconocimiento (*Western Blot*) se realizaron utilizando los anticuerpos policlonales anti-EspB, anti-EspA, anti-EspF, anti-Tir, anti-CesT, anti-SepL y anti-Orf15 generados en nuestro laboratorio (datos no publicados), mediante la inmunización de conejos. Además se utilizó también el anticuerpo monoclonal anti-histidinas (India-His-Probe-HRP; Pierce). Las muestras se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 1 h con amortiguador TBS (20 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl) adicionado con 0.1 % Tween-20 (Sigma) y 5 % de leche libre de grasas y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 h con amortiguador TBS. Se utilizó como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo generado en cabra conjugado a la peroxidasa de rábano (Sigma) y se incubó durante 1 h con amortiguador TBS. La inmunodetección se realizó utilizando los reactivos de detección por quimioluminiscencia del estuche ECLTM (Amersham Biosciences).

Obtención de suero policlonal de conejo anti-EscN

Los anticuerpos policlonales contra EscN se obtuvieron después de inmunizar un conejo en tres ocasiones diferentes con preparaciones frescas de His-EscN purificada y dializada (~200-400 µg). La inmunodetección se realizó con 1.2 µg de proteína purificada y transferida a una membrana de nitrocelulosa mediante un ensayo tipo Western Blot, utilizando los reactivos de detección por quimioluminiscencia de ECL™ (Amersham Biosciences).

Actividad enzimática de ATPasa

La actividad de ATPasa de His-EscN y las mutantes puntuales V393P, L395D, E401A, Y402A y D411A se cuantificó mediante una modificación del método de verde de malaquita [144]. El fosfato inorgánico (Pi) liberado al medio acoplado a molibdato, se determinó colorimétricamente.

La actividad específica se calculó en todas las condiciones analizadas a partir de las pendientes de cursos temporales independientes y considerando la concentración de proteína en la reacción. Los resultados se obtuvieron a partir de ensayos realizados por triplicado utilizando diferentes preparaciones de EscN.

La mezcla de reacción contiene 0.25 µM de EscN, 3 mM de ATP (Sigma), 4 mM de MgCl₂ y 100 mM de Tris-Cl pH 8.0 a 37 °C. A los diferentes intervalos de tiempo se sustrajeron 100 µl de reacción y se analizó el contenido de Pi al añadir 800 µl del reactivo de color (0.034% verde malaquita (Sigma), 1 N HCl, 1.05% molibdato de amonio y 0.1% Triton X-100). Después de 2 min, se añadieron 100 µl de 34% de ácido cítrico y la mezcla se incubó por 25 min a T.A. La absorbancia se determinó a 650 nm y el P_i total en cada reacción se calculó al comparar los valores de densidad óptica con una curva estándar de Pi.

Para los estudios de caracterización enzimática se modificaron las siguientes condiciones: catión metálico divalente (4 mM de CaCl₂, MnCl₂, ZnCl₂ y CuCl₂), concentración de EscN (0.02-0.45 µM), concentración de ATP y MgCl₂ (0.3-4.5 mM), pH al modificar la composición del amortiguador (100 mM MES [pH 6.0 y 6.5], HEPES [pH 7.0 y 7.5] y Tris [pH 8.0 a 9.0]), y temperatura (16-55 °C).

Para determinar la inhibición por ADP EscN (0.25 μ M) se incubó con diferentes concentraciones de ATP y $MgCl_2$ (0.28-1.5 mM) a una concentración fija de ADP y $MgCl_2$ (0.4, 0.7, 1.0 ó 2.0 mM).

Para evaluar la inhibición de la actividad de ATPasa de EscN por la proteína EscL, se combinaron en la mezcla de reacción las proteínas recombinantes His-EscN (0.3 μ M) con His Δ 89-EscL (0.6 μ M) o con His Δ 50-EscL (0.6 μ M) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente, la reacción se inició al añadir el ATP (3 mM).

Cromatografía de exclusión molecular

La proteína His-EscN purificada y dializada se cargó en una columna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia) equilibrada con amortiguador TNED y se corrió a un flujo de 0.4 ml min⁻¹ en un sistema FPLC (Amersham Pharmacia). Como marcadores de peso molecular se utilizaron las proteínas de los estuches de calibración para filtración en gel de alto y bajo peso molecular (Amersham Pharmacia); conteniendo las proteínas: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), aldolasa (158 kDa), albúmina sérica de bovino (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa) y quimiotripsinógeno (25 kDa).

Electroforesis nativa en geles de acrilamida y actividad de ATPasa *in situ*

Para evaluar el estado oligomérico de EscN se realizó una modificación de la técnica de electroforesis en geles azules nativos (BN-PAGE) [145]. La proteína His-EscN se separó mediante BN-PAGE en geles de poliacrilamida en gradiente lineal (4-15%) con 100 mM Tris-HCl, pH 7.5. Se utilizó como amortiguador de cátodo 30 mM Tris, 100 mM glicina y 0.002% Serva blue G (Coomassie blue G-250, de Serva) y de ánodo 100 mM Tris-HCl, pH 7.5. Los ensayos de actividad de ATPasa en el gel se realizaron como se describe en [146]. El desarrollo de la reacción de ATPasa sobre los geles azules requirió previamente la eliminación del exceso de colorante mediante una transferencia semi-seca a 10 V durante 20 min en 20 mM Tris, 150 mM glicina y 20% metanol. Posteriormente los geles se preincubaron por 2 h en 270 mM glicina y 35 mM Tris-HCl, pH 8.0, y la reacción de ATPasa se realizó en 270 mM glicina,

35 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM ATP, 10 mM MgSO₄ y 0.15% Pb(NO₃)₂ a 30 °C. Los precipitados de fosfato de plomo se comenzaron a observar después de 12 h de incubación.

La determinación de masa molecular y el análisis densitométrico se realizó utilizando el *software* AlphaEase StandAlone (Alpha Innotech). Como referencia de masa molecular se utilizaron los mismos marcadores que en los ensayos de exclusión molecular.

Ensayo de secreción de proteínas

El ensayo se llevó a cabo como se describe en [103]. Se inocularon 4 ml de medio DMEM con el antibiótico apropiado con 80 µl de un cultivo de toda la noche en LB de las cepas indicadas, y los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ sin agitación hasta una D.O._{600nm} ~ 1.0. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 17900 x g por 5 minutos. Para evaluar las proteínas secretadas al medio, los sobrenadantes se precipitaron con 10% de ácido tricloroacético (TCA) a 4 °C durante toda la noche. Las muestras se concentraron por centrifugación a 17900 x g por 30 minutos a 4 °C, y las proteínas precipitadas se resuspendieron en amortiguador de carga conteniendo 2% de SDS y 10 % de glicerol y un décimo de Tris saturado para neutralizar el TCA. Para evaluar las proteínas presentes en las células, las pastillas celulares se resuspendieron, en un volumen de amortiguador de carga conteniendo 2 % de SDS y 10 % de glicerol, normalizando de acuerdo con la DO₆₀₀ que alcanzó el cultivo celular. Las fracciones resultantes se separaron por SDS-PAGE y se analizaron mediante ensayos tipo Western Blot con los anticuerpos indicados para cada ensayo.

Análisis estructural de EscN y FliI

El alineamiento de las estructuras atómicas de EscN (PDB: 2OBM) y FliI (PDB: 2DPY) se realizó utilizando la paquetería PyMOL [147]. El modelo homohexamérico de EscN se realizó alineando la estructura de EscN (PDB: 2OBM) sobre las coordenadas de las subunidades α y β de la F₀F₁-ATPasa

mitocondrial de corazón de bovino (PDB: 1BMF) utilizando la paquetería PyMOL [147].

Ensayos de interacción proteína-proteína

Copurificación de HisEscL y EscN por cromatografía de afinidad (*pull-down*)

La proteína recombinante His Δ 89EscL se produjo como se describió anteriormente (450 ml de cultivo) en células M-15[pREP4]. La proteína EscN completa (50 ml de cultivo) y las versiones truncas EscN Δ 1-42 y EscN Δ 373-446 (200 ml de cultivo), se produjeron en la cepa de *Salmonella* SJW1368. La sobreproducción de EscN se realizó de igual manera que para His-EscN, y la inducción de EscN Δ 1-42 y EscN Δ 373-446 se realizó a 16 °C. Todas las pastillas se resuspendieron en amortiguador TN (20 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl) adicionado con 1 mM de PMSF. Las células se rompieron por sonicación, los lisados celulares se centrifugaron (38,000 x g 30 min) y los sobrenadantes se recuperaron. El lisado de His Δ 89EscL se mezcló en partes iguales con los lisados de EscN, EscN Δ 1-42 y EscN Δ 373-446. A las mezclas de lisados se les añadió 120 μ l de resina Ni-NTA-agarosa (Qiagen) y se incubaron durante 4 h en agitación constante a 4 °C. Las mezclas de lisados se empaquetaron en una columna y la resina se lavó con 35 ml de TN adicionado con 40 mM de imidazol. His Δ 89EscL y las proteínas unidas se eluyeron con 250 μ l de TN adicionado con 200 mM de imidazol. Como control negativo, el lisado celular de la cepa *Salmonella* SJW1368 conteniendo a EscN (50 ml de cultivo), se incubó con 120 μ l de resina Ni-NTA-agarosa y se realizó el mismo protocolo que se describió para el *pull-down* con His Δ 89EscL. Las muestras se separaron por SDS-PAGE y las interacciones se evaluaron mediante ensayos tipo Western Blot con anticuerpos contra la proteína EscN.

Copurificación de HisEscN y CesT o SepL por cromatografía de afinidad (*pull-down*)

La proteína recombinante His-EscN silvestre y con las mutaciones puntuales V393P, E401A se sobreprodujeron como se describió anteriormente (50 ml de cultivo) en células BDP. La proteína CesT se produjo en la cepa de *Salmonella* SJW1368 conteniendo el plásmido pMTcT (100 ml de cultivo, inducido con 0.1 mM de IPTG a 30 °C). Todas las pastillas se resuspendieron en amortiguador TN adicionado con 1 mM de PMSF. Las células se rompieron por sonicación, los lisados se centrifugaron (38,000 x g 30 min) y los sobrenadantes se recuperaron. El lisado de CesT se mezcló con el lisado de His EscN o las mutantes V393P o E401A. A las mezclas de lisados se les añadió 120 µl de resina Ni-NTA-agarosa (Qiagen) y se incubaron durante toda la noche en agitación constante a 4 °C. Las mezclas de lisados se empaquetaron en una columna y la resina se lavó con 40 ml de TN adicionado con 40 mM de imidazol. HisEscN y las proteínas unidas se eluyeron con 250 µl de TN adicionado con 400 mM de imidazol. Como control negativo el lisado celular de la cepa *Salmonella* SJW1368 conteniendo a CesT (100 ml de cultivo) se incubó con 120 µl de resina Ni-NTA-agarosa y se realizó el mismo protocolo que se describió para el *pulldown* con HisEscN.

Para evaluar la interacción de His-EscN y la mutante D411A con la proteína SepL se siguió el mismo protocolo descrito para el *pulldown* con la chaperona CesT. Las diferencias consistieron en los cultivos celulares, en este caso conteniendo a His-EscN silvestre o con la mutación D411A (50 ml de cultivo) en células BDP; y la proteína SepL se produjo en la cepa de *Salmonella* SJW1368 conteniendo el plásmido pMTpL (100 ml de cultivo, inducido con 0.1 mM de IPTG a 30 °C). Las interacciones se evaluaron mediante ensayos tipo Western Blot con anticuerpos contra la proteína SepL.

RESULTADOS

PARTE I. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y OLIGOMERIZACIÓN DE EscN

Amplificación y clonación de *escN*

Como se mencionó previamente, debido a la alta similitud de secuencia primaria entre las ATPasas de los SST3, se propuso que el producto del gen *escN* es la ATPasa asociada al inyectisoma de EPEC. Para confirmar esta hipótesis se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen *escN* a partir de la isla de patogenicidad LEE. Debido a que el locus LEE de EPEC E2348/69 se encuentra totalmente secuenciado [119], se utilizó dicha información en el diseño de los oligonucleótidos para los diferentes genes de interés. Más recientemente también se encuentra disponible la secuencia completa del cromosoma de EPEC [148].

El gen *escN* se amplificó mediante PCR utilizando como templado DNA cromosomal purificado de la cepa de EPEC silvestre E2348/69 y utilizando los oligonucleótidos *escNFw* y *escNRv*. El producto de la reacción se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (figura 7A), y se observó un solo fragmento de 1.3 kb correspondiente al tamaño esperado de acuerdo a la secuencia reportada para *escN*. La banda del producto amplificado se purificó y digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*. Paralelamente los vectores pUC18, pTrc99aFF4 y pET19b se digirieron con las mismas enzimas de restricción.

La clonación del gen *escN* se realizó en el vector pUC18 (figura 7B) y la correcta amplificación se corroboró mediante secuenciación nucleotídica. Posteriormente, *escN* se subclonó en los vectores de expresión pTrc99AFF4 (que permite sobreproducir a EscN sin ninguna etiqueta bajo el control del promotor *trc*) y en pET19b (que permite sobreproducir una versión de EscN con una etiqueta de 10 histidinas en el extremo N-terminal bajo el control del promotor T7). Los vectores resultantes se nombraron pATescN y pAEescN respectivamente, (figura 7C y D).

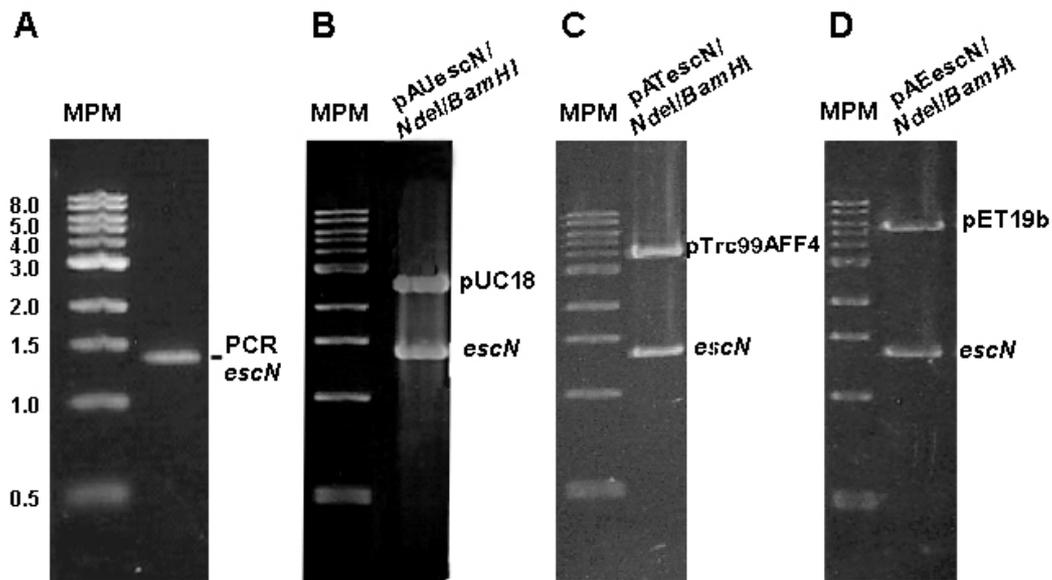


Figura 7. Clonación de *escN*. Electroforesis en geles de agarosa al 1% (A) Amplificación por PCR del gen *escN* tamaño esperado 1.34 kb. (B), (C) y (D) Dobles digestiones *NdeI/BamHI* para confirmar la clonación de *escN* en los vectores pUC18 (2.6 kb), pTrc99AFF4 (4.1 kb) y pET19b (5.7 kb) respectivamente. En todos los casos se utilizó como marcador de peso molecular (MPM) 1 kb DNA Ladder (Sigma).

Purificación de His-EscN

El plásmido pAEescN se transformó en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (BDP) y se realizaron ensayos de sobreproducción de la proteína recombinante (figura 8A). Al separar las diferentes fracciones celulares se observó que His-EscN permanece casi en su totalidad en la fracción insoluble (probablemente formando parte de cuerpos de inclusión), figura 8B. Sin embargo, a partir de la cantidad que permanece en la fracción soluble, se consiguió purificar a His-EscN en condiciones nativas mediante una cromatografía de afinidad por níquel, figura 9A, con un rendimiento de ~1 mg de His-EscN por cada 300 ml de cultivo.

La masa molecular estimada para His-EscN a partir de su secuencia primaria es de 51.8 kDa, sin embargo la proteína recombinante presentó un patrón de migración anómalo en SDS-PAGE a una masa molecular aparente de 45 kDa. No obstante, la identidad de His-EscN se confirmó mediante inmunoreconocimiento utilizando un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas, (figura 9B).

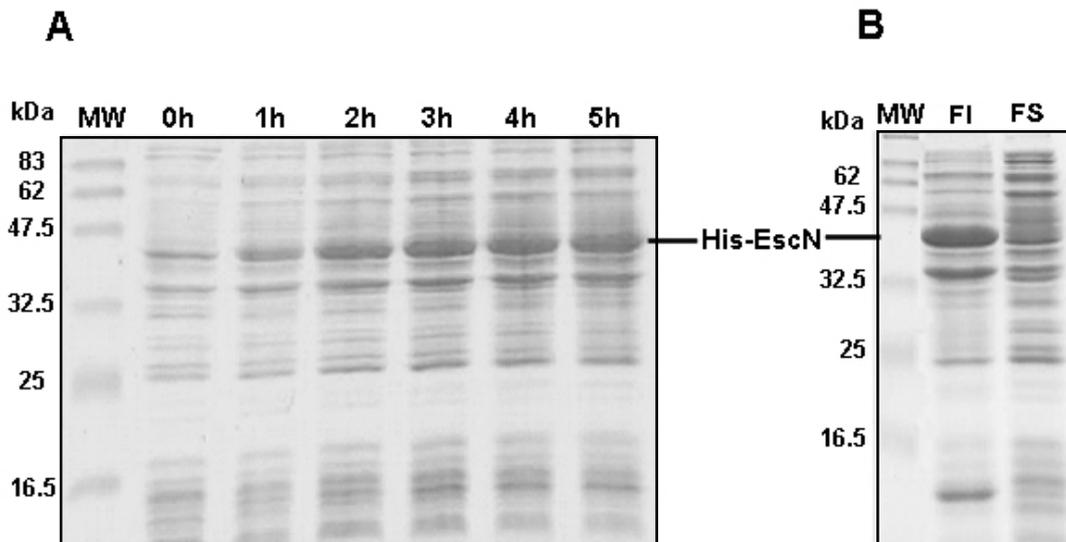


Figura 8. Sobreproducción de His-EscN. (A) El vector pAEescN se expresó en células BDP a 30 °C, después de inducir con 0.1 mM de IPTG se tomaron muestras celulares a diferentes tiempos (de 0 a 5 h). (B) Las células de un cultivo inducido durante 4h con 0.1 mM de IPTG a 30 °C se rompieron por sonicación y se separaron en fracción insoluble (FI) y soluble (FS). En (A) y (B) las muestras se separaron por SDS-PAGE al 15% y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. (MW) marcador de masa molecular (New England Biolabs).

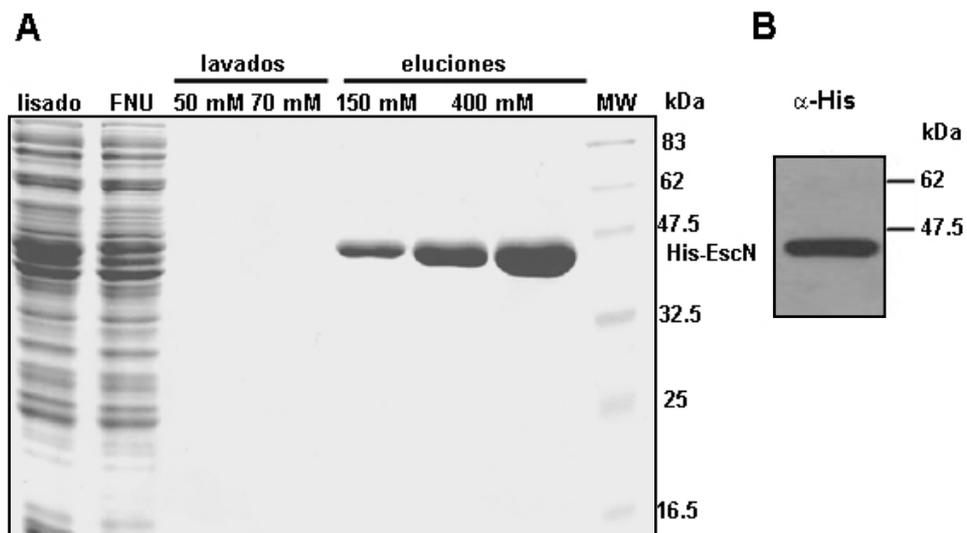


Figura 9. (A) Purificación de His-EscN mediante cromatografía de afinidad por níquel a partir de la fracción soluble (lisado) de un cultivo de BDP/pAEescN inducido como se describió antes, después de lavar con concentraciones bajas de imidazol (50 y 70 mM) la proteína recombinante se eluyó, la mayor cantidad de His-EscN se recuperó con 400 mM de imidazol. (B) Inmunodetección de His-EscN purificada con anticuerpos anti-Histidinas 1:10,000 (Pierce).

Funcionalidad de His-EscN

Para corroborar que la etiqueta de histidinas no afectase la función de EscN se realizaron ensayos de complementación en la secreción de proteínas de una cepa de EPEC mutante nula en el gen de *escN* (la cual se generó mediante intercambio alélico) cuyo fenotipo es secreción e infección nula [124].

Se comparó el perfil de secreción de proteínas translocadoras en medio de cultivo DMEM de las cepas de EPEC silvestre y EPEC $\Delta escN$ sola o con el plásmido pAEescN, (figura 10). La cepa mutante en *escN* pierde por completo la capacidad de secretar proteínas al medio de cultivo vía SST3, mientras que la introducción de *his-escN* a ésta, es capaz de restablecer la secreción de proteínas a niveles comparables a la cepa silvestre. Lo anterior se observó mediante la tinción con azul de Coomassie y la inmunodetección de las proteínas translocadoras EspB y EspA (figura 10, panel inferior). Como control se introdujo el plásmido pET19b vacío en la cepa $\Delta escN$. De esta manera se demostró que la proteína recombinante His-EscN es funcional.

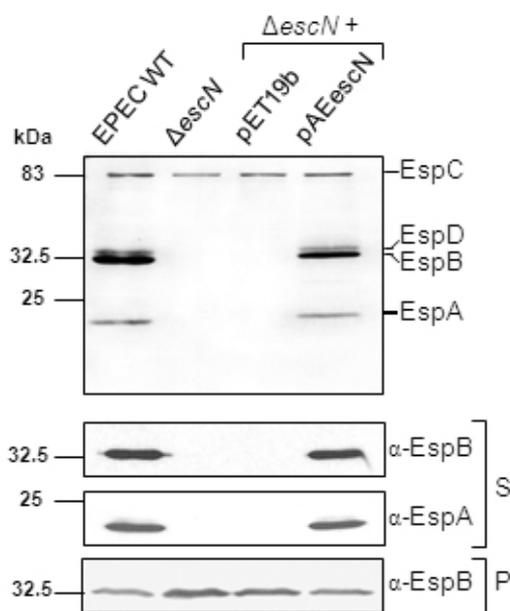


Figura 10. Complementación de la cepa EPEC $\Delta escN$. Panel superior, perfil de secreción de proteínas translocadoras de la cepa EPEC silvestre (WT) y EPEC $\Delta escN$, portadora de pET19b y pAEescN (*his-escN*), tinción con azul de Coomassie. Paneles inferiores, inmunoreconocimiento con anticuerpos específicos contra las proteínas EspB (1:30,000) y EspA (1:50,000) en los sobrenadantes (S) y en las células completas (P). EspC es una proteína que no se secreta vía SST3 y funciona como un control interno.

Adicionalmente, para verificar que la expresión de estos genes no estuviese siendo afectada en ninguna de las condiciones, se realizó la inmunodetección de EspB en las células completas, donde se observaron niveles semejantes en todos los casos (figura 10, panel inferior); en acuerdo con datos previos descritos para la cepa EPEC Δ escN [124].

Caracterización de la actividad de ATPasa de EscN

La proteína purificada His-EscN se utilizó para determinar su capacidad de hidrolizar ATP mediante el método colorimétrico de verde malaquita. Este ensayo permite cuantificar el fosfato liberado durante la reacción ya que forma un complejo con el molibdato y el verde malaquita [149].

En primer lugar se determinó la hidrólisis de ATP por His-EscN a lo largo del tiempo, esta actividad se mantuvo lineal hasta por 30 minutos (figura 11A) y se calculó una actividad específica de 0.36 ± 0.02 μ molas de Pi hidrolizado min^{-1} mg^{-1} de proteína, similar a la actividad reportada para otras ATPasas de SST3 [115,116]. Por otra parte se observó que el cofactor Mg^{2+} es indispensable para la actividad enzimática de EscN (figura 11A).

Para estudiar la especificidad por cationes divalentes en la reacción de ATPasa se añadieron diferentes cofactores a la mezcla de reacción. Se observó que de los cationes analizados el Mg^{2+} sólo puede ser sustituido parcialmente por el Mn^{2+} (50 % de la actividad específica), y la hidrólisis de ATP se abatió casi por completo en presencia de Zn^{2+} , Ca^{2+} o Cu^{2+} (figura 11B). Estos resultados indican que el sustrato de EscN es preferentemente ATP- Mg^{2+} .

Posteriormente se determinaron las condiciones óptimas para la reacción de ATPasa de EscN, la mayor actividad se observó a un pH de 7.5, y variaciones de éste en 0.5 unidades de pH tuvieron un efecto negativo en la actividad de ATPasa, figura 11C. La temperatura óptima para la reacción se determinó entre 30 y 37 °C, y la actividad disminuyó considerablemente a 42 °C, (figura 11D); lo que podría explicarse por una baja estabilidad térmica de la enzima o por la disociación oligomérica (ver más adelante).

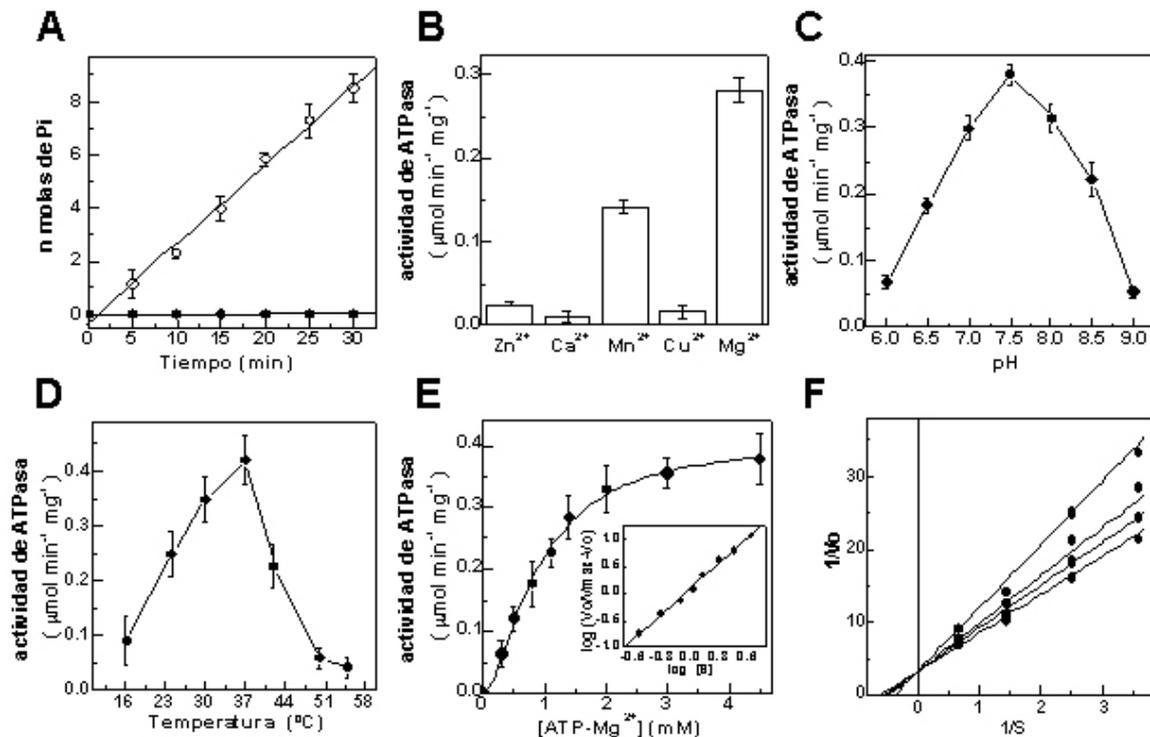


Figura 11. Caracterización cinética de EscN. (A) Curso temporal de la hidrólisis de ATP utilizando 3 mM de ATP, en presencia de 4 mM de MgCl₂ (círculos abiertos), o en ausencia de MgCl₂ (círculos rellenos). (B) Especificidad por cationes divalentes en la actividad de ATPasa. (C) Influencia del pH en la actividad de ATPasa. (D) Dependencia de la actividad de ATPasa por temperatura (E) Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de ATPasa. La actividad específica se determinó con 0.25 μM de His-EscN en 100 mM de Tris-Cl (pH 8.0) e incrementando la concentración de ATP-Mg²⁺ (0-4.5 mM) con un exceso de 1 mM de MgCl₂. El gráfico de la forma logarítmica de la ecuación de Hill se muestra como recuadro. (F) Inhibición por ADP-Mg²⁺. His-EscN se incubó con diferentes concentraciones de ATP-Mg²⁺ (0.28-1.5 mM) y concentraciones fijas de ADP-Mg²⁺ (0.4, 0.7, 1.0 o 2.0 mM).

Adicionalmente se analizó la actividad enzimática de EscN en función de la concentración de sustrato (figura 11E), la reacción presentó una cinética de tipo sigmoide (indicativa de cooperatividad), y los datos se ajustaron utilizando la ecuación de Hill, (figura 11E, interior). Se determinó un valor de V_{max} de $0.41 \pm 0.01 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una $K_{0.5}$ de $0.90 \pm 0.05 \text{ mM}$ por ATP-Mg²⁺. El valor del coeficiente de Hill calculado (1.59 ± 0.13) indica cooperatividad positiva durante la hidrólisis de ATP y sugiere que la oligomerización estimula la actividad de EscN.

Para evaluar el efecto del ADP-Mg²⁺ se determinó la actividad específica de EscN en una concentración constante de sustrato (3 mM) y bajo 4 diferentes

concentraciones de ADP-Mg²⁺ (0.4, 0.7, 1 y 2 mM). Se observó un efecto negativo en la actividad hidrolítica de la enzima; los datos se ajustaron de acuerdo a una inhibición de tipo competitiva y se calculó una K_i de 2.06 ± 24 mM por ADP-Mg²⁺ (figura 11 F).

Oligomerización de EscN

Estudios previos de otras ATPasas del SST3 indican que estas proteínas pueden autoasociarse y formar oligómeros (principalmente hexámeros) con actividades enzimáticas superiores a la de la forma monomérica [80,110].

De igual modo, nuestros resultados cinéticos sugieren la activación de EscN en relación con un proceso de oligomerización. Para establecer cómo la concentración de EscN influencia su actividad específica se examinó la hidrólisis de ATP a diferentes concentraciones de enzima bajo una condición saturante de sustrato (3 mM ATP-Mg²⁺). Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento no lineal indicando que la actividad es dependiente de la concentración, lo cual es consistente con la multimerización de la enzima. Se observó la mayor actividad específica a una concentración de 0.3 μM de EscN (figura 12A).

Para evaluar el estado oligomérico de EscN la proteína recombinante purificada se sometió a una cromatografía de filtración en gel, donde se observó una forma predominante con una masa molecular de 47.3 kDa y que por lo tanto debe corresponder a la forma monomérica de His-EscN (51.8 kDa). A pesar de que no se observó un pico al volumen de elución estimado para la forma hexamérica, se observó un pequeño pico en un volumen de elución equivalente a una masa molecular de 646.9 kDa cercana a la estimada para un dodecámero (622 kDa), figura 12B.

En trabajos previos tampoco se consiguió detectar mediante filtración en gel la forma hexamérica de las ATPasas YscN y FliI además de reportarse la tendencia de estas proteínas a formar agregados de alta masa molecular [80,82,86], como lo observamos en este estudio.

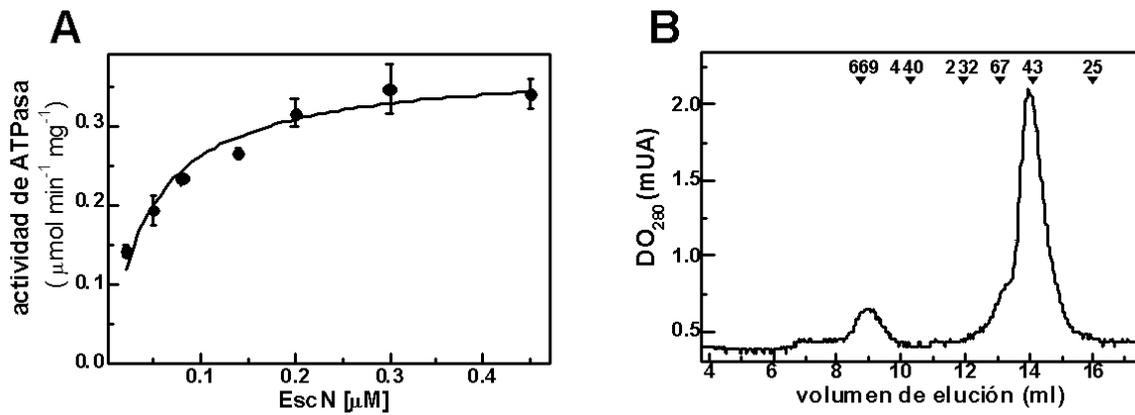


Figura 12. (A) Efecto de la concentración de His-EscN (0.02-0.45 μ M) en la actividad específica bajo concentraciones de sustrato cercanas a las saturantes, 3 mM ATP y 4 mM de MgCl₂. (B) Perfil de elución de His-EscN en cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200 HR 10/30), las puntas de flecha indican la posición de elución de los marcadores de masa molecular utilizados; tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), albúmina sérica de bovino (67 kDa) y quimiotripsinógeno (25 kDa).

Por otra parte, para la ATPasa HrcN del inyectisoma de *Pseudomonas syringae* se ha reportado la formación tanto de hexámeros como de dodecámeros, éstos últimos con una mayor actividad enzimática [110]. Los oligómeros de HrcN se visualizaron mediante crio-microscopía electrónica y se propuso que la forma dodecamérica consiste de dos anillos hexaméricos apilados y asociados por el extremo C-terminal de las subunidades [111].

Para continuar evaluando la oligomerización de EscN se sometió a la proteína recombinante purificada a una electroforesis en geles en gradiente (4-15%) de poliacrilamida azules nativos, BN-PAGE. Esta técnica permitió observar siete diferentes poblaciones de EscN, siendo la forma monomérica la más abundante (figura 13A).

La curva de calibración de masas moleculares presentó una buena correlación ($R^2 = 0.9752$); sin embargo, la forma monomérica presentó una migración anómala a una masa de 62 kDa, figura 13A (en comparación con la masa predicha para His-EscN de 51.8 kDa). Es muy probable que esto sea consecuencia de la baja resolución de esta metodología para masas moleculares menores a los 100 kDa [145]. No obstante, para las masas moleculares de mayor tamaño se obtuvo una buena correlación de acuerdo con la masa predicha para His-EscN, incluyendo la forma hexamérica (327 kDa) y dodecamérica (622 kDa). Además, se observaron diferentes formas

oligoméricas intermedias, que sugieren la existencia de un equilibrio monómero-oligómero altamente dinámico (figura 13A). Las masas moleculares calculadas para el resto de las diferentes formas indican que corresponden al dímero, trímero, tetrámero y octámero de His-EscN.

De acuerdo a nuestros resultados, las formas de menor masa molecular representan la mayor población de EscN en solución, por lo que es probable que la estabilización del oligómero requiera de algún componente adicional del aparato de exportación tipo III, por ejemplo las proteínas del aparato de exportación EscV y/o EscU.

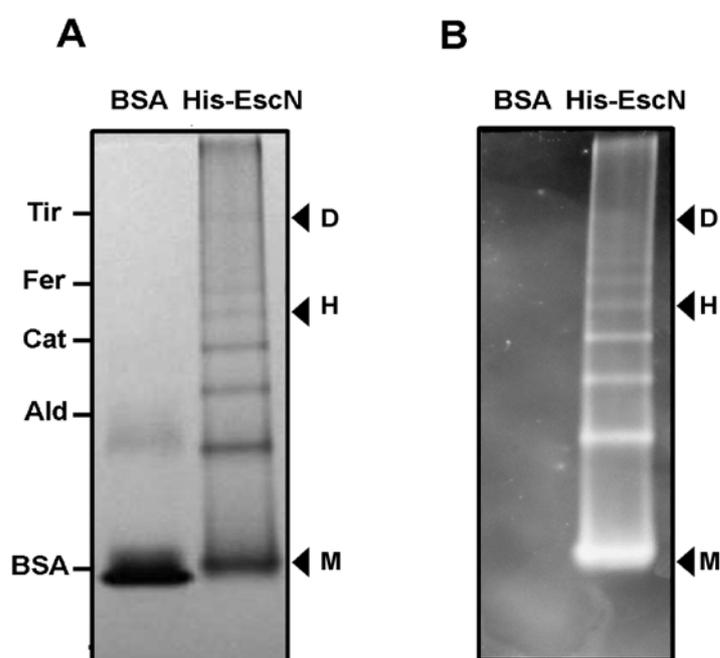


Figura 13. Separación de His-EscN mediante electroforesis en gels nativos y actividad de ATPasa en gel. (A) Patrón de migración de albúmina sérica de bovino (BSA, 67 kDa) y His-EscN en un gel azul nativo (BN-PAGE 4-15%), tinción con Coomassie, a la izquierda se indican los marcadores de masa molecular; Tir (tiroglobulina, 669 kDa), Fer (ferritina, 440 kDa), Cat (catalasa, 232 kDa), Ald (aldolasa, 158 kDa). (B) Hidrólisis de ATP en el gel de las mismas muestras que en (A) separadas por BN-PAGE. Las puntas de flecha indican las formas monomérica (M), hexamérica (H) y dodecamérica (D).

Por otra parte, se realizó un ensayo de actividad de ATPasa *in situ* sobre el gel nativo y se observó la acumulación de precipitados de fosfato de plomo (correspondiente con la zona de hidrólisis de ATP), en las siete formas previamente visualizadas por tinción con Coomassie (figura 13B). A su vez,

mediante densitometría se analizó la relación: actividad de ATPasa/tinción con Coomassie, de las bandas correspondientes en el BN-PAGE. Los resultados mostraron una relación 12 veces mayor para la forma hexamérica en comparación con el monómero (figura 14), lo que sugiere una actividad específica más alta relacionada con la forma hexamérica. No obstante, en este experimento no podemos descartar la posibilidad de oligomerización en el gel durante la reacción de hidrólisis de ATP en las poblaciones de menor masa molecular.

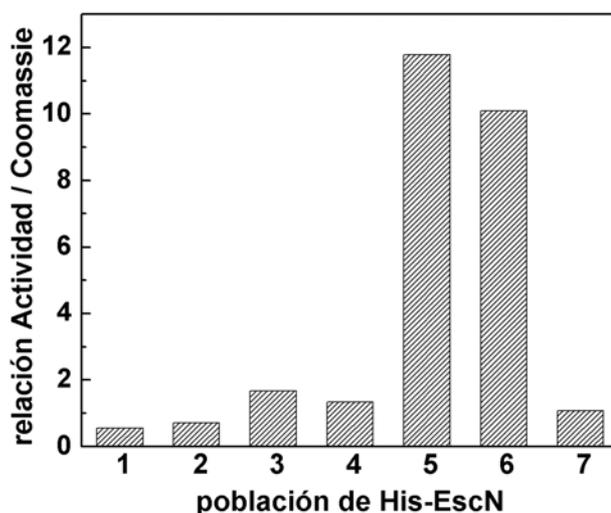


Figura 14. Relación densitométrica de la actividad de ATPasa en el gel y la tinción con Coomassie (en la figura 13 A y B) de las siete diferentes poblaciones de His-EscN separadas mediante BN-PAGE (4-15%) de izquierda a derecha de menor a mayor masa molecular.

Estos resultados en conjunto representan la primera determinación y caracterización de la actividad de ATPasa de la proteína EscN del SST3 de EPEC, así como de su activación catalítica mediada por la autoasociación de subunidades [150]. Aunque el estado oligomérico de EscN *in vivo* aun resulta desconocido, con base en su similitud con las subunidades α y β de la F_0F_1 -ATPasa, en los resultados obtenidos para ATPasas ortólogas [80,81] y en los obtenidos en este trabajo, se sugiere que es un hexámero.

PARTE II. LA PROTEÍNA EscL INTERACTÚA CON EscN E INHIBE SU ACTIVIDAD DE ATPasa

EscL como posible reguladora de la ATPasa en el SST3 de EPEC

La proteína reguladora de la ATPasa es uno de los elementos menos conservados de los SST3 [151], por tal razón la identificación de esta proteína en muchos de estos sistemas no resulta sencilla. Con el fin de encontrar un componente en el SST3 de EPEC que pudiese cubrir la función de dicha proteína, en nuestro laboratorio se realizó un análisis de secuencia de todos los marcos de lectura abiertos de función desconocida (*orf*'s) de la isla LEE de EPEC, y mediante un análisis utilizando el programa BLAST (NCBI), se identificó a la proteína Orf5 como el mejor candidato, presentando un 17 % de identidad con la proteína FliH (reguladora de la ATPasa flagelar) de *Thermotoga maritima*.

En la figura 15 se muestra un alineamiento de secuencia de las proteínas Orf5, FliH y YscL (proteína reguladora del SST3 de *Yersinia* [86]), a pesar de que se encuentran pocos residuos conservados en las tres secuencias es probable que éstos tengan un papel importante en la función de este grupo de proteínas.

```

FliH_Tm  1  -MLLRKDEVFYIDLPRKIEKKEEKVKEEKTKENAAEEIQRIEKMREKILSEAQEEARKIIE
YscL     1  --MSQTCQTGYAYMQPFVQ----IIPSNLSLACGLRILRAEDYQSSLT-----TEELIS
Orf5     1  MIYFLTDLIKFYCLMKLYE---FKNIEIDLVLTEDIIPEDKLEIITQ-----SDDIITK

FliH_Tm  60  GARKDAEEIILSNASSEAEALK-LEAKKVLEEAKTMKNDFOKYIILALKEKIQKQVNRIEEE
YscL     49  AAKQDAEKILADAEVVEQQKQLGWQAGMDEARTLQ-----ATLIHETQLQCQQFYRH
Orf5     51  LARKKTYEHLRLARRKSKELKIESRKKIARKMIAMRERIRKNNKIKLDKEVNSIKWVKD

FliH_Tm  119  I-----LPELLDILRILFKKILEKEMDESTV--ERKLRALSJKVVGIKNVKIRINPED
YscL     102  V-----EQQMSEVLLAVRKILNDYDQVDVT--LQVVREALALVSNQKQVVVRVNPDQ
Orf5     111  IQAIELVLMQDIMNKVHLSLTNALHSLDTSRINWDDLNEVVRETLSNNNIVGAIKITK

FliH_Tm  170  AKKL-----DLSVSKETLIPDPNVERGGVIVETDFGILDKTFSHQWELVEDIFEE
YscL     153  AGAIREQIAKVHKDFPEISYLEVTADARLDQGGCILETEVGIIDASIDGQIEALSRAIST
Orf5     171  NPDIK-----LDPGEANNIQLINDANTPHNKIILENEYIRITLDPLEQISILLNSFKD

FliH_Tm  221  VVGFEHGHPERAEKEVE
YscL     213  TLGQMKVIEEEE-----
Orf5     224  NY--LSIIQE-----

```

Figura 15. Alineamiento de secuencia primaria de las proteínas FliH_Tm (*T. maritima*), YscL (*Y. pestis*) y Orf5 (EscL) de EPEC. Los cuadros oscuros denotan identidad y los grises sustituciones conservativas.

Un estudio bioinformático de la isla LEE de EHEC, en el que se utilizó PSI-BLAST, también propuso la misma hipótesis y renombró el *orf5* como *escL* [128].

Clonación y purificación de EscL

Con base en lo anterior se amplificó por PCR el gen *escL* (*orf5*) de EPEC utilizando los oligonucleótidos *orf5BamF* y *orf5SalR*. El producto de PCR se clonó en el vector pCR-Blunt II-TOPO y la correcta amplificación se corroboró mediante la secuenciación del gen. Posteriormente *escL* se subclonó al vector pQE30 (que permite sobreproducir una versión recombinante con una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal bajo el control del promotor T5), como un fragmento *BamHI/PstI* (dato no mostrado). Los vectores resultantes se nombraron pARescLBS y pAQescL, respectivamente.

La proteína recombinante His-EscL se sobreprodujo a partir del plásmido pAQescL y se observó la inducción de una banda correspondiente a la masa molecular esperada para His-EscL de 27 kDa (figura 16A). Sin embargo, después de separar las fracciones celulares se observó que ésta se mantiene preferentemente insoluble (figura 16B), y no se consiguió purificar a la proteína His-EscL de forma nativa mediante cromatografía de afinidad por níquel (dato no mostrado).

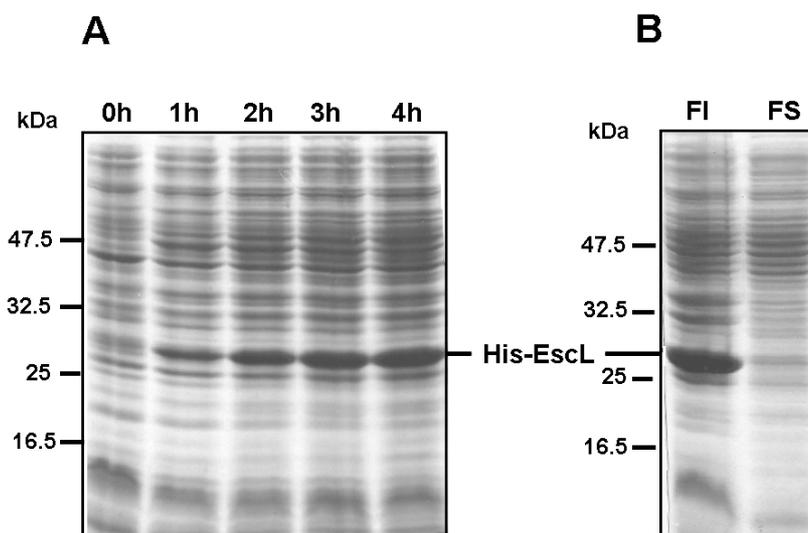


Figura 16. Sobreproducción de His-EscL. (A) La proteína His-EscL se expresó en células de *E. coli* M-15 [pREP4] a partir del plásmido pAQescL a 25 °C, después de inducir con 0.1 mM de IPTG se tomaron muestras celulares a diferentes tiempos (de 0 a 4 h). (B) Las células de un cultivo inducido durante 4h con 0.1 mM de IPTG a 25 °C se rompieron por sonicación y se separaron en fracción insoluble (FI) y soluble (FS). En (A) y (B) las muestras se separaron por SDS-PAGE al 15% y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. A la izquierda se indican las masas moleculares correspondientes.

Con el fin de obtener una proteína EscL soluble se decidió generar un par de versiones carentes del N-terminal de EscL (de los primeros 50 y 89 residuos respectivamente). Esto se realizó considerando reportes previos de la proteína flagelar FliH (posible ortóloga de EscL), que indican que de esta forma la proteína pudiera ser más soluble en comparación con la proteína completa, además de que dichas versiones no deben afectar la interacción e inhibición de la actividad de ATPasa de EscN [84,152].

Para generar la versión carente de los primeros 89 codones, el producto del amplificado con los oligonucleótidos R90escL y escLPst se clonó como un fragmento *Bam*HI/*Pst*I en el vector pQE30 (figura 17A y B). Mientras que para la versión carente de los primeros 50 codones el producto del amplificado con los oligonucleótidos L51escL y escLPst se clonó como un fragmento *Bam*HI/*Pst*I en el vector pQE30 (figura 17A y C). Las construcciones resultantes se nombraron pAQ Δ 50escL y pAQ Δ 89escL y su correcta amplificación se verificó mediante la secuenciación del DNA.

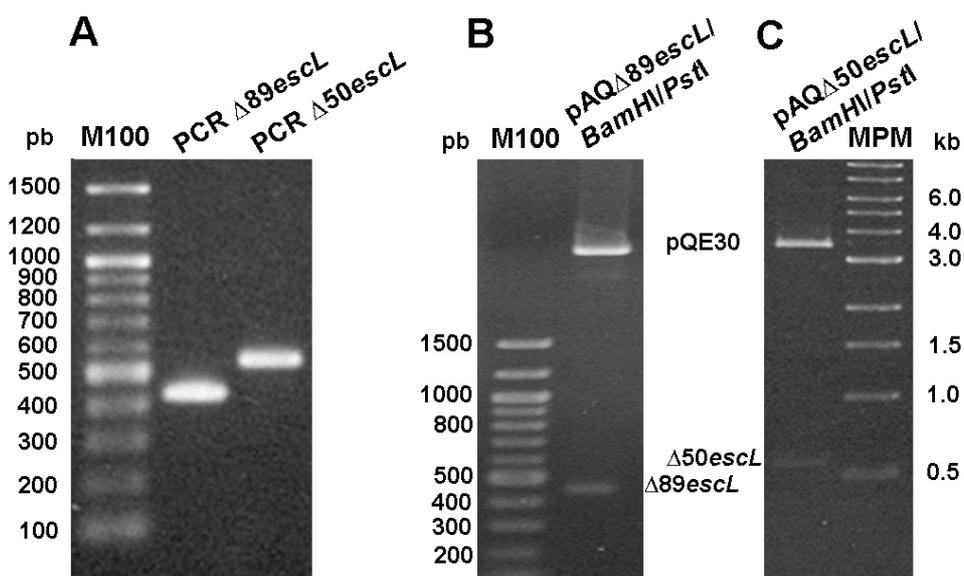


Figura 17. Clonación de recortes del 5' de *escL*. Electroforesis en geles de agarosa al 1.2% (A) Amplificación por PCR del gen *escL* ($\Delta 89$ y $\Delta 50$), con un tamaño esperado de 420 y 445 pb respectivamente. (B) y (C) Dobles digestiones *Bam*HI/*Pst*I para confirmar la clonación de $\Delta 89escL$ y $\Delta 50escL$ en el vector pQE30 (3.4 kb). Se utilizaron como marcadores de peso molecular (MPM) y (M100) 1 kb DNA Ladder y 100 pb DNA Ladder respectivamente (ambos de Sigma).

La cepa de *E. coli* M-15 [pREP4] se transformó con las construcciones pAQ Δ 50EscL y pAQ Δ 89EscL y se realizaron ensayos de sobreproducción y

solubilidad de las versiones recombinantes (dato no mostrado). A pesar de que la mayor cantidad de proteína recombinante se observó en la fracción insoluble, se consiguió purificar ambas proteínas a partir de la fracción soluble en condiciones nativas mediante cromatografía de afinidad por níquel (figura 18). Las proteínas migran de acuerdo con su masa estimada en un gel desnaturalizante de poliacrilamida, His Δ 50EscL a 22 kDa y His Δ 89EscL a 17.7 kDa (figura 18). La proteína carente de los primeros 50 residuos resultó más insoluble en comparación con la carente de los primeros 89 residuos, por lo que se purificó una menor cantidad de His Δ 50EscL (figura 18B).

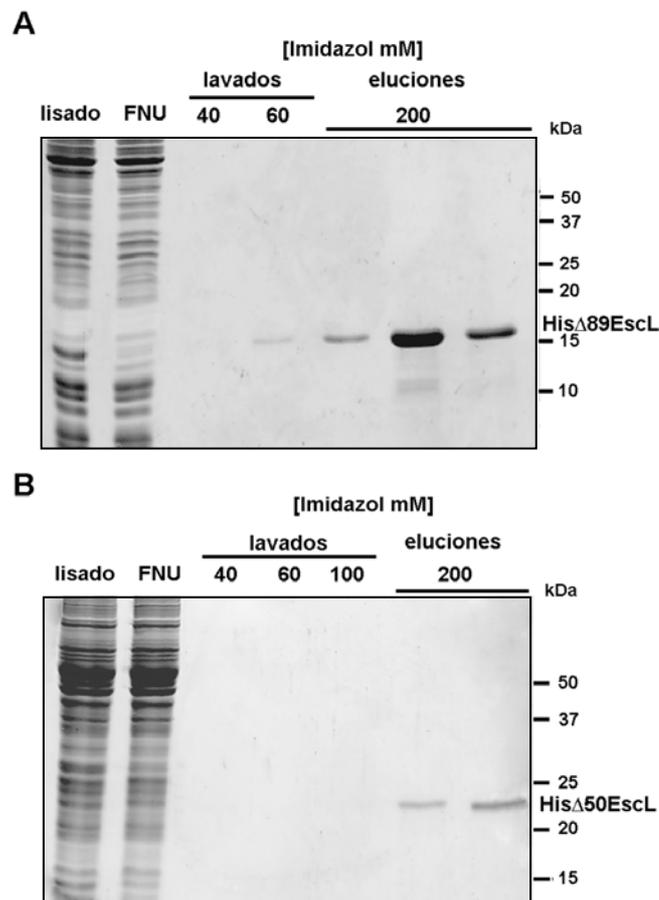


Figura 18. Purificación de las versiones truncas de la proteína EscL (A) His- Δ 50EscL y (B) His- Δ 89EscL, mediante cromatografía de afinidad por níquel a partir de la fracción soluble (lisado) de un cultivo de M15 [pREP4]/pAQ Δ 50escL o pAQ Δ 89escL, inducido con 0.1 mM de IPTG a 25 °C durante 4h. Después de lavar con concentraciones bajas de imidazol (40 y 60 mM) la proteína recombinante se eluyó con 200 mM de imidazol. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE al 12.5% en (A) y al 15% en (B). A la derecha se indican las masas moleculares correspondientes.

Interacción EscN-EscL e inhibición de la actividad de ATPasa

Para determinar que EscL interactúa con la ATPasa EscN se realizaron ensayos de interacción proteína-proteína tipo *pull-down* mediante cromatografía de afinidad por níquel. Los lisados celulares conteniendo a las proteínas His- $\Delta 89$ EscL y EscN sin ninguna etiqueta (a partir de la construcción pATescN, figura 7C), se incubaron junto con la resina de Ni-NTA durante 4 h a 4°C. Después de lavar la resina con concentraciones bajas de imidazol se observó la retención específica de EscN por el complejo Ni-NTA-His- $\Delta 89$ EscL (figura 19A y B). Se utilizó la resina de Ni-NTA sola como control negativo (figura 19C). Estos resultados indican que existe interacción entre las proteínas EscL y EscN.

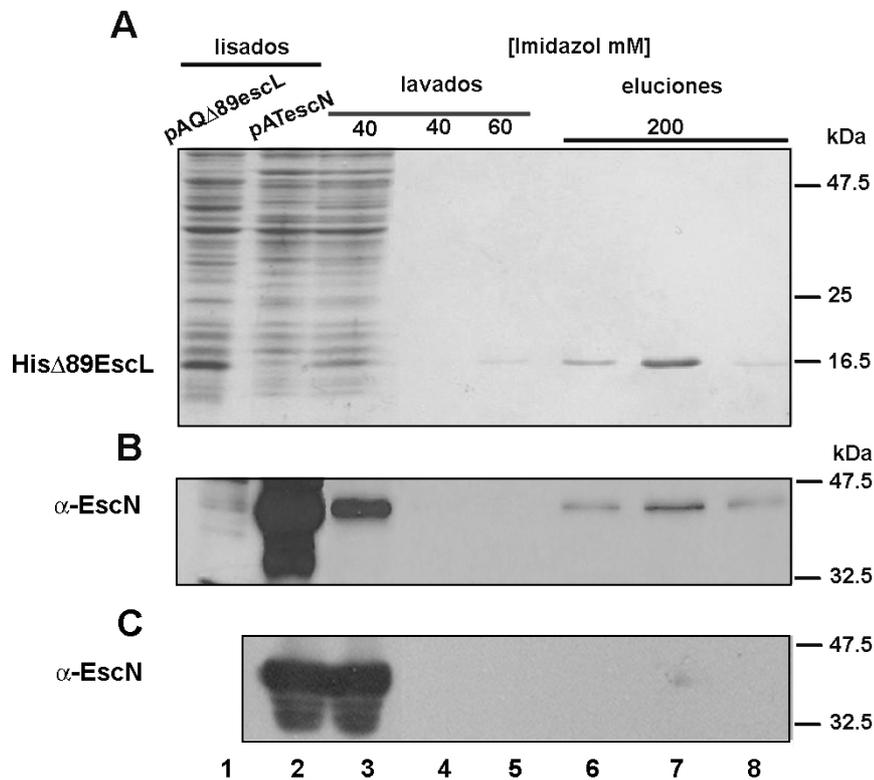


Figura 19. Interacción del dominio carboxilo de EscL y EscN. (A) Ensayo tipo *pull-down* de His- $\Delta 89$ EscL y EscN. Se incubaron los lisados de las células M15 [pREP4]/pAQ $\Delta 89$ escL y SJW1368/pATescN más la resina de Ni-NTA a 4 °C durante 4h, posteriormente se recuperó el primer volumen de lavado con 40 mM de imidazol (carril 3) y después de lavar con 40 y 60 mM de imidazol (carril 4 y 5, respectivamente) se eluyeron las proteínas con 200 mM de imidazol (carriles 6-8), las muestras se separaron por SDS-PAGE (15%) y se visualizaron por tinción con Coomassie. (B) Inmunoreconocimiento de la proteína EscN de las mismas muestras que en (A), transferidas a una membrana de nitrocelulosa, con suero policlonal de conejo contra EscN.

(C) Como control negativo se incubó el lisado de SJW1368/pATescN con la resina Ni-NTA sola. El suero contra EscN se utilizó en (B) y (C) a una dilución de 1:8,000. A la derecha de cada panel se indican las masas moleculares correspondientes.

La identificación de EscN en este ensayo de interacción se realizó mediante inmunodetección con anticuerpos policlonales contra esta proteína (figura 19B y C) generados en conejo (ver metodología).

Estos resultados indican que EscL interactúa con la ATPasa EscN y además sugieren que los primeros 89 residuos (de los 231 totales) de EscL no son requeridos en dicha interacción, es decir que muy probablemente el dominio carboxilo de EscL es la región de la proteína que reconoce a la ATPasa, como se ha determinado para el sistema flagelar [84].

Para evaluar el efecto de EscL sobre la actividad de ATPasa de EscN se purificaron las proteínas recombinantes His-EscN, His- Δ 89EscL y His- Δ 50EscL mediante cromatografía de afinidad por níquel (figura 20A). Las proteínas purificadas se dializaron y se utilizaron para evaluar la actividad de ATPasa de EscN por el método de verde malaquita.

En primer lugar, se combinaron las proteínas recombinantes en la mezcla de reacción y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se inició la reacción enzimática al añadir el ATP (3 mM). De acuerdo con nuestros resultados anteriores (figura 12A), la concentración de His-EscN utilizada en estos ensayos (0.3 μ M) correspondió a la requerida para la formación del oligómero. Adicionalmente, ya que se ha reportado que la proteína reguladora interactúa en un relación de 2:1 con la ATPasa [82], se decidió utilizar el doble de concentración (0.6 μ M) de ambos recortes de EscL.

La actividad enzimática de His-EscN disminuyó drásticamente en las reacciones que contenían tanto la recombinante His Δ 89-EscL como a His Δ 50-EscL. La hidrólisis de ATP en presencia de His Δ 89EscL y His Δ 50EscL se estimó en 16.6 y 13.3 % respectivamente, de la actividad observada para His-EscN sola (figura 20B). Adicionalmente como un control negativo, se evaluó la actividad enzimática de EscN en presencia de BSA, no se observaron cambios en la hidrólisis de ATP (dato no mostrado).

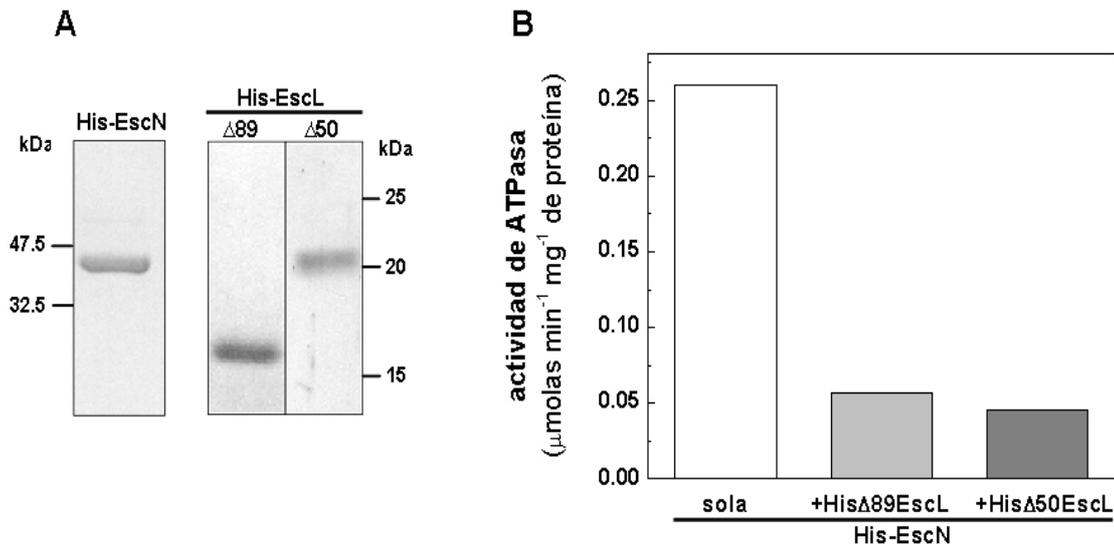


Figura 20. Regulación negativa de EscN por EscL. (A) Tinción con Coomassie de las proteínas recombinantes (His-EscN, His Δ 89EscL y His Δ 50EscL) separadas mediante SDS-PAGE al 16%. A la derecha se indican las masas moleculares correspondientes. (B) Actividad de ATPasa de His-EscN (0.3 μM) sola o en presencia de His Δ 89EscL o His Δ 50EscL (0.6 μM) a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 3 mM de ATP. La actividad específica se determinó a partir de la pendiente de los cursos temporales independientes.

En conjunto estos resultados preliminares demuestran que la proteína EscL interactúa con la ATPasa EscN, e inhibe su actividad enzimática. Es decir que actúa como una proteína reguladora que probablemente evite la oligomerización de EscN, como se sugiere que ocurre con las proteínas ortólogas en el sistema flagelar [82].

Región de EscN que participa en la interacción con EscL

Por otra parte, se decidió evaluar la región de EscN que reconoce a la proteína EscL, por tal motivo se generaron dos recortes de EscN, el primero carente de la región N-terminal (los primeros 42 residuos), y el segundo de la región C-terminal (los últimos 64 residuos), figura 21A. Los recortes de *escN* Δ 1-42 y Δ 373-446 se generaron mediante PCR utilizando los pares de oligonucleótidos *escN*GLY42 y *escN*Rv; y *escN*Fw y *escN*END372, respectivamente.

Los productos de PCR (figura 21B) se digirieron y se clonaron como fragmentos *NdeI/BamHI* en el vector de expresión pTrc99AFF4; los plásmidos

resultantes se nombraron pATeN Δ 1-42 y pATeN Δ 373-446, respectivamente (figura 21C). Su correcta amplificación se verificó mediante la secuenciación del DNA.

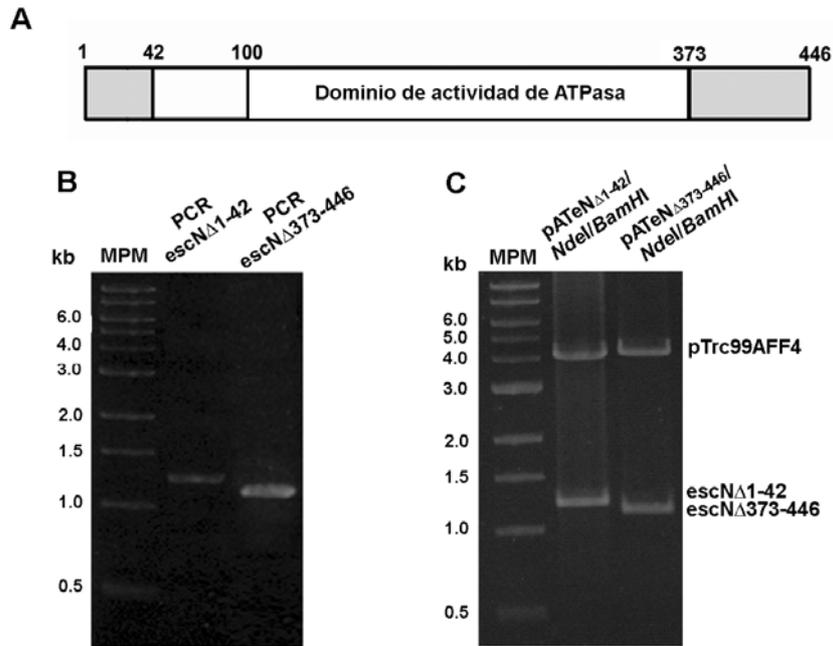


Figura 21. Clonación de diferentes regiones de *escN*. (A) Esquema de la proteína EscN que señala en gris los residuos que se eliminaron, en la región N-terminal (del 1 al 42) y en la región C-terminal (del 373 al 446). (B) Amplificación por PCR de los recortes del gen *escN* Δ 1-42 y Δ 373-446, tamaño esperado de 1.2 y 1.1 kb respectivamente. (C) Dobles digestiones *NdeI/BamHI* para confirmar la clonación de *escN* Δ 1-42 y *escN* Δ 373-446 en el vector pTrc99AFF4 (4.1 kb). Como marcador de peso molecular (MPM) se utilizó 1 kb DNA Ladder (Sigma).

Para la sobreproducción de estas versiones de EscN, los plásmidos pATeN Δ 1-42 y pATeN Δ 373-446 se transformaron en la cepa de *Salmonella* SJW1368. Se observó una banda abundante en las masas moleculares estimadas (44.1 y 40.3 kDa, respectivamente); sin embargo, sólo una pequeña proporción se mantiene en la fracción soluble (figura 22). No obstante, la cantidad de proteína presente en la fracción soluble resultó suficiente para realizar los ensayos de interacción con EscL.

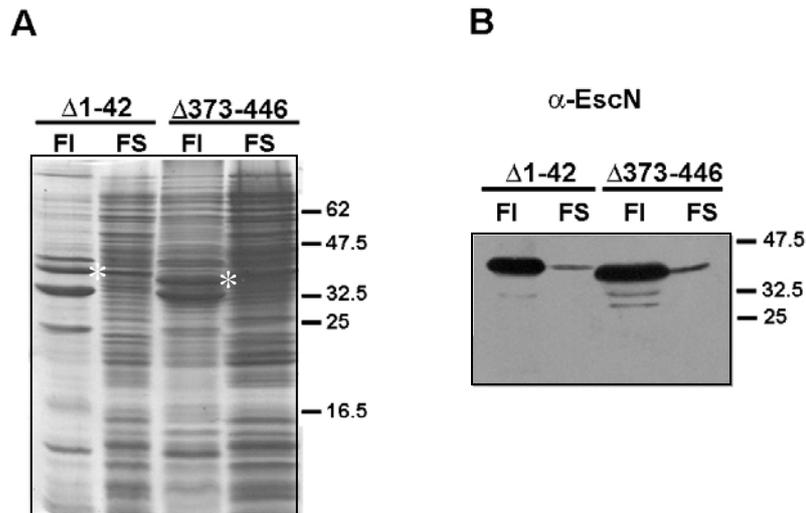


Figura 22. Sobreproducción y solubilidad de EscN $_{\Delta 1-42}$ y EscN $_{\Delta 373-446}$ (A) Los plásmidos pATeN $_{\Delta 1-42}$ y pATeN $_{\Delta 373-446}$ se expresaron en células de *Salmonella* SJW1368 a 25 °C. Después de inducir con 0.1 mM de IPTG durante 4 h, se cosecharon las células y se rompieron por sonicación. Las fracciones celulares se separaron en insoluble (FI) y soluble (FS), las muestras se separaron por SDS-PAGE al 15% y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. Los asteriscos indican la posición de EscN $_{\Delta 1-42}$ (superior) y de EscN $_{\Delta 373-446}$ (inferior). (B) Inmunoreconocimiento de EscN $_{\Delta 1-42}$ y EscN $_{\Delta 373-446}$ de las mismas muestras que en (A) transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con suero contra EscN (1:10 000). A la derecha se indican las masas moleculares correspondientes.

Los ensayos de interacción tipo *pull-down* utilizando los recortes de EscN se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita previamente para la proteína completa, aunque debido a la menor solubilidad de las proteínas EscN $_{\Delta 1-42}$ y EscN $_{\Delta 373-446}$ se utilizó un volumen 4 veces mayor de lisado celular. Esta relación permitió tener cantidades similares de cada una de las proteínas (figura 23A, carril 2).

La mezcla de lisados celulares conteniendo a His- $\Delta 89$ EscL con EscN completa o EscN $_{\Delta 1-42}$ o EscN $_{\Delta 373-446}$ y la resina de Ni-NTA, se incubó durante 4 h a 4 °C. Después de lavar la resina se observó la elución de la proteína EscN completa, y del recorte EscN $_{\Delta 373-446}$ junto con la recombinante His- $\Delta 89$ EscL (figura 23A, panel superior e inferior, respectivamente). De modo interesante la versión carente del la región N-terminal, EscN $_{\Delta 1-42}$, no fue retenida por His- $\Delta 89$ EscL (figura 23A, panel central). Esto indica que el N-terminal de EscN interactúa con la proteína reguladora.

La presencia de His- $\Delta 89$ EscL en estos ensayos se confirmó mediante su inmunoreconocimiento con un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas (figura 23B).

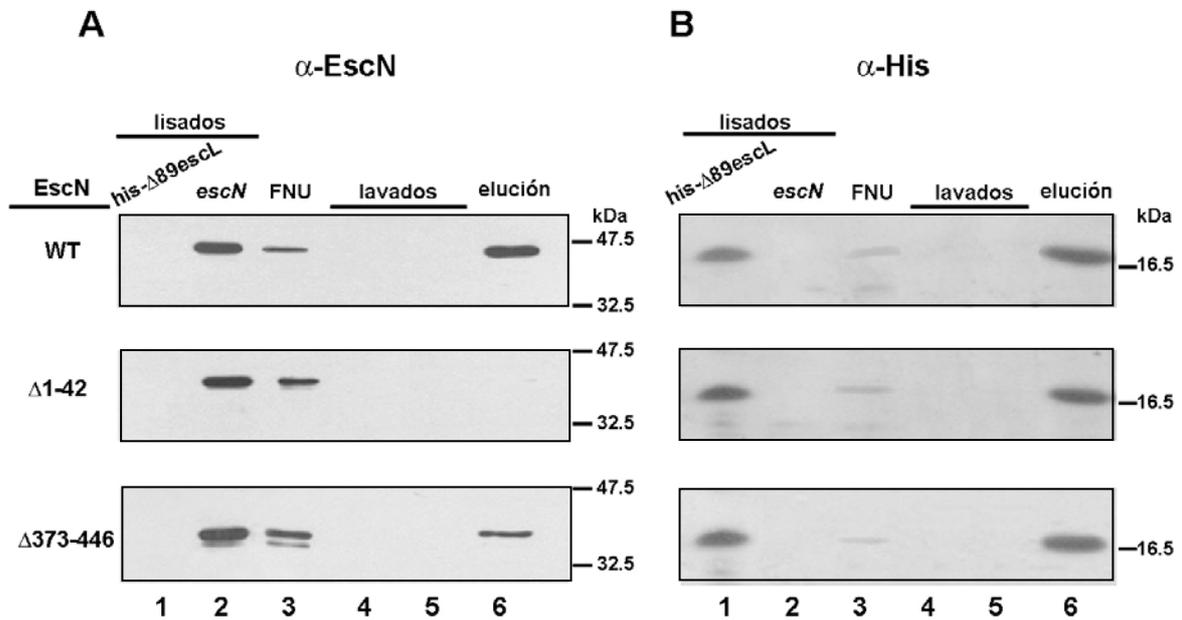


Figura 23. Región de EscN que interactúa con EscL. (A) Inmunodetección de EscN en los ensayos de interacción con la proteína His- $\Delta 89$ EscL. Los lisados celulares conteniendo a EscN (carril 2) completa (WT, panel superior) o los recortes EscN $_{\Delta 1-42}$ (panel medio) o EscN $_{\Delta 373-446}$ (panel inferior) se incubaron con un lisado celular conteniendo a la recombinante His- $\Delta 89$ EscL (carril 1) más la resina de Ni-NTA a 4 °C durante 4h. Posteriormente se recuperó la fracción no unida (FNU) y después de lavar la resina con 40 mM de imidazol (carriles 4 y 5) las proteínas se eluyeron con 400 mM de imidazol (carriles 6). Las muestras se separaron por SDS-PAGE (15%), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se probaron con el suero contra la proteína EscN (1:10 000). (B) Inmunodetección de His- $\Delta 89$ EscL de las mismas muestras que en (A) con el anticuerpo contra la etiqueta de histidinas (1:10 000), para corroborar la presencia de His- $\Delta 89$ EscL en todos los casos. Las masas moleculares se indican a la derecha de cada panel.

Los resultados descritos en esta sección demuestran la interacción de las proteínas EscN y EscL del SST3 de EPEC e indican que EscL es la proteína reguladora de este sistema. Además, se determinó que el C-terminal de EscL y el N-terminal de EscN son las regiones involucradas en dicha interacción, lo que sugiere fuertemente que la formación del complejo ATPasa-regulador y los mecanismos de inhibición enzimática son semejantes en el sistema flagelar y en los inyectisomas.

PARTE III. ANÁLISIS MOLECULAR DEL DOMINIO C-TERMINAL DE EscN

Análisis de la estructura primaria de EscN

Debido a la similitud de secuencia primaria de las ATPasas de los SST3 flagelar y de virulencia, y de éstas con las subunidades α y β de la F_0 - F_1 ATP-asa (figura 24); así como a la similitud de sus estructuras tridimensionales de EscN y Flil monoméricas, se considera que el mecanismo de hidrólisis de ATP en ambas familias debe ser semejante [102,103,113].

EscN	1	MISEHDSVLEKYPRIQKVLNSTVPALSLSNSSTRYE	GKIINIGGTIIK	ARLPKARIGAFYK
Flil	1	-----MTTRLTRWLTALDNFEAKMALLPAVRRY	GRLTRATGLVLEA	TGLQLPLGATCI
1SKYE	1	-----MTRGRVIOVMG-----	PVVDVKFENGHLP	----AIYNALKIQHKARNENE
1SKYB	1	-----MSIRAEIEISALIKQQIENYESQIQVSDV	ETVIQVGDGIARA	HGLDNVMSGEAV
EscN	61	IE-----PSQRLAEVIAIDEDVFLLPFEHVS	SMYCSQWLSYQ	---GDEFK----IRVG
Flil	54	IERQDGPETKEVESEVVGFNQRLFLMPLLEEVE	GILPGARVYARNGH	GDGLQSGKQLPLG
1SKYE	42	VD-----IDLTLVALHLGDDTVRTIAMASTD	GLIRGMEVIDT	---GAPIS----VPVG
1SKYB	54	EF-----ANAVMGMALNLEENNNGIVILGPYT	GIKEGDEVRRT	---GRIME----VPVG
EscN	108	DALLGRLLIDGIGRPMESNIVAPYLPFERSLYAEP	PDPLLRQVIDQPFIL	SVRAIDGILTC
Flil	114	PALLGRVLDGGGKPLDG-LPAPDTLETGALITPP	PNPLQRTPIEHVLD	TVRAINALLTV
1SKYE	89	QVTLGRVFNVLGEPIDLEGDIPADARRDPIHR	PAPKFEELATEVEI	LETGIKVVDLAPY
1SKYB	101	ETLIGRVVNPLGQPVVG-LGPVETTETRPIES	RAPGVMDRRSVHE	PLQTGIKAI DALVPI
		CAJA WALKER A		
EscN	168	GIGRIGIFAGSGVGKS-TLLGMICN---	GASADIIVLALIG	ERGREVNEFLA-LLPQST
Flil	173	GRGQRMGLFAGSGVGKS-VLLGMMAR---	YTRADVIVVGLIG	ERGREVKDFIENILGPDG
1SKYE	149	IKGGKIGLFGGAGVGKT-VLIQELIHNIAQEH	GGISVFAGVGER	TREGNDLYHEMKDSGV
1SKYB	160	GRGQRELIIGDRQTGKTSVAIDTIINQ---	KDQNMCIYVAIG	QKESTVATVVE TLAKHGA
		CAJA WALKER B		
EscN	223	LSKCVLVVTTSDRPALERMKA AFTATTIAEY	FRD-QGKNVLLMMD	SVTRYARAARDVGLA
Flil	229	RARSVVIAAPADVSPLLRMQGAAYATRIAED	FRD-RGQHVLIMD	SLTRYAMAQREIALA
1SKYE	208	ISK TAMVFGQMN EPPGARMRVALTGLTMAEY	FRDEQGQDGLLF	IDNIFRFTQAGSEVSAL
1SKYB	218	PDYTIVVTASASQPAPLLFLAPYAGVAMGEY	FMI-MGKHVLLVVID	LLSKQAAAYRQLSLL
EscN	282	SGEPDVRGGFPSPVSSLPKLLERAG--	PAPKG--SITAIYTVL	LESNDVNDPIGDEVRS
Flil	288	IGEP PATKGYPPSVFAKLPA LVERAG--	NGIHGGGSI	TAFYTVLTEGDDQDPIAD SARA
1SKYE	268	LGRMP SAIGYQPTLATEMGQLQERIT--	STAKG--SITSIQAI	YVPADDYTD PAPAT TFS
1SKYB	277	LRRPPGREAYPGDIFYLHSRL LERAAKLS	DAKGGSLTALP	FVETQAGDISAYIPTNVIS
EscN	338	ILDGHIVLTRELA EENHFP AIDIGLSAS	RVMH-NVVTSEHL	RAAA ECKKLIATYKNVELL
Flil	346	ILDGHIVLSRR LAEAGHYPAIDIEASIS	RAMT-ALITEQHY	ARVRLFKQLLSFQRNRDL
1SKYE	324	HLDATTNLERKLAEMGIYPAVDPLVST	SRALAPEIVGEEHY	QVARKVQOTLERYKELQDI
1SKYB	337	ITD GQIFLQSDLFFSGVRPAINAGLSV	RVGG-AAQIKAMKK	VAGTLRLDLAAYR---EL
EscN	397	IRIGEYTMGQDPEADKAIKNRKLIONFIOQ	STKDISSYEKTIES	LFKVVA-----
Flil	405	VSVGAYAKGSDPMLDKAITLWPQLEAFLOQ	GIFERADWEDSL	QALDLIFPTV-----
1SKYE	384	IAILGMDELSD-EDKLVVHRARRIQF	FLSONFHVAEQFT	GQPGSYVPVKETVRGFKELLE
1SKYB	393	EAF AQFGSDLKATQANVARGARTVEVLKQ	DLHQPIPV EKQVLI	IYALTRGFLDDIPVED
EscN		-----		
Flil		-----		
1SKYE	443	GK-----YDHLPEDRFRLVGRIEEVVEK	AKAMGVEV	-----
1SKYB	453	VRRFEKEFYLWLDQNGQHLLHIRT	TKDLPNEDDLNQA	IEAFKKTFFVVSQ

Figura 24. Alineamiento de secuencia primaria de las ATPasas de SST3, EscN (inyectisoma EPEC), flagelar Flil (*Salmonella*) y las subunidades β (1SKYE) y α (1SKYB) de *Bacillus* PS3 termófila. Se indican los residuos que conforman las cajas de Walker A y B. Los cuadros oscuros denotan identidad y los grises sustituciones conservativas.

Por otra parte, como se mencionó, se considera que la ATPasa del SST3 se compone de tres dominios: (i) el N-terminal involucrado en su oligomerización y en la interacción con la proteína reguladora; (ii) el central o catalítico y; (iii) el C-terminal, aunque muy poco caracterizado, se relaciona con la región que reconoce los complejos chaperona-efector [98,102,103].

La importancia del C-terminal en el reconocimiento de los complejos chaperona-efector se determinó a partir de la caracterización de la mutación puntual L376P en la proteína InvC (ATPasa del inyectisoma de *Salmonella*) pues dicha mutación evita la interacción de InvC con la chaperona SicP (sola o en complejo con su efector, SptP) a diferencia de la enzima silvestre [98,105]; sin embargo, se conoce muy poco aun acerca de los mecanismos moleculares involucrados en dicha función de la ATPasa. Para comenzar a estudiar las propiedades del dominio C-terminal de esta familia de proteínas en este trabajo se realizó un alineamiento múltiple de diferentes ATPasas, tanto de inyectisomas como flagelares.

Cuando se analizó la posición correspondiente a la Leu376 de InvC, el alineamiento múltiple reveló que este residuo (figura 25, renglón del asterisco negro) sólo se encuentra conservado en las ATPasas de inyectisomas, como un residuo hidrofóbico, generalmente valina. En EscN dicha posición corresponde a la Val393. Sin embargo, en las ATPasas flagelares esta posición está por lo general representada por un residuo polar sin carga (asparagina principalmente), aunque también en algunos casos por el aminoácido polar alanina (figura 25, renglón del asterisco negro).

Adicionalmente, el alineamiento de secuencias nos permitió identificar cinco residuos en este dominio, cercanos a la L376/V393 de InvC/EscN, que están altamente conservados en las diferentes ATPasas tanto de inyectisomas como flagelares (figura 25, asteriscos azules). Estos comprenden los residuos Gly400, Tyr402, Gly405, Asp411 y Gln426 en la proteína EscN; de aquí en adelante la notación de los residuos de las ATPasas se describirá con base en la secuencia de EscN, (figura 25 primer renglón). Debido a que son aminoácidos idénticos de la región carboxilo y al antecedente mencionado para InvC [98], se consideró que estos cinco residuos también podrían participar en el reconocimiento de los complejos chaperona-sustrato o bien, tener un papel crítico en la función de la enzima.

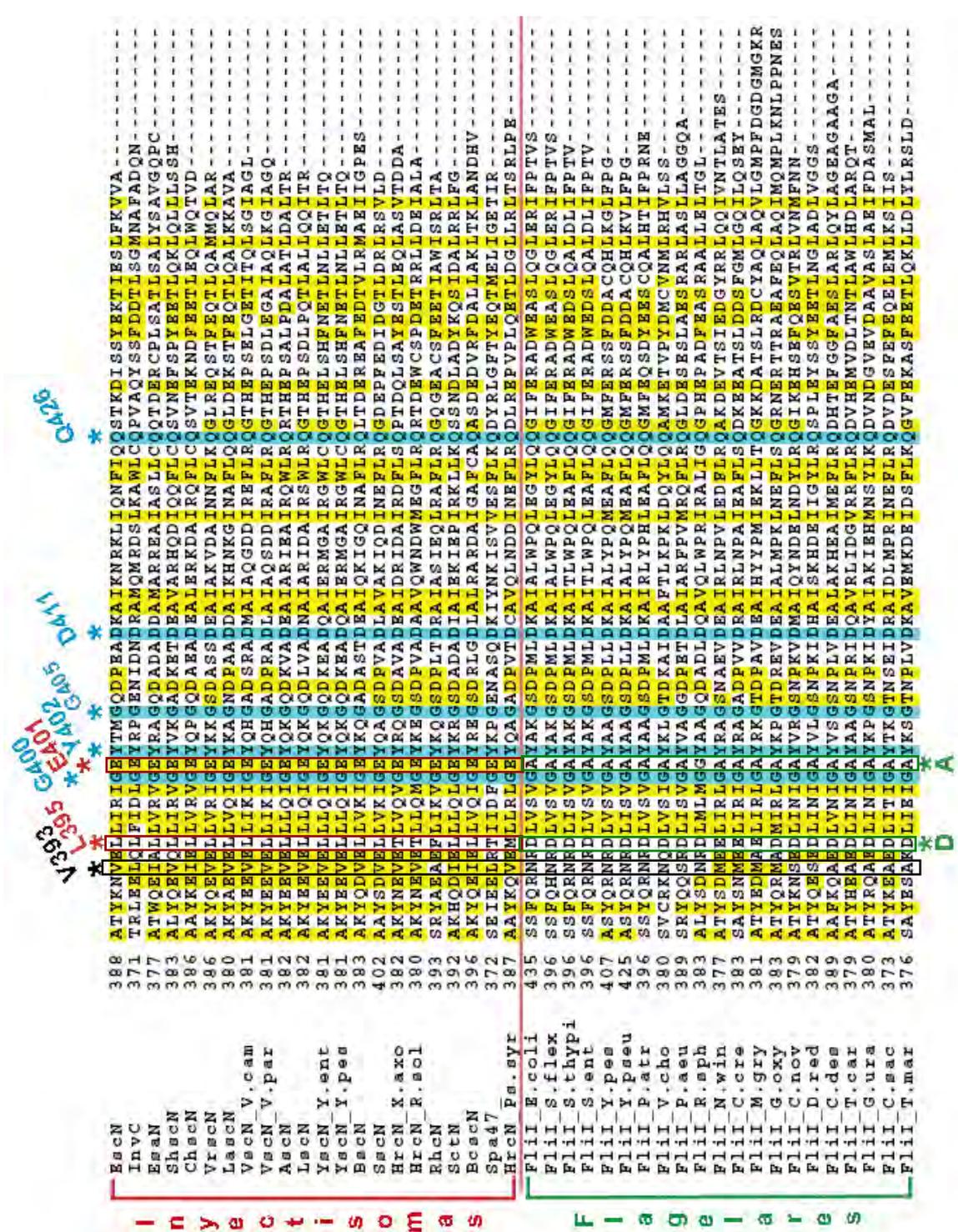


Figura 25. Alineamiento múltiple de secuencias del C-terminal de ATPasas del SST3, de inyectisomas y flagelares (la línea rosa divide ambos grupos). Los residuos marcados en azul denotan identidad y los marcados en amarillo sustituciones conservativas. El asterisco negro indica la posición equivalente a la L376 de InvC, que en EscN es la V393. Los asteriscos rojos y verdes indican los residuos conservados de acuerdo al grupo de ATPasas, de inyectisomas o flagelares, respectivamente. Las proteínas de inyectisomas alineadas son, del primer al último renglón: EscN (EPEC), InvC (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium), EsaN (*Edwardsiella*

tarda), ShscN (*Shewanella baltica*), ChscN (*Chromobacterium violaceum*), LascN (*Lawsonia intracellularis*), VscN (*Vibrio campbellii* y *parahaemolyticus*), AscN (*Aeromonas hydrophila*), LscN (*Photobacterium luminescens*), YscN (*Yersinia enterocolitica* y *pestis*), BscN (*Bordetella bronchiseptica*), SscN (*Stappia aggregata*), HrcN (*Xanthomonas axonopodis*, *Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas syringae*), RhcN (*Bradyrhizobium japonicum*), SctN (*Lysobacter enzymogenes*), BscN (*Burkholderia cenocepacia*), Spa47 (*Shigella flexneri*). Las ATPasas flagelares (Flil) de: *E. coli*, *S. flexneri*, *S. thypi*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Pectobacterium atrosepticum*, *V. cholerae*, *P. aeurogenosa*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Caulobacter crescentus*, *Magnetospirillum gryphiswaldense*, *Gluconobacter oxydans*, *Clostridium novyi*, *Desulfotomaculum reducens*, *Candidatus desulforudis*, *Thermosinus carboxydivorans*, *Geobacter uraniireducens*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* y *Thermotoga maritima*.

Por último, se identificaron otros dos residuos conservados que distinguen a los dos grupos de ATPasas flagelares o de inyectisomas, el primero representa la L395 de EscN, que en las ATPasas de inyectisomas es por lo general un residuo no polar (principalmente leucina) (figura 25, asteriscos rojos); mientras que en las ATPasas flagelares es un residuo cargado negativamente (principalmente aspartato) (figura 25 asteriscos verdes). El segundo residuo corresponde al E401 de EscN, que en las ATPasas de inyectisomas siempre es un residuo con carga negativa; pero en las flagelares se encuentra un residuo pequeño (alanina generalmente). De acuerdo con estas diferencias y con su posición cercana a la V393, se consideró que los residuos correspondientes a la L395 y E401 de EscN podrían, además de participar en el reconocimiento de las proteínas a ser secretadas, tener un papel en la selectividad de la ATPasa por sus sustratos de acuerdo con el correspondiente SST3 (inyectisoma o flagelo).

Análisis de la estructura terciaria de EscN

Para conocer más a detalle la localización y conformación de los residuos conservados del C-terminal de las ATPasas que previamente identificamos, éstos se ubicaron en las estructuras atómicas de EscN y Flil [102,103]. Asimismo, para comparar la región C-terminal de las proteínas se realizó un alineamiento estructural de estas ATPasas (utilizando la paquetería PyMOL) (figura 26).

Es importante señalar que la estructura de EscN (además de carecer de los primeros 102 residuos) se resolvió con la mutación puntual V393P. Al comparar la región C-terminal de EscN con el cambio V393P, con la estructura atómica de Flil (en la que dicha posición la ocupa el residuo Asn400), notamos que estos residuos son parte de una α -hélice (denominada C1 en [58]). Sin embargo, en EscN la introducción del residuo de prolina afecta la estructura de esta α -hélice C1, rompiéndola y generando una pequeña asa o *loop* (figura 26). Además también afecta algunos residuos consecutivos que se encuentran en el asa que separa las α -hélices C1 y C2, (figura 26B). De aquí en adelante nos referiremos a dicha región como asa A.

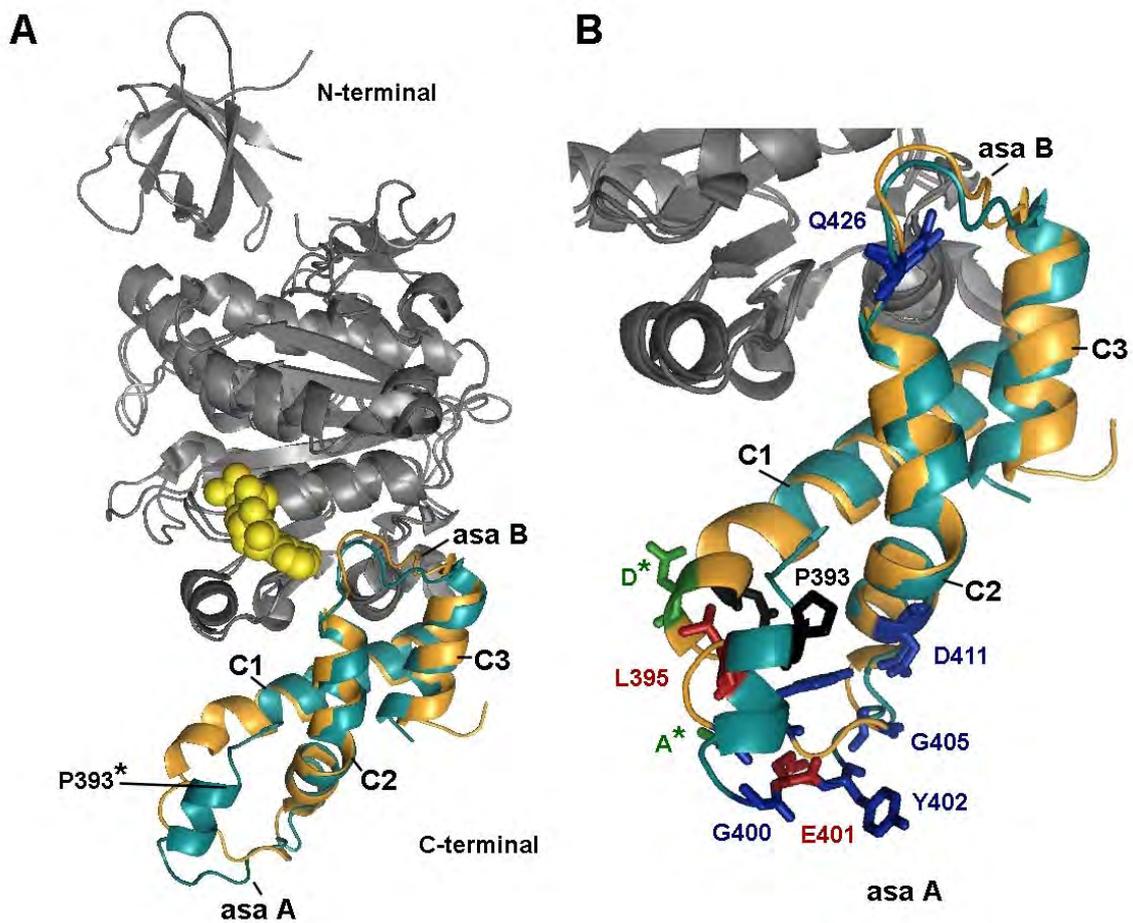


Figura 26. Alineamiento estructural de EscN Δ 1-102 V393P (PDB; 2OBM) y Flil (PDB; 2OPY). En cian y naranja se marcan los residuos del dominio carboxilo terminal de EscN y Flil, respectivamente. (A) Vista lateral de las estructuras completas, se indica la posición de la mutación V393P en EscN que afecta la α -hélice C1 (C1). En esferas amarillas se marca la molécula de ADP. (B) Amplificación del alineamiento estructural del C-terminal. Se muestran las cadenas laterales de los residuos correspondientes a las posiciones marcadas con asteriscos en el alineamiento de la figura 24; V393P en negro (mutación equivalente a la L376P

de InvC), G400, Y402, G404, D411y Q426 en azul (residuos conservados), L395 y E401 en rojo (residuos conservados diferencialmente) y sus correspondientes en Flil en verde (D* y A*). Las α -hélices C2 y C3 se marcan como C2 y C3, respectivamente. El alineamiento estructural y las figuras se realizaron con la paquetería PyMOL [147].

En cuanto a los 5 residuos idénticos del dominio C-terminal identificados en el alineamiento de la figura 24, observamos que tres: G400, Y402 y G405 se ubican en el asa A que conecta las hélices C1 y C2; el residuo D411 en la α -hélice C2 y por último, el residuo Q426 en el asa B, (figura 26). Mientras que los residuos conservados diferencialmente, L395 y E401, se ubican en la α -hélice C1 y en el asa A, respectivamente (figura 26).

Para contar con una aproximación de la región C-terminal en el contexto oligomérico de la ATPasa, se modeló un homohexámero de EscN Δ 1-102 V393P utilizando como templado las coordenadas de las subunidades α y β del sector F₁ (utilizando la paquetería PyMOL) (figura 27); de forma similar a como se ha reportado previamente [103].

El modelo del homohexámero de EscN reveló que la mayoría de los residuos del C-terminal se encuentran expuestos en el oligómero, principalmente los últimos residuos de la α -hélice C1, todos los del asa A y la mayoría de la α -hélice C2. Debido a esto, podrían representar un sitio blanco para la interacción de los complejos chaperona-efector o de alguna otra proteína (figura 27). En cuanto a los residuos de la α -hélice C1, debido a la mutación V393P presente en la estructura de EscN, consideramos probable que en la enzima silvestre su orientación sea diferente, muy semejante a la de los residuos correspondientes en Flil (figura 26).

La orientación de la ATPasa del SST3 que más se ajusta a las evidencias experimentales predice la localización de la región N-terminal asociada a la membrana interna bacteriana, mientras que el C-terminal se encontraría orientado hacia el citoplasma [81,87,105,110]. Esto sugiere que el N-terminal de EscN puede asociarse, además de con la proteína reguladora FliH (resultados descritos en la parte II), con los componentes del aparato de exportación, por ejemplo, con los dominios solubles de las proteínas FliA y FliB; mientras que el C-terminal estaría reconociendo a los complejos chaperona translocador/efector.

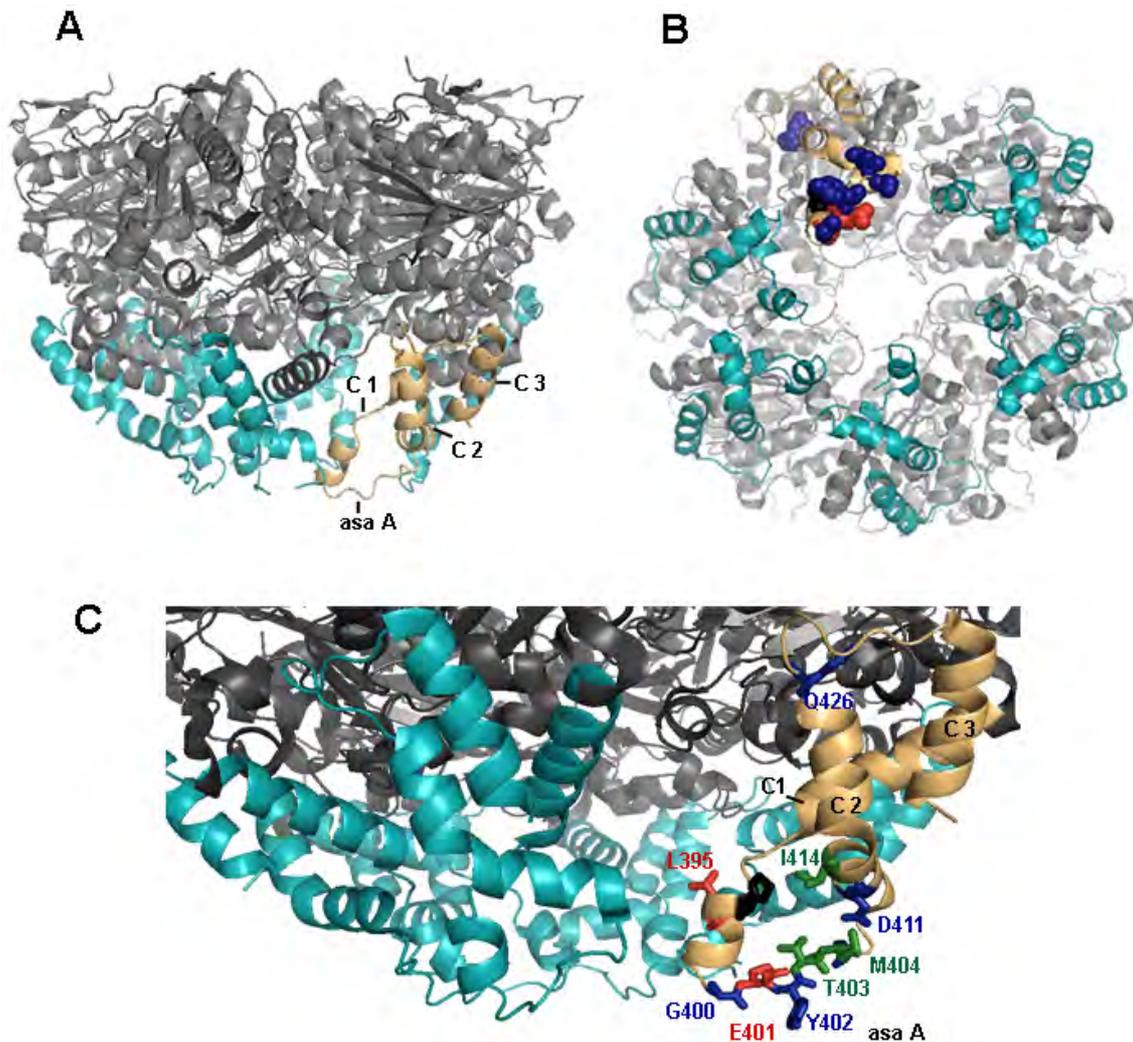


Figura 27. Modelo del homohexámero de EscN Δ 1-102 V393P. Se colorean los residuos de cada monómero de EscN que se encuentran alineados en la figura 24, en color cian los de cinco monómeros y por claridad los del sexto monómero en color naranja claro. (A) Vista lateral y (B) vista inferior del homohexámero. (C) Amplificación del C-terminal del modelo. En todos los casos se indican las α -hélices C1, C2 y C3 (C1-C3). En (B) y (C) se representan en esferas y bastones, respectivamente, las cadenas laterales de los residuos: G400, Y402 y G405 (en azul), V393 (en negro), L395 y E401 (en rojo) y T403, M404 e I414 (en verde). Para la construcción del homohexámero de EscN se utilizaron como templado las coordenadas de las subunidades α y β del sector F_1 (PDB; 1BMF). El alineamiento estructural y las figuras se realizaron con la paquetería PyMOL [147].

Para la subunidad β de la F_0F_1 -ATPasa se ha descrito que la unión e hidrólisis del ATP generan cambios conformacionales importantes en su estructura, siendo el C-terminal una de las regiones más flexibles, en particular los residuos correspondientes a los de las α -hélices C1 y C2 en las ATPasas

de SST3 [153]. La similitud estructural que comparten estas enzimas hace suponer que también en las ATPasas de los SST3 ocurren estos cambios conformacionales y podrían constituir uno de los mecanismos de acoplamiento de la energía de hidrólisis con la energía cinética que permita la secreción de proteínas vía SST3.

Con base en lo anterior se decidió generar una serie de mutantes puntuales en el C-terminal de EscN y caracterizar su efecto en la complementación de una mutante nula de EPEC en el gen *escN*.

Generación de mutantes puntuales del C-terminal de EscN

Tomando en cuenta nuestros alineamientos de secuencia primaria (figura 25), los antecedentes de la literatura y la ubicación de los residuos del C-terminal de EscN en el modelo hexámero (figura 27), se generaron las siguientes mutantes puntuales en la ATPasa. En la α -hélice C1: la mutación V393P, y en esta misma posición los cambios V393A y V393N (el cambio por el residuo correspondiente en la ATPasa flagelar); mutaciones que nos permitirían confirmar o descartar que el residuo V393 represente un sitio crítico para el reconocimiento de los complejos chaperona-efector y para la función de la enzima [98]. En cuanto a los residuos idénticos se realizaron las mutaciones G400A y Y402A, en el asa A; D411A de la α -hélice C2 y Q426A en el asa B. Para el caso de los residuos conservados diferencialmente se realizaron los cambios por los correspondientes residuos flagelares: L395D (de la α -hélice C1) y E401A (del asa A).

Además, se realizaron las mutaciones de los residuos del asa A; T403A y M404A, los cuales no están conservados, sin embargo se predice que se encuentran expuestos en el oligómero (figura 27) por lo que se consideró que también podrían tener un papel importante.

En la α -hélice C2 se realizaron los cambios I414A e I414P con el fin de analizar también la importancia estructural de esta otra α -hélice.

Para generar las diferentes mutantes de *escN*, se subclonó el gen *escN* a partir del plásmido pAEescN como un fragmento *NcoI/BamHI* (fragmento que además del gen *escN* completo incluye la secuencia de 10 histidinas del vector

pET19b y el sitio de unión a ribosoma) en el vector de expresión pTrc99A, y el plásmido resultante se nombró pATHescN (figura 28). La mutagénesis sitio dirigida se realizó mediante la metodología QuickChange (Stratagene). Se diseñaron todos los pares de oligonucleótidos antisentido necesarios (tabla 2), los cuales contienen la mutación deseada en la parte media de su secuencia, y como templado para las reacciones de PCR se utilizó el plásmido pATHescN. La correcta incorporación de todas las mutaciones realizadas se confirmó mediante la secuenciación del DNA. Los plásmidos resultantes se nombraron pATHeN_{V393P}, pATHeN_{V393A}, etcétera (tabla 1).

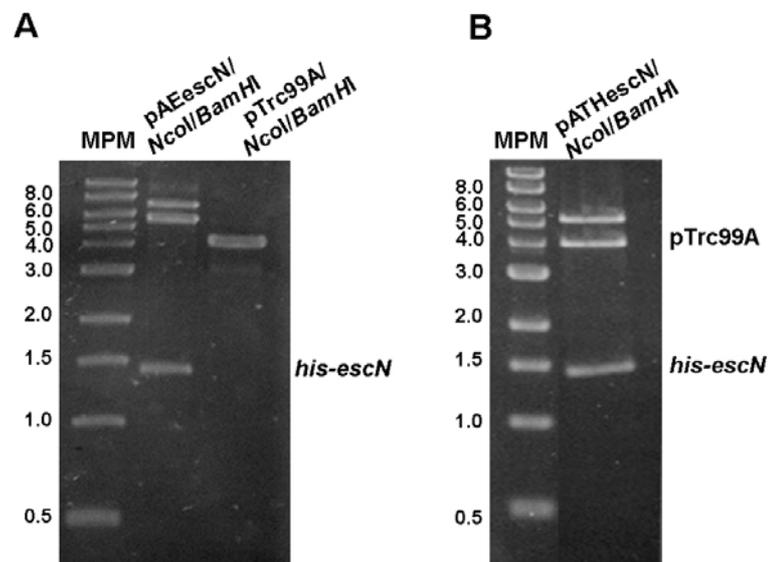


Figura 28. Subclonación de *his-escN*. Electroforesis en geles de agarosa al 1% (A) Dobles digestiones *NcoI/BamHI* de los plásmidos pAEscN y pTrc99A. El inserto liberado (*his-escN/NcoI/BamHI*) y el vector pTr99A/*NcoI/BamHI* se purificaron para realizar la subclonación en este último. (B) Doble digestión *NcoI/BamHI* de pATHescN para confirmar la subclonación. Las bandas de mayor tamaño pueden corresponder a los vectores no digeridos eficientemente. Se utilizó como marcador de peso molecular (MPM) 1 kb DNA Ladder (Sigma).

Efecto de las mutaciones puntuales del C-terminal de EscN en la complementación de una cepa EPECΔescN

Los plásmidos con el gen *escN* silvestre y con éste mutagenizado se transformaron en la cepa de EPECΔ*escN* y se analizó la capacidad de las diferentes versiones de *escN* de complementar la secreción de proteínas translocadoras y efectoras (figura 29).

Los sobrenadantes precipitados se separaron por medio de una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y las proteínas secretadas vía SST3 se visualizaron mediante la tinción con azul de Coomassie (figura 29A) o mediante inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales específicos contra las proteínas EspA y EspB (figura 29B).

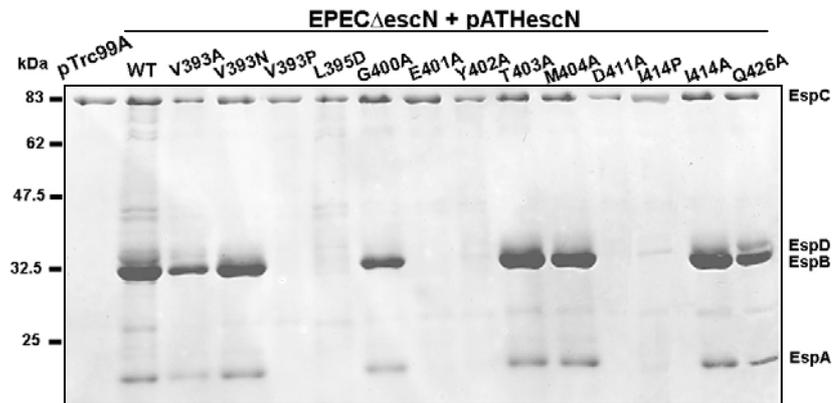
Como ha sido reportado para la ATPasa InvC [98], se observó que la sustitución V393P en EscN provoca la pérdida de función de la proteína y se evita la complementación de la secreción de la cepa EPEC Δ escN (figura 29, carril 5), de modo consistente también con [103]. No obstante, este mismo residuo (V393) tolera los cambios por alanina y asparagina (figura 29, carril 3 y 4), lo que sugiere que la pérdida de función en EscN V393P y en InvC L376P es consecuencia de la pérdida de estructura de la α -hélice C1 (figura 29, carriles 3-5).

De las cuatro sustituciones por alanina realizadas en los residuos conservados, los cambios Y402A y D411A afectaron la función de la ATPasa, siendo más drástico el efecto para el cambio en el residuo D411 (figura 29, carriles 9 y 12). Estos resultados indican por primera vez el importante papel tanto del asa A como de la α -hélice C2 (en adición a la α -hélice C1), en la función de EscN y posiblemente de todas las ATPasas de SST3. Por otra parte, contrario a lo que se esperaba, no se observó un efecto en los otros dos cambios en los residuos G400A y Q426A (figura 29, carriles 7 y 15). Sin embargo, ya que la sustitución G400A se puede considerar conservativa, no descartamos la posibilidad de que algún otro cambio afecte la función de EscN. Por su parte, a pesar del cambio no conservativo Q426A realizado en el asa B, nuestros resultados indican que este residuo no tiene un papel crítico en la función de EscN (figura 29, carril 15).

En relación con las sustituciones en los residuos conservados diferencialmente; de manera interesante observamos que ambas mutaciones L395D y E401A, presentaron un efecto negativo en la secreción de proteínas, siendo el cambio más severo el de E401A (con un fenotipo muy semejante al cambio V393P, figura 29, carriles 5, 6 y 8). Estos resultados indican que las posiciones conservadas diferencialmente entre las ATPasas de inyectisomas y flagelares, tienen un papel importante en su funcionamiento, quizá en el

reconocimiento de sus sustratos o de otros componentes ya que no se pueden reemplazar por el residuo correspondiente entre ambos sistemas de secreción.

A



B

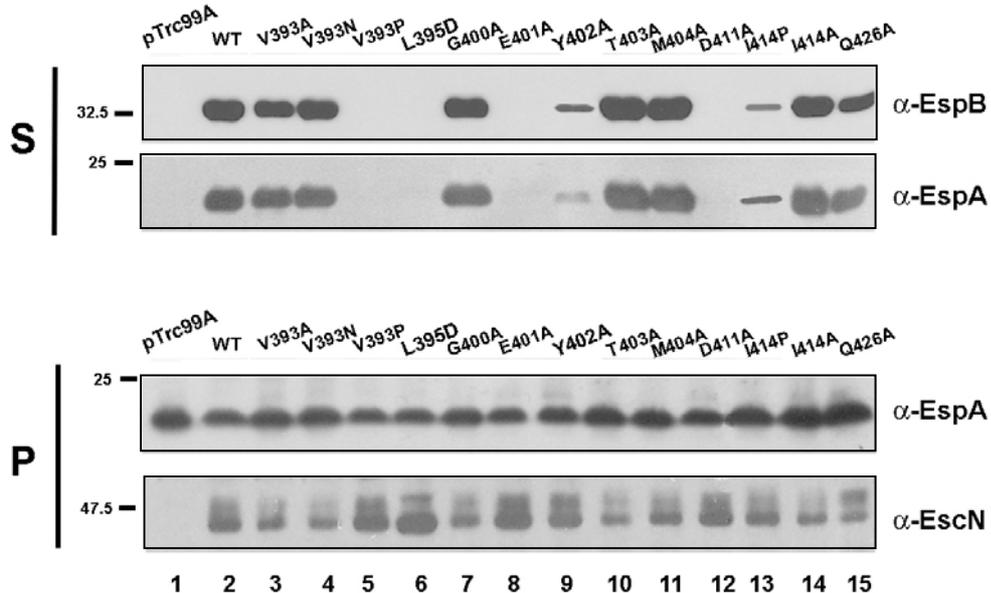


Figura 29. Complementación de la cepa *EPECΔescN*. (A) Perfil de secreción de proteínas de *EPECΔescN* (en medio DMEM a 37 °C), portadora del plásmido pTrc99A o del plásmido pATHescN con el gen *escN* o las diferentes mutantes puntuales del C-terminal indicadas. Tinción con azul de Coomassie. (B) Inmunoreconocimiento con anticuerpos específicos contra las proteínas EspB (1:30,000) y EspA (1:50,000) en los sobrenadantes (S) y contra las proteínas EspA (1:25 000) y EscN (1:8 000) en las células completas (P). EspC es una proteína que no se secreta vía SST3 y se puede considerar como un control interno. A la izquierda de cada panel se indican las masas moleculares correspondientes.

Las otras dos posiciones mutagenizadas en el asa A; T403A y M404A, no tuvieron ningún efecto en la secreción de proteínas (figura 29, carriles 10 y 11), a pesar de ser residuos expuestos y de encontrarse en la misma asa que las

posiciones E401 y Y402 (figura 27), es probable que los cambios realizados no alteren la conformación del asa A o que estos residuos no contribuyan en la interacción con los componentes del SST3.

Por último, en cuanto a los cambios generados en la posición I414 (α -hélice C2); la sustitución por alanina no tuvo ningún efecto sobre la secreción (figura 29, carril 14) aunque este cambio también se considera conservativo; sin embargo, para la mutación I414P se observó un efecto negativo en la secreción (figura 29, carril 13), lo que nos indica que la estructura o flexibilidad de la α -hélice C2 es necesaria para la función de secreción de EscN, aunque resultó ser más tolerante a la introducción de un residuo de prolina en comparación con la α -hélice C1.

La presencia de todas las mutantes puntuales se confirmó mediante la inmunodetección de EscN en las pastillas celulares (figura 29B, panel inferior).

Cabe señalar que, a diferencia de lo esperado, el cambio E401A presentó el fenotipo más severo, incluso más drástico que la mutación del residuo contiguo; Y402A (altamente conservado en todas las ATPasas de SST3, (figura 24)). Es probable que la carga negativa en dicha posición tenga una función en la secreción de proteínas, no obstante la misma posición en las ATPasas flagelares funciona de manera adecuada con un residuo de alanina.

Un fenotipo semejante se observó con la sustitución L395D, al parecer la presencia de la carga negativa en dicha posición afecta notablemente la función de EscN; sin embargo, en los alineamientos observamos que esto no sucede para las ATPasas flagelares.

Caracterización de las mutantes puntuales de EscN con pérdida de función

Se analizó con mayor detalle la secreción de proteínas en la cepa EPEC Δ escN con las seis mutantes puntuales de EscN que afectan la exportación vía SST3. Se realizaron ensayos de secreción de proteínas y se analizó mediante inmunodetección la salida de proteínas translocadoras y efectoras al medio.

De acuerdo con nuestros resultados anteriores, se observó que las mutaciones en EscN V393P, L395D y E401A presentan un comportamiento muy similar en el que la secreción se abate y no son capaces de complementar a la cepa de *EPECΔescN*, en comparación con la proteína EscN silvestre (figura 30). Incluso mediante inmunodetección no se detectan las proteínas translocadoras EspA y EspB ni las efectoras Tir y EspF (figura 30B). Con excepción de la mutación L395D, que presentó una ligera señal con el suero contra EspF.

Estos resultados indican que los cambios en EscN por los residuos flagelares (L395D y E401A) presentan los fenotipos más drásticos evitando que la ATPasa realice su función adecuadamente, a pesar de que en las ATPasas flagelares se utilicen dichos residuos.

Por otra parte, para las mutaciones en EscN Y402A e I414P, la secreción no se pierde por completo y se puede observar una baja cantidad de proteínas translocadoras en la tinción con azul de Coomassie (figura 30A). El análisis por inmunoreconocimiento confirmó que, aunque a niveles muy bajos en relación con la ATPasa silvestre, con las mutantes Y402A e I414P se restaura la secreción de proteínas translocadoras y efectoras (figura 30B).

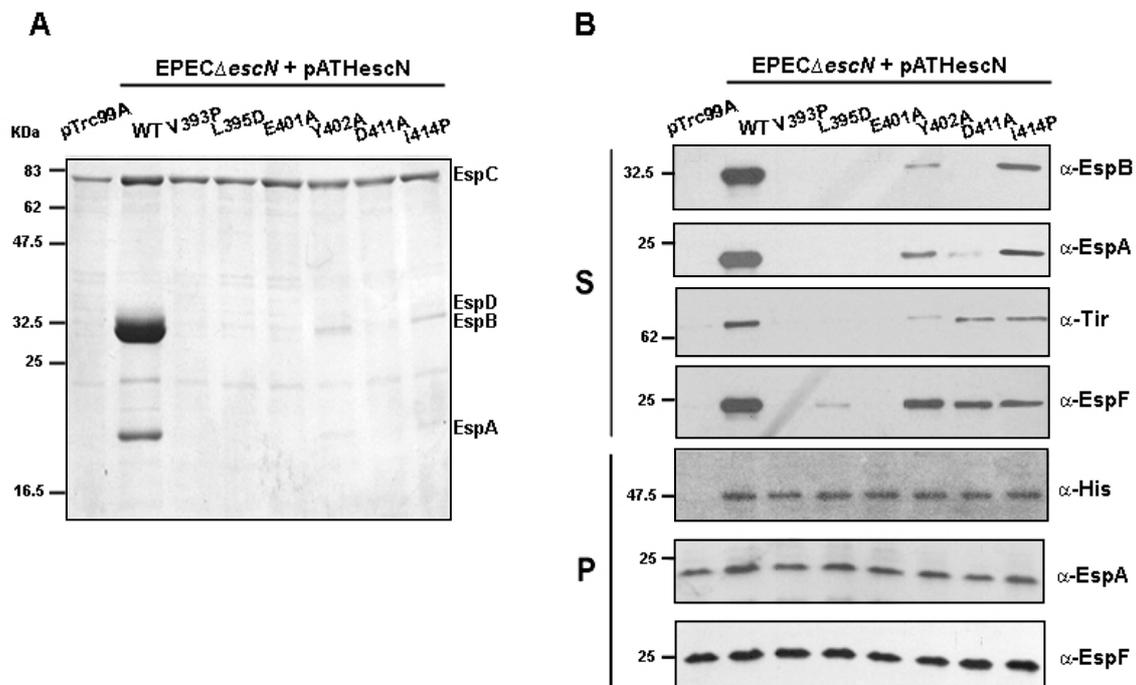


Figura 30. Caracterización de la actividad secretora de las mutaciones en EscN que afectan la exportación de proteínas. (A) Perfil de secreción de proteínas de *EPECΔescN* (en medio

DMEM a 37 °C) portadora del plásmido pTrc99A, el plásmido pATHescN con el gen silvestre y las diferentes mutantes puntuales indicadas. Tinción con azul de Coomassie. (B) Inmunoreconocimiento con anticuerpos específicos contra las proteínas EspB (1:30,000), EspA (1:50.000), Tir (1:4 000) y EspF (1:5 000) en los sobrenadantes (S) y contra las proteínas EspA (1:25 000) y EspF (1:4 000) y contra la etiqueta de histidinas (1:10 000) para corroborar la presencia de EscN en las células completas (P). A la izquierda de cada panel se indican las masas moleculares correspondientes.

Por último, en la complementación con la mutante EscN D411A se observó una secreción diferencial de proteínas translocadoras y efectoras; pues la secreción de EspB y EspA (figura 30B) se abate casi por completo mientras que la secreción de Tir y EspF se observó ligeramente disminuida en comparación con la ATPasa silvestre (figura 30B). Los resultados descritos se obtuvieron en una condición en la que se secretan al medio principalmente las proteínas translocadoras.

La presencia de EGTA en el medio incrementa la secreción de proteínas efectoras y disminuye la de translocadoras *in vitro* [136]. Se observó que la secreción diferencial con la mutante de EscN D411A se mantiene en medio DMEM con EGTA (dato no mostrado).

Los resultados obtenidos con la mutante D411A podrían indicar un defecto de la ATPasa en el reconocimiento de las proteínas translocadoras, ya sea directo o mediado a través de sus chaperonas. Adicionalmente se consideró que en la mutante EscN D411A la interacción con la proteína SepL también pudiese encontrarse afectada (ver adelante) pues el perfil de secreción con dicha mutante (D411A) es en cierto grado semejante al descrito para las mutantes de EPEC en los genes *sepD* y *sepL* [136], además de que se ha reportado la interacción de las proteínas ortólogas a SepL y EscN en otros inyectisomas [108,154,155].

La producción de las proteínas EspA y EspF, así como de His-EscN y las diferentes mutantes se confirmó mediante la inmunodetección con suero contra las proteínas EspA y EspF y con un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas en las pastillas celulares (figura 30B).

Purificación y actividad de ATPasa de las mutantes de EscN

A pesar de que las diferentes mutaciones generadas en el dominio C-terminal de EscN se localizan lejanas al sitio activo de la enzima, se analizó la actividad de ATPasa para descartar que el defecto en la secreción estuviese relacionado con la catálisis. Las proteínas recombinantes His-EscN y las mutantes puntuales V393P, L395D, E401A, Y402A, D411A, además de la mutante catalítica K183E (utilizada como control negativo), se purificaron mediante cromatografía de afinidad por níquel (figura 30A). La actividad de ATPasa se determinó mediante el ensayo de verde malaquita (figura 30B).

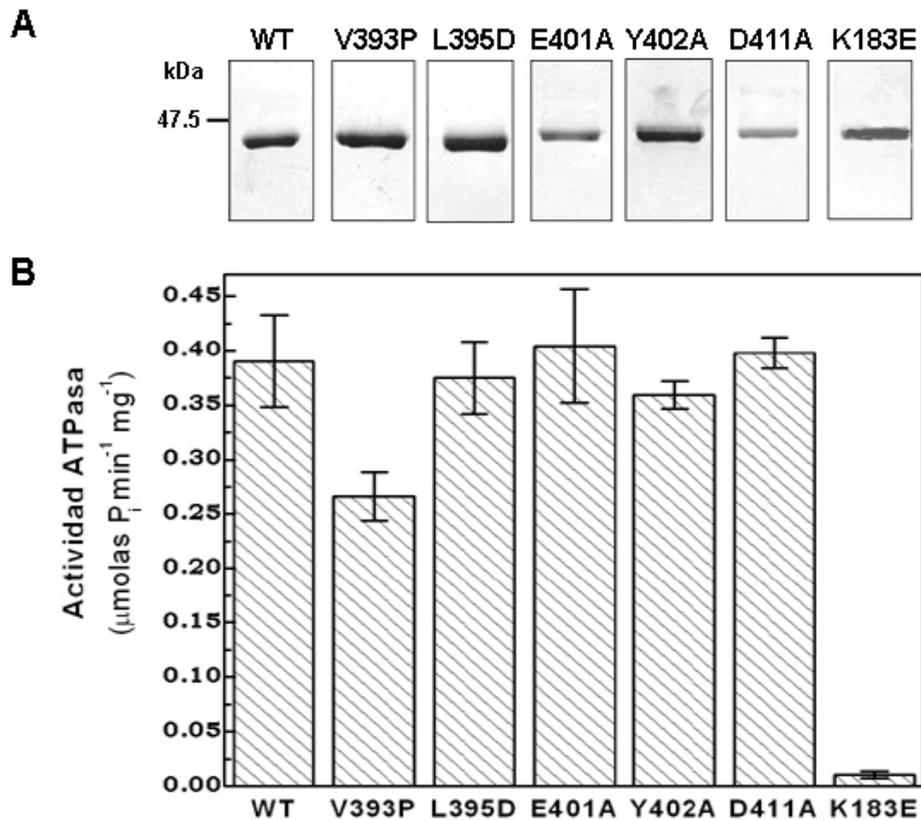


Figura 30. (A) Purificación de His-EscN y las mutantes puntuales indicadas mediante cromatografía de afinidad por níquel, en las mismas condiciones antes descritas para la enzima silvestre. Tinción con Coomassie. La masa molecular de referencia se indica a la izquierda. (B) Actividad de ATPasa de His-EscN y las mutantes puntuales (0.3 μ M) a 37 $^{\circ}$ C y 3 mM de ATP. La actividad específica se determinó a partir de la pendiente de los cursos temporales independientes.

A excepción de la mutante V393P cuya actividad se disminuye a un 67% respecto a la de la enzima silvestre, el resto de las mutantes del C-terminal presentaron una actividad semejante a la de la enzima silvestre (figura 30B). Estos resultados indican que la pérdida de función no se encuentra relacionada con un defecto en la actividad enzimática de la ATPasa. Adicionalmente, a pesar de que se ha reportado que la mutante L376P en InvC (correspondiente a la V393P de EscN) mantiene una actividad de ATPasa como la enzima silvestre, nuestros resultados indican que en EscN la mutación equivalente sí tiene un efecto en la catálisis (figura 30B).

Interacción del complejo chaperona-efector con EscN

Debido a que nuestra hipótesis considera que el defecto en la secreción de las mutantes del C-terminal de EscN está relacionado con el reconocimiento de los complejos chaperona-efector, se evaluó la interacción de la proteína chaperona CesT con EscN y con las mutantes puntuales V393P y E401A; que presentan el fenotipo de pérdida de secreción más severo. A su vez, el cambio V393P es el correspondiente a la L376P de InvC, mutante que no reconoce el complejo chaperona-efector [98]. Cabe mencionar también que las interacciones de la ATPasa EscN con el efector Tir y su proteína chaperona, CesT, ya se han reportado previamente [107].

Los ensayos de interacción tipo *pull-down* utilizando la proteína His-EscN y las mutantes puntuales V393P y E401A se realizaron siguiendo la metodología descrita previamente en este trabajo para la interacción EscN-EscL.

Para la sobreproducción de CesT se utilizó el plásmido pMTcT (que contiene el gen *cesT* sin ninguna etiqueta en el vector pTrc99AFF4). El lisado celular de la cepa de *Salmonella* SJW1368 expresando el plásmido pMTcT, se mezcló con el lisado celular de SJW1368 portadora del plásmido pATHescN o pATHescNV393P o pATHescNE401A más la resina de Ni-NTA. Los lisados se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación. Después de lavar la resina se observó la elución de la proteína CesT junto con la recombinante His-EscN (figura 31A) y no así para la resina de Ni-NTA sola utilizada como control negativo (figura 31C).

Nuestros resultados indican que la recombinante His-EscN V393P es capaz de interactuar con la chaperona CesT (figura 31A). Por su parte, la interacción con la mutante E401A también resultó positiva (figura 31A). Estos datos sugieren que el defecto en la secreción de las mutantes de EscN V393P y E401A no se debe a la pérdida de reconocimiento de los complejos chaperona-efector.

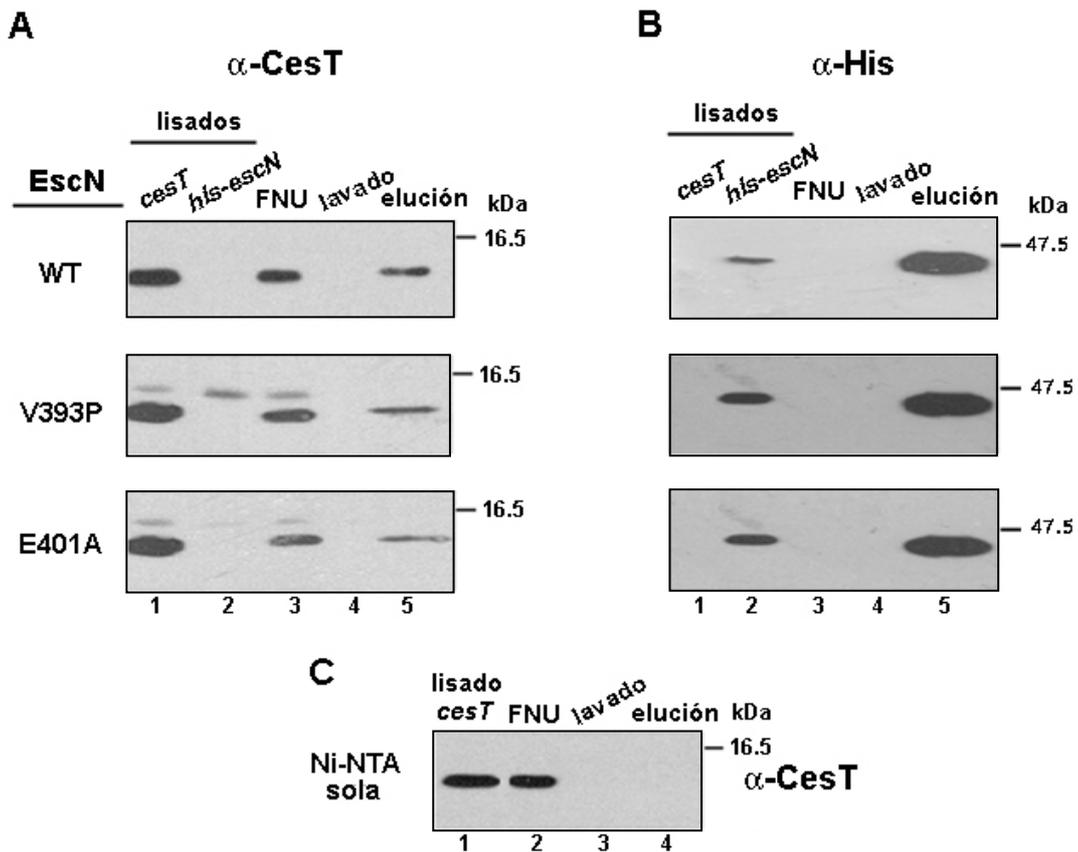


Figura 31. Reconocimiento de la chaperona CesT por EscN. (A) Inmunodetección de CesT en los ensayos de interacción con la proteína His-EscN. Los lisados celulares conteniendo a His-EscN (carril 2), panel superior, o las mutantes puntuales V393P, panel medio o E401A, panel inferior, se incubaron con un lisado celular conteniendo a la proteína CesT (carril 1) más la resina de Ni-NTA a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente se recuperó la fracción no unida (FNU, carril 3) y después de lavar la resina con 40 mM de imidazol (carril 4) las proteínas se eluyeron con 400 mM de imidazol (carriles 5). Las muestras se separaron por SDS-PAGE (15%), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se probaron con el suero contra la proteína CesT (1:8 000). (B) Inmunodetección de His-EscN de las mismas muestras que en (A) con el anticuerpo contra la etiqueta de histidinas (1:10 000), para corroborar la presencia de His-EscN en todos los lisados y eluciones. (C) Como control negativo se incubó el lisado celular conteniendo a CesT con la resina Ni-NTA sola. Las masas moleculares correspondientes se indican a la derecha de cada panel.

La presencia de His-EscN, y las mutantes V393P y E401A en los lisados celulares y en las eluciones correspondientes se determinó mediante la inmunodetección de las proteínas recombinantes con un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas (figura 31B).

Adicionalmente a estos ensayos, en nuestro laboratorio también se evaluaron las interacciones de fusiones de EscN y las mutantes V393P, E401A, Y402A y D411A a la proteína glutatión S-transferasa (GST), con el complejo His-CesT-Tir.

Para generar las fusiones GST-EscN, se amplificó por PCR el gen *escN* con los oligonucleótidos *escNGSTF* y *escNGSTR* y el producto de PCR se clonó en el vector de expresión pGEX4-T2 (que incorpora la secuencia de *gst* en la región 5' del gen clonado), como un fragmento *Bam*HI/*Pst*I (figura 32A). El plásmido resultante se nombró pAGescN (figura 32B) y la amplificación correcta del gen se corroboró mediante la secuenciación del DNA.

A través de ensayos de secreción se demostró que la fusión GST-EscN es funcional pues complementa la secreción de proteínas de la cepa *EPECΔescN* (figura 32C). Esto indica que el N-terminal de la ATPasa tolera cambios estéricos importantes como la incorporación de una proteína globular de 25 kDa (GST).

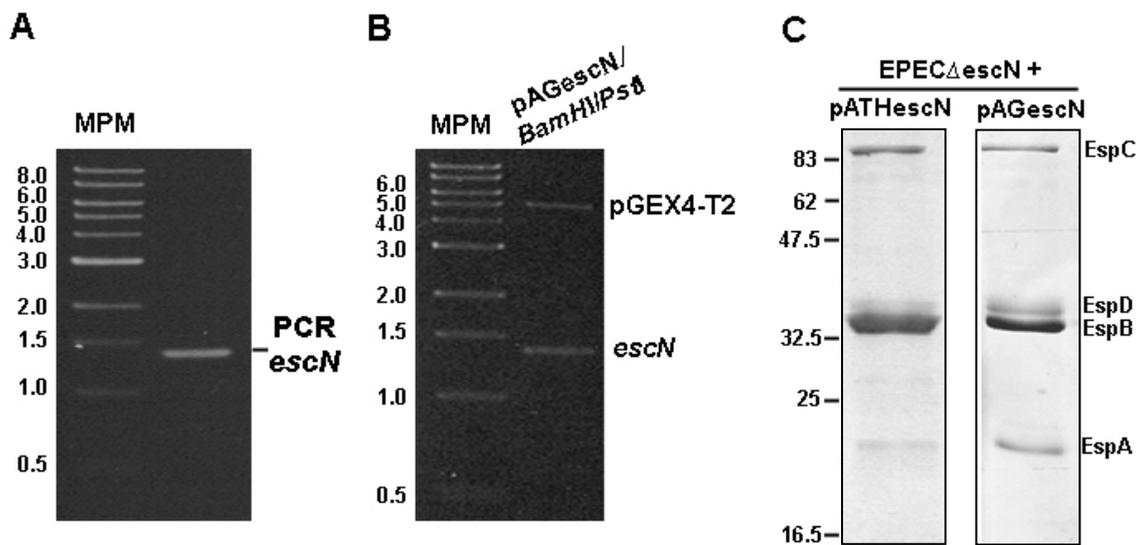


Figura 32. (A) Amplificación por PCR del gen *escN*, tamaño esperado de 1340 pb (B) Doble digestión *Bam*HI/*Pst*I para confirmar la clonación de *escN* en el vector pGEX4T-2 (4.9 kb). Se utilizó como marcador de peso molecular (MPM) 1 kb DNA Ladder (Sigma). (C) Perfil de secreción de proteínas de *EPECΔescN* (en medio DMEM a 37 °C) portadora del plásmido pATHescN (con el gen silvestre) o pAGescN. Tinción con azul de Coomassie.

La incorporación de las mutaciones V393P, E401A y Y402A sobre la fusión *gst-escN*, se realizó en nuestro laboratorio mediante la subclonación a partir de los plásmidos pATHeNV393P, pATHeNE401A o pATHeNY402A en el plásmido pAGescN [143]. Utilizando las proteínas purificadas GST-EscN o V393P o E401A o Y402A o D411A y el complejo His-CesT-Tir se evaluó la interacción mediante la copurificación de las proteínas de una resina de sefarosa acoplada a glutatión. Los resultados obtenidos en el laboratorio por Díaz-Guerrero, M. [143] señalan que el complejo His-CesT-Tir interactúa con la ATPasa silvestre y también con las cuatro mutantes puntuales analizadas, más no con la proteína GST sola.

Estos resultados en conjunto indican que el defecto en la secreción observado con las mutantes del C-terminal de EscN, contrario a lo reportado para la mutante de InvC L376P, no se debe a la pérdida de reconocimiento de los complejos chaperona-efector. Por lo que el fenotipo observado podría estar relacionado con un defecto en la interacción de la ATPasa con otro componente del SST3 de EPEC como la proteína Orf15 o la proteína SepL (ver discusión).

Interacción de la proteína SepL con EscN

Debido al fenotipo observado en la complementación de la cepa EPEC Δ *escN* con la mutante EscN D414A (secreción diferencial de proteínas translocadoras y efectoras, figura 29B) y con base en los antecedentes [108,136,154,155], se evaluó la interacción de la ATPasa EscN con la proteína SepL siguiendo la metodología descrita previamente para la interacción His-EscN-CesT.

Para la sobreproducción de SepL se utilizó el plásmido pMTpL (que contiene el gen *sepL* sin ninguna etiqueta en el vector pTrc99AFF4). El lisado celular de la cepa de *Salmonella* SJW1368 conteniendo el plásmido pMTpL se mezcló con el lisado celular de SJW1368 portadora del plásmido pATHeNWT o pATHeND411A o pATHeNE401A más la resina de Ni-NTA. Los lisados se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación. Después de lavar la resina se observó la elución de la proteína SepL junto con la recombinante His-EscN (figura 33A) y no así para la resina de Ni-NTA sola (figura 33C). Cabe

señalar que este es el primer reporte que describe la interacción entre EscN y SepL.

Sin embargo, contrario a lo esperado, la interacción de SepL con la proteína His-EscN D414A también resultó positiva (figura 33A), lo que indica que la pérdida de secreción de las proteínas translocadoras no es consecuencia de un defecto en la interacción con SepL, y probablemente esté asociado al reconocimiento *per se* de los complejos chaperona-translocador.

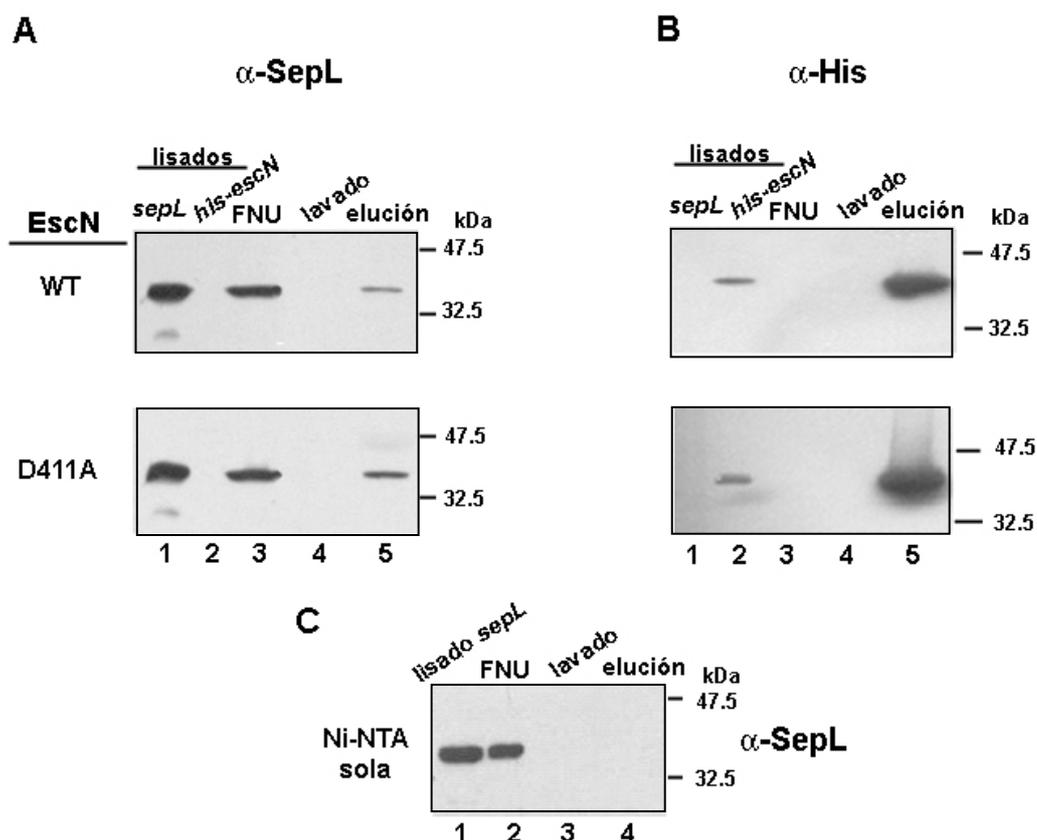


Figura 33. Reconocimiento de la proteína SepL por EscN. (A) Inmunodetección de SepL en los ensayos de interacción con la proteína His-EscN. Los lisados celulares conteniendo a His-EscN (carril 2), panel superior, o la mutante puntual D411A, panel inferior se incubaron con un lisado celular conteniendo a la proteína SepL (carril 1) más la resina de Ni-NTA a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente se recuperó la fracción no unida (FNU, carril 3) y después de lavar la resina con 40 mM de imidazol (carril 4) las proteínas se eluyeron con 400 mM de imidazol (carriles 5). Las muestras se separaron por SDS-PAGE (15%), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se probaron con el suero contra la proteína SepL (1:3 000). (B) Inmunodetección de His-EscN de las mismas muestras que en (A) con el anticuerpo contra la etiqueta de histidinas (1:10 000), para corroborar la presencia de His-EscN en ambos lisados y eluciones. (C) Como control negativo se incubó el lisado celular conteniendo a SepL con la resina Ni-NTA sola. Las masas moleculares correspondientes se indican a la derecha de cada panel.

La presencia de His-EscN y D411A en los lisados celulares y en las eluciones correspondientes se determinó mediante la inmunodetección de las proteínas recombinantes con un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas (figura 33B).

Los resultados presentados en esta sección representan el primer análisis de la región C-terminal de una ATPasa asociada al SST3 y demuestran la importancia funcional de cinco nuevas posiciones identificadas en las α -hélices C1 y C2, así como en el asa A que comunica ambas α -hélices. También demuestran que el residuo V393 de EscN no es crítico para su función, y sugieren que la estructura y/o flexibilidad de la α -hélice C1 (que contiene la V393) sí lo es. Además, contrario a lo reportado, el cambio V393P no evita el reconocimiento de las proteínas chaperonas. Por último identificamos la interacción entre las proteínas EscN y SepL del SST3 de EPEC. Los resultados obtenidos en esta sección se resumen en la Tabla 4.

Actualmente continuamos evaluando en el laboratorio diferentes interacciones de la ATPasa EscN y las mutantes puntuales aisladas en este trabajo con el fin de determinar las razones por las que afectan la secreción de proteínas vía SST3.

Tabla 4. Resumen de resultados obtenidos para las mutaciones puntuales en EscN					
Mutación	Ubicación	Secreción en EPECΔescN	Actividad de ATPasa	Interacción con CesT	Interacción con SepL
V393P	α -helice C1	NO	disminuida	Positiva	N.D.
L395D	α -helice C1	NO	WT	Positiva (DG)	N.D.
E401A	asa A	NO	WT	Positiva	N.D.
Y402A	asa A	+/-	WT	Positiva (DG)	N.D.
D411A	α -helice C2	s.t. NO ; s.e.+/-	WT	N.D.	Positiva
I414P	α -helice C2	+/-	N.D.	N.D.	N.D.

En negritas se indican los cambios por el residuo flagelar correspondiente. s.t. secreción de translocadores; s.e. secreción de efectores; WT silvestre; N.D. no determinado; DG resultado obtenido en [143] por Díaz-Guerrero.

DISCUSIÓN

PARTE I. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y OLIGOMERIZACIÓN DE EscN

La ATPasa asociada a los SST3 o injectisomas es un componente esencial para el funcionamiento de estos complejos macromoleculares de secreción. Su actividad enzimática se requiere para la formación del sistema, la translocación de proteínas y el desarrollo de la infección bacteriana [109,110,116]. A su vez, la biogénesis eficiente del SST3 flagelar también requiere de la ATPasa asociada al mismo [100,115].

La ATPasa es uno de los componentes más conservados de los SST3 (injectisomas y flagelares), con una alta similitud a nivel de secuencia primaria. Además, a nivel atómico presenta también una destacada similitud con las subunidades α y β de la F_0F_1 -ATPasa [102,103].

La activación catalítica de la ATPasa de secreción tipo III se encuentra relacionada con su oligomerización, más probablemente con su homohexamerización [80,110]. El dominio N-terminal de la enzima permite la hexamerización y es también el sitio de unión de la proteína reguladora, la que se propone actúa evitando la oligomerización [81,82,85]. El dominio central contiene el sitio activo de la ATPasa, las denominadas cajas de Walker A y B, además del asa P [115,116]; y el dominio C-terminal (aunque es el menos estudiado) se ha relacionado con el reconocimiento de las proteínas que serán secretadas [98].

A pesar de los grandes esfuerzos realizados para entender el funcionamiento del SST3 y el papel específico de la ATPasa asociada a éstos, aun resulta poco entendido el mecanismo molecular que permite el acoplamiento de la energía de hidrólisis de ATP con el proceso de exportación de proteínas.

En EPEC y el resto de los patógenos A/E, con base en la similitud de secuencia, se identificó al producto del gen *escN*, tercer gen del operón LEE3, como la ATPasa asociada a sus respectivos SST3 [128]. En este trabajo se realizó una caracterización de la proteína EscN.

A partir de una proteína recombinante de EscN con 10 histidinas en su región N-terminal (His-EscN), la cual se purificó en condiciones nativas (figura

9), se determinó la actividad de ATPasa de esta proteína y se realizó una caracterización cinética de la enzima.

La funcionalidad de la proteína recombinante His-EscN se corroboró mediante ensayos de complementación en la secreción de proteínas de una cepa EPEC Δ escN, en la cual restauró los niveles de secreción equivalentes a los de la cepa silvestre (figura 10). De la misma forma, se demostró también la funcionalidad de una fusión GST-EscN (figura 33). Estos resultados son consistentes con reportes previos que señalan que versiones de ATPasas recombinantes (de inyectisomas y flagelares) son funcionales con diversas etiquetas, inclusive con una fusión a la proteína GST en el N-terminal [86,105,115]. Los resultados indican que el extremo N-terminal de las ATPasas de SST3 tolera modificaciones importantes, como la incorporación de la proteína globular GST de 25 kDa.

En relación a la catálisis de EscN, calculada a partir de la pendiente de cursos temporales independientes, se determinó una actividad específica de 0.36 ± 0.02 μ molas de Pi hidrolizado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, similar a la actividad reportada para otras ATPasas de SST3 [80,115,116].

La actividad fue completamente dependiente del cofactor Mg^{2+} y a pesar de que el Mn^{2+} puede ser utilizado eficientemente por ATPasas Mg^{2+} -dependientes [156], para EscN se observó que la eficiencia catalítica disminuye considerablemente al utilizar Mn^{2+} (50 % de la actividad específica, figura 11B).

Las condiciones óptimas para la reacción de ATPasa de EscN determinadas en este trabajo resultaron en un pH de 7.5 y una temperatura de 30-37 °C (figura 11C y D), consistente con el rango en el que se mantiene el pH citoplásmico y la temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* [157]. A su vez, debido a que la actividad de ATPasa de EscN disminuyó considerablemente a 42 °C (figura 11D) es probable que la enzima tenga una baja estabilidad térmica o bien, que a dicha temperatura se disocie o desestabilice el oligómero en solución.

A partir de la evaluación de las velocidades iniciales de EscN en función de la concentración del sustrato ATP- Mg^{2+} (figura 11E), se determinó una cinética de tipo sigmoide con una V_{max} de 0.41 ± 0.01 μ mol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una $K_{0.5}$ de 0.90 ± 0.05 mM por ATP- Mg^{2+} . Cabe mencionar que la V_{max} estimada para la

ATPasa flagelar Flil es de $0.2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, y con este valor los autores concluyeron que dicha actividad de ATPasa puede sustentar la secreción proteica durante el ensamblaje del flagelo [115]; no obstante, recientemente se considera que la conducción de las proteínas a través del canal central flagelar depende principalmente de la fuerza protón motriz [100,101].

Por otra parte, el valor del coeficiente de Hill calculado para EscN (1.59 ± 0.13) sugiere que la oligomerización estimula la actividad de ATPasa (figura 11E). De forma consistente con este resultado, la catálisis en función de la concentración de enzima (figura 12A) apoya que la multimerización de EscN resulta en formas más activas; lo que además está de acuerdo con resultados observados en otras ATPasas [80,110].

Adicionalmente se calculó para EscN una K_i de $2.06 \pm 0.24 \text{ mM}$ por ADP-Mg^{2+} (figura 11F), lo que indica que el producto de la reacción actúa como un inhibidor de la enzima, sin embargo el orden de concentración en el que se encuentra dicha K_i demuestra que el ADP-Mg^{2+} no representa un inhibidor potente y que el sustrato (ATP-Mg^{2+}) se puede unir con mayor afinidad a la enzima.

En cuanto a la evaluación del estado oligomérico de EscN, se observó que cuando se somete a la proteína purificada a una cromatografía de exclusión molecular, ésta se mantiene predominantemente en un estado monomérico; no obstante, también se observó una pequeña población correspondiente a una forma dodecamérica (figura 12B). De acuerdo con este resultado, la ATPasa HrcN de *Ps. syringae*, además de formar hexámeros, también puede autoasociarse en dodecámeros con una actividad de ATPasa incrementada, los que aparentemente están constituidos por dos anillos hexaméricos apilados y asociados entre sí por el extremo C-terminal de sus subunidades [111] [110]. Cabe señalar que el estado hexamérico en otras ATPasas de SST3 tampoco se ha conseguido observar mediante cromatografía de filtración en gel [80,82,86].

Con el objetivo de determinar la existencia de otras formas oligoméricas de EscN, se decidió separar a la proteína mediante electroforesis en condiciones nativas. La separación de EscN en geles azules nativos (BN-PAGE) reveló la presencia de siete diferentes formas activas (figura 13), lo que sugiere la existencia de un equilibrio dinámico entre el monómero y el multímero.

Asimismo, ya que las poblaciones más abundantes corresponden a las de menor masa molecular, es probable que la estabilización de la forma oligomérica requiera de la asociación con algún componente adicional del SST3, como se ha sugerido para la ATPasa flagelar [81].

Nuestros resultados también indicaron que la población correspondiente al hexámero de EscN presentó la mayor actividad de ATPasa en el gel (figura 14), a diferencia de lo reportado para la proteína HrcN, en donde el dodecámero presenta la actividad más alta [110]. Aunque no es posible descartar cambios en el estado oligomérico durante la reacción de ATPasa en el gel, nuestros resultados están de acuerdo con el modelo más aceptado que describe un homohexámero como el estado funcional de la ATPasa [58,102,103]. La consistencia de la forma dodecamérica en EscN que se observó por filtración molecular y electroforesis nativa sugiere la asociación de un complejo estable que pudiera estar constituido por dos anillos hexaméricos, aunque con una actividad reducida (figura 14).

A pesar de que aun se requieren estudios que determinen fehacientemente el estado funcional oligomérico de estas proteínas *in vivo*, la similitud estructural que guardan con las subunidades del sector F₁, hace suponer que la forma hexamérica es la que se ubica en la base del aparato de exportación y permite la secreción de proteínas vía SST3.

PARTE II. LA PROTEÍNA EscL INTERACTÚA CON EscN E INHIBE LA ACTIVIDAD DE ATPasa

Como se mencionó previamente la proteína reguladora de la ATPasa es uno de los componentes menos conservados del aparato de exportación de los SST3 [158], lo anterior a pesar de su importante papel en la secreción como lo demuestra el fenotipo de una mutante nula en el gen que la codifica [40,82,109].

En nuestro laboratorio mediante un análisis utilizando el programa BLAST (NCBI), se identificó que la proteína Orf5 presenta un 17 % de identidad con la proteína FliH (reguladora de la ATPasa flagelar) de *Thermotoga maritima*. Además, al alinear múltiples secuencias de proteínas FliH's con Orf5 de EPEC

se identificaron residuos conservados apoyando la hipótesis de Orf5 como posible ortólogo de FliH. Un estudio bioinformático de la isla LEE de EHEC llegó a la misma hipótesis, renombrando el *orf5* como *escL* [128].

En el presente trabajo se evaluó esta hipótesis de forma experimental, pues se desconocía si el mecanismo de inhibición de la ATPasa reportado para el SST3 flagelar también se mantenía en los inyectisomas. Sin embargo, cabe mencionar que durante el desarrollo de este trabajo, se confirmó la presencia de una proteína reguladora de la actividad de ATPasa en el inyectisoma de *Yersinia*, pues la proteína YscL inhibe la actividad de ATPasa de YscN [86].

Nuestros primeros resultados trabajando con la proteína completa fueron infructuosos ya que la proteína recombinante EscL con seis histidinas en el N-terminal, a pesar de sobreproducirse adecuadamente (figura 16), resultó ser sumamente insoluble. Debido a esto no se consiguió purificarla en condiciones nativas. Sin embargo, el análisis de hidrofobicidad a partir de la estructura primaria de EscL (utilizando la paquetería ProtScale, dato no mostrado) indica que la proteína debería mantenerse citoplásmica, por lo que probablemente se encuentre formando cuerpos de inclusión.

En este sentido, la eliminación de los primeros 50 y 89 residuos de EscL nos permitió incrementar la solubilidad de la proteína y llevar a cabo la purificación de las versiones recombinantes de la misma, His Δ 50-EscL y His Δ 89EscL (figura 18). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado para la proteína FliH de *Helicobacter pylori* [152].

Posteriormente, se determinó mediante un ensayo de tipo *pulldown* la interacción de EscL y la ATPasa EscN. La retención específica de la proteína EscN (sin ninguna etiqueta) por His Δ 89-EscL (figura 19) confirmó la formación de este complejo; y además se demostró que la región C-terminal de EscL es la región de la proteína requerida para la interacción con la ATPasa. Estos resultados son consistentes con lo reportado para la proteína reguladora flagelar FliH [84,152]. También, mediante ensayos de tipo *pulldown*, identificamos que la región N-terminal de EscN es el dominio de la proteína que reconoce a EscL (figura 23).

Finalmente, para evaluar la hipótesis de que EscL actúa inhibiendo la actividad de ATPasa de EscN, se utilizaron las proteínas recombinantes purificadas en una relación 2:1 de EscL:EscN (relación estimada para el

complejo FliH:FliI en solución [82]). Se evaluó la actividad de hidrólisis de ATP en las mezclas His Δ 89-EscL:His-EscN y His Δ 50-EscL:His-EscN (figura 20), y los resultados revelaron que EscL tiene un efecto negativo sobre la catálisis de EscN, inhibiendo hasta en un 86% la actividad de ATPasa. Esto sugiere fuertemente que la proteína EscL corresponde a la reguladora de la ATPasa en el SST3 de EPEC y que los mecanismos de inhibición de la ATPasa se encuentran conservados en los diferentes SST3.

Por otra parte, ya que los primeros 89 residuos de EscL no se requieren para inhibir a EscN, estos resultados y los obtenidos previamente [84] sugieren fuertemente una función distinta del N-terminal de EscL en el funcionamiento del SST3. Es muy probable que la proteína reguladora esté relacionada con eventos adicionales a los de la inhibición de la ATPasa.

En relación con lo anterior, por ejemplo, se sabe que el extremo N-terminal de la proteína reguladora interactúa con el anillo citosólico del SST3 y se propone que de esta forma se recluta a la ATPasa, incrementando su concentración en la base del sistema [88]. Esta localización le permitiría a la ATPasa reconocer a las proteínas a ser secretadas y dirigirlas a la base del canal de exportación de forma más eficiente para su secreción [58].

Recientemente se identificó la existencia de cierta similitud de secuencia entre la región N-y C-terminal de la proteína reguladora con las subunidades b y δ de la F₀F₁-ATPasa, respectivamente [151]. Las subunidades b y δ componen el cuello lateral de la ATP sintasa, que conecta el sector F₁ con el F₀, funcionando como un estator que evita la rotación de F₁ durante la síntesis o hidrólisis de ATP [159,160]. Tanto la subunidad b como las proteínas reguladoras tienen una estructura elongada y forman homodímeros [83,161,162], mientras que la subunidad δ se asocia con la región N-terminal de las subunidades α y β [162]. De modo semejante, el C-terminal de la proteína reguladora de los SST3 interactúa con el N-terminal de la ATPasa (nuestros resultados) y los publicados para el SST3 flagelar [84,152], y también se ha reportado que la ATPasa no puede asociarse eficientemente al aparato secretor en ausencia de la proteína reguladora [87]. Todas estas evidencias en conjunto sugieren que la proteína reguladora también pudiera funcionar como un cuello que ancla a la ATPasa a la base del canal secretor; aunque debido a

que se desconoce si el hexámero de la ATPasa de SST3 genera torque durante la catálisis, la función de la proteína reguladora como estator resulta todavía especulativa.

Evidencias adicionales que sugieren una participación directa de la proteína reguladora en la secreción proteica son: el fenotipo de la mutante nula en el gen que las codifica [40], la asociación de ésta con el dominio soluble de la proteína que compone la entrada al canal secretor (FlhA/YscV) [70]; y por otra parte, la identificación de la proteína reguladora asociada a los complejos ATPasa-chaperona-sustrato [54,163].

En nuestro laboratorio se pretende evaluar la actividad de ATPasa del complejo EscN-EscL en presencia de otros componentes del SST3 (principalmente con Orf15, ver más adelante), para tratar de entender mejor el mecanismo que permite la activación de EscN en presencia de EscL.

PARTE III. ANÁLISIS MOLECULAR DEL DOMINIO C-TERMINAL DE EscN

El dominio C-terminal de la ATPasa del SST3 es el menos estudiado y su función aun es poco entendida. Sin embargo, es en este dominio en donde se ha descrito un sitio potencial para la unión de las proteínas chaperonas en las ATPasas InvC y EscN [98,103]. En este trabajo, con el fin de entender mejor la función del C-terminal de estas ATPasas, se decidió caracterizar dicha región en la proteína EscN.

La elaboración de alineamientos de secuencia múltiples de diferentes ATPasas del SST3 de bacterias pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos (alfa-, beta-, gama- y delta-proteobacteria), nos permitió identificar una serie de residuos conservados entre ATPasas flagelares y de inyectisomas, así como otros residuos conservados diferencialmente entre estos dos grupos de proteínas (figura 25). Las posiciones conservadas se localizan principalmente en las α -hélices C1 y C2, así como en el asa que comunica dichas α -hélices, denominada asa A en este trabajo. De acuerdo con la ubicación que guardan estos residuos en el modelo del homohexámero de EscN (figura 27) y lo reportado para InvC [98], esta región podría representar

un probable sitio de reconocimiento de las proteínas chaperonas (solas o en complejo con sus sustratos).

Para confirmar la importancia del dominio C-terminal en la función de la ATPasa, específicamente de las posiciones conservadas identificadas en este estudio, se generaron una serie de mutaciones puntuales en este dominio de EscN y se evaluó la funcionalidad de las mismas en un ensayo de complementación de una cepa de EPEC Δ escN.

El análisis de los perfiles de secreción de las proteínas mutantes de EscN (en el fondo genético EPEC Δ escN) nos permitió determinar que los cambios en EscN: L395D (de la α -hélice C1); E401A y Y402A (del asa A); y D411A e I414P (de la α -hélice C2), tienen un efecto negativo sobre la secreción de proteínas vía SST3 (figura 29 y 30).

Además, de forma consistente con lo reportado [98,103], la mutante de EscN V393P es incapaz de complementar la secreción de proteínas. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la pérdida de función de EscN V393P es consecuencia de la alteración estructural de la α -hélice C1 y los residuos consecutivos (asa A), debida a la introducción del residuo de prolina, como se logró verificar al realizar un alineamiento estructural de las ATPasas EscN y FliI (figura 26). Incluso, en este trabajo se demostró que dicho residuo *per se* no es crítico para la función de la proteína pues tolera un cambio no conservativo como es V393N, así como la sustitución V393A (figura 29).

Debido a que nuestros resultados indican que la estructura de la región de la α -hélice C1 es importante para la función de complementación de EscN, se introdujo también un residuo de prolina en la α -hélice C2 (I414P). Esta mutación también presentó un efecto negativo sobre la secreción de proteínas, sin embargo, no abate totalmente la secreción (figura 29 y 30), lo que indica que la estructura y/o flexibilidad de la α -hélice C1 tiene una mayor importancia para el funcionamiento de la ATPasa en comparación con la α -hélice C2.

Interesantemente, las α -hélices del C-terminal de las subunidades β que corresponden a la α -hélice C1 y C2 de las ATPasas del SST3, tienen importantes cambios conformacionales que están acoplados con la rotación de la subunidad γ [159]. Con base en lo anterior, se sugiere que la hidrólisis de ATP podría inducir cambios conformacionales en la α -hélice C1 de la ATPasa

del SST3, facilitando la disociación de ésta de los sustratos a secretarse y permitiendo la entrada de los sustratos al canal secretor [58]. Esta hipótesis, que es consistente con nuestros resultados, explicaría la pérdida de secreción que determinamos por la afectación estructural de dicha región.

Por otra parte, consideramos también la hipótesis de que las α -hélices C1 y C2, y principalmente el asa A de las ATPasas del SST3, funcionen de manera semejante al mecanismo que se ha propuesto para la familia de ATPasas hexaméricas AAA+, como las proteínas HslU y ClpX. En dicho modelo cada monómero posee un asa flanqueada por dos residuos de glicina además de una tirosina central conservada y expuesta (la búsqueda de un motivo semejante en la ATPasa del SST3 nos permitió identificar el asa A, figura 25). En las ATPasas AAA+, dicha asa contacta y transporta los polipéptidos por medio de movimientos hacia arriba y abajo, al interior del poro central del homohexámero [114,164,165]. Asimismo, un modelo muy semejante (que involucra dos α -hélices conectadas por una asa con un residuo aromático conservado) se ha propuesto para la translocasa SecA, proteína que acopla la hidrólisis de ATP con el movimiento de polipéptidos a través de un conducto membranal constituido por el complejo SecYEG [166].

Cabe señalar que en las AAA+ ATPasas y en SecA, de modo semejante con nuestros resultados en EscN, el residuo aromático del asa no puede ser intercambiado por un aminoácido pequeño [164,166-168]. Lo que sugiere un probable mecanismo general conservado para el movimiento de polipéptidos en estos tres grupos de ATPasas.

Por otro lado, nuestros resultados indican que los cambios en EscN: V393A y V393N (de la α -hélice C1); G400A, T403A y M404A (del asa A); I414A (de la α -hélice C2); y Q426A (del asa B) no tienen un efecto sobre la función de EscN en la secreción de proteínas y se puede considerar que dichas mutantes puntuales se comportan como la enzima silvestre (figura 29). Sin embargo, dentro de este grupo de proteínas mutantes sin fenotipo, los cambios V393A, G400A e I414A pueden considerarse conservativos (residuos hidrofóbicos), y probablemente por tal razón, no presenten un efecto negativo. En el caso de los residuos T403 y M404, es probable que al sustituirlos por alanina no hayan tenido un efecto (a pesar de estar expuestos en la molécula de EscN), porque

dichas posiciones no se encuentran conservadas entre las ATPasas de SST3 y puedan tolerar diferentes cambios (figura 25, 27 y 29).

Asimismo, la mutación no conservativa Q426A no tuvo un efecto negativo en la secreción de proteínas, a pesar de que este residuo se encuentra conservado en todas las ATPasas de SST3 y de que se considera que el oxígeno del grupo carbonilo de esta glutamina puede formar un puente de hidrógeno con el nitrógeno 6 del anillo de adenosina del ATP [103].

Finalmente, el fenotipo determinado para la sustitución V393N (como ya se mencionó) indica que dicha posición, contrario a lo reportado para InvC [98], no es crítica para la función de la ATPasa y muy probablemente tampoco represente el sitio de reconocimiento en la ATPasa para los complejos chaperona-sustrato (ver más adelante).

En cuanto a las mutaciones en EscN que presentan residuos conservados diferencialmente en las ATPasas de inyectisomas y flagelares (L395D y E401A), interesantemente se observó que estos cambios tuvieron los efectos más severos sobre la función de la proteína (figura 30); a pesar de que las ATPasas flagelares funcionan con los residuos que se incorporaron en EscN, es decir el Asp en lugar de la Leu395 y la Ala en lugar del Glu401. Es probable que dichos residuos participen en la interacción con componentes específicos de cada tipo de SST3 y por tal motivo su reemplazo provoca la pérdida de función en la ATPasa ortóloga. En este sentido, se sabe que la ATPasa flagelar no puede funcionar en el inyectisoma y viceversa (Andrade, A. datos no publicados) [101], por lo que podemos especular que una de las razones que lo evita puede involucrar las posiciones divergentes del C-terminal identificadas en este trabajo; aunque el dominio N-terminal muy probablemente también tenga un papel importante en el reconocimiento específico de la ATPasa por su SST3 correspondiente [87,88].

Para la mutante EscN D411A se observó una secreción diferencial de proteínas translocadoras y efectoras (figura 30B), siendo la secreción de las primeras la más afectada. Este resultado sugiere un papel de la α -hélice C2 en el reconocimiento de las proteínas translocadoras, solas o en complejo con sus respectivas chaperonas. Debido a esto, una posible interacción que podría encontrarse afectada en esta mutante sería con la proteína SepL (componente del SST3 que participa en la regulación de la secreción diferencial de proteínas

translocadoras y efectoras, [136]); siendo además que la interacción entre estas proteínas (SepL-EscN), ya ha sido reportada para las proteínas ortólogas de otros inyectisomas [108,154,155]. Adicionalmente, aunque no se había descrito previamente para el SST3 de patógenos A/E, nuestros resultados confirmaron que la ATPasa EscN interactúa con la proteína SepL (figura 34). Sin embargo, cuando se evaluó la interacción de SepL con la mutante EscN D411A, se observó que ésta no se encuentra afectada en comparación con la enzima silvestre (figura 34). Posteriormente sería interesante evaluar la interacción de EscN D411A con la chaperona de una proteína translocadora (sola o en complejo con su sustrato).

Un aspecto que es importante mencionar es el hecho de que todas las mutantes puntuales de EscN se produjeron en cantidades similares a la enzima His-EscN silvestre y resultaron ser proteínas estables (figura 29 y 30), por lo que su defecto en la secreción no se puede atribuir a inestabilidad o a su falta de expresión.

Adicionalmente, las mutantes puntuales se purificaron (figura 31A) y se determinó su actividad de ATPasa para también poder descartar un defecto en la catálisis. De acuerdo con nuestros resultados, la mayoría de las mutantes puntuales del C-terminal tienen una actividad hidrolítica semejante a la de la enzima silvestre, lo que indica además la existencia de oligomerización. La excepción fue la mutación EscN V393P que presentó una actividad disminuida (67% de la silvestre), contrario a lo reportado para la mutación equivalente en InvC [105]. La diferencia entre estos resultados puede indicar propiedades particulares de cada enzima o quizá sea consecuencia de los diferentes métodos de determinación de la actividad enzimática.

A su vez, es posible que la disminución en la actividad de ATPasa de la mutación V393P en EscN sea consecuencia de su mayor susceptibilidad a proteólisis y menor estabilidad térmica (como ha sido reportado), a pesar de presentar un patrón de dicroísmo circular muy semejante al de la enzima silvestre [103].

Por último, se evaluó la interacción de la ATPasa silvestre y de las mutantes puntuales del C-terminal con la proteína chaperona CestT, pues de acuerdo a la localización de los residuos mutagenizados en EscN (figura 27) y a lo reportado para InvC [98], se consideró la hipótesis de que el efecto negativo en la

secreción de proteínas que observamos con las mutantes generadas, corresponde a la pérdida de interacción de la ATPasa con los complejos chaperona-sustrato. Sin embargo, contrario a lo esperado se observó que las mutantes His-EscN V393P y E401A mantienen la interacción con la chaperona CesT (figura 32), lo que indica que el reconocimiento de las proteínas chaperonas no se encuentra afectado en dichas mutantes.

Además, en nuestro laboratorio se confirmó la interacción de las proteínas GST-EscN y las correspondientes mutantes GST- V393P, E401A, Y402A y D411A con la proteína His-CesT sola o en complejo con el efector Tir, por medio de ensayos tipo *pull-down* utilizando a las proteínas purificadas [143].

Nuestros resultados en conjunto sugieren que la región de interacción con las proteínas chaperonas en las mutantes del C-terminal de EscN no se afectó, y que la pérdida de secreción se debe probablemente al defecto de interacción con alguna o algunas otras proteínas del SST3. Por ejemplo, la interacción con la proteína Orf15, componente esencial del SST3 de EPEC (aunque de función desconocida) (Romo, M, datos no publicados) [40], y posible ortóloga de FliJ (tabla 1).

En relación con lo anterior en el flagelo se ha reportado la interacción de la ATPasa FliI con la proteína FliJ e incluso la formación de un complejo FliI-FliH-FliJ, que se piensa asiste en el direccionamiento de los sustratos flagelares hacia el aparato de exportación [58,72]. Además, recientemente se reportó para el inyectisoma de *Chlamydomphila pneumoniae* que la proteína Cpn0706 (correspondiente a Orf15) interactúa con la región C-terminal de la ATPasa, CdsN [108].

En este sentido, resultados preliminares evaluando las interacciones de las recombinantes His-EscN o V393P, producidas en conjunto con las proteínas del SST3 en una cepa de EPEC Δ escN, indican que His-EscN interactúa con Orf15, y no así la mutante puntual His-EscN V393P (dato no mostrado). Se considera probable (debido a su localización), que las mutantes de EscN L395D, E401A y Y402A tampoco interactúen con Orf15, y que por tal motivo dichas mutantes no sean funcionales y no complementan a una cepa EPEC Δ escN. Para la conclusión de este proyecto se continuará estandarizando dicho ensayo y se evaluará la interacción de la proteína Orf15 con todas las

mutantes de la ATPasa generadas en este estudio que no complementan la secreción.

De acuerdo con estos resultados, en el sistema flagelar se piensa que la proteína FliJ pudiera tener un papel semejante al de la subunidad γ de la F_0F_1 -ATPasa [169,170] (subunidad que acopla el gradiente electroquímico con la rotación de las subunidades α y β durante la síntesis de ATP [159,160]). Además también en este sistema, la interacción de FliJ con la ATPasa FliI se ha relacionado con la α -hélice C1 de FliI (Minamino, T., comunicación personal). Sin embargo, para que FliJ pudiese tener una función semejante a la subunidad γ , la orientación del homohexámero de la ATPasa del SST3 debería ser equivalente a la de las subunidades α y β , es decir, con el C-terminal hacia la membrana plasmática y el N-terminal hacia el citosol [171], lo cual es diferente de como se visualiza actualmente.

En cuanto a las mutantes puntuales de la α -hélice C2 (D411A e I414P) debido a su localización podemos especular que el defecto en su funcionalidad pudiese encontrarse relacionado con otra interacción. Por ejemplo, se ha descrito la interacción de la ATPasa FliI con las regiones solubles de las proteínas ortólogas de EscU (FlhB) y EscV (FlhA) [72,73,109] así como la interacción de la ATPasa Spa47, del inyectisoma de *Shigella*, con la proteína Spa33 (correspondiente a EscQ de EPEC), proteína que se predice forma un anillo citosólico en la base del inyectisoma [127]; además resultados preeliminares en nuestro laboratorio indican la interacción de las proteínas EscN y EscQ. Otra interacción que sería interesante evaluar es con la proteína EscD, pues para el inyectisoma de *C. pneumoniae* se reportó la interacción de la proteína correspondiente, CdsD con la ATPasa CdsN [108].

Finalmente, los antecedentes publicados y los resultados obtenidos en este trabajo todavía no son suficientes para discriminar entre dos posibles modelos que explicarían el mecanismo de acoplamiento de la energía química de hidrólisis del ATP y la secreción de proteínas.

En el primero de éstos, el homohexámero de la ATPasa del SST3 se orienta con su C-terminal hacia el aparato de exportación y el N-terminal hacia el citosol bacteriano (de modo semejante a las subunidades α y β de F_1). En este caso, es probable que la interacción con la proteína reguladora pudiera

estabilizar la localización de la ATPasa; y por otra parte, la proteína FliJ/Orf15 (flagelo/inyectisoma) se ubicaría en el interior del homohexámero y quizá podría acoplar la energía de la FPM con la catálisis de la ATPasa (de modo semejante a como actúa la subunidad γ en F_1), provocando cambios importantes en su región C-terminal que inducirían la disociación del complejo chaperona-sustrato y la incorporación inicial de este último a la entrada del canal secretor. La FPM energizaría el resto del desplegamiento y conducción de los sustratos a través del SST3.

A pesar de que las similitudes estructurales de las ATPasas de los SST3 con las subunidades α y β [102,103]; de la proteína FliJ con la subunidad γ [169]; y la similitud de secuencia de la proteína reguladora con las subunidades b y δ [151] representan un argumento que favorece un mecanismo de acción en el que estas tres proteínas asociadas a los SST3 operan de modo similar a la F_0 - F_1 ATPasa, no se han identificado proteínas del SST3 que pudiesen acoplar el flujo de protones con la rotación de FliJ/Orf15, es decir las proteínas correspondientes a las subunidades ϵ , a y c de la F_0 - F_1 ATPasa.

En cuanto al segundo modelo, el homohexámero de la ATPasa se orientaría con su N-terminal hacia el aparato de exportación y el C-terminal hacia el citosol bacteriano. En este caso se puede suponer que una vez que la ATPasa reconoce a las proteínas a secretarse las disocia de sus chaperonas e inicia la incorporación de las mismas al canal interior del homohexámero de la ATPasa mediante movimientos del C-terminal, principalmente del asa A (semejante al mecanismo propuesto para las AAA+ ATPasas), siendo el canal del homohexámero de la ATPasa un pasaje continuo hacia el canal secretor del sistema. Esto significaría que la proteína FliJ/Orf15 no se localiza al interior del homohexámero de la ATPasa y que su función podría entonces estar relacionada con la activación de la ATPasa, quizá liberando la represión catalítica mediada por la proteína reguladora. Un argumento que favorece este modelo es la localización membranal de la ATPasa relacionada con su región N-terminal [105].

Por último, ciertos aspectos necesarios para validar o descartar alguno de estos modelos son determinar el estado oligomérico y la orientación espacial de la ATPasa en la base del sistema, además de la estequiometría del

complejo multiproteico ATPasa-proteína reguladora-FliJ/Orf15, así como evaluar la actividad de ATPasa de dicho complejo. Por otra parte, conocer las funciones de las otras proteínas que conforman el aparato de exportación representa otro de los grandes retos a futuro para entender el funcionamiento de los SST3.

CONCLUSIONES

EscN es la ATPasa asociada al SST3 de EPEC, y los valores catalíticos determinados en este trabajo indican que es una enzima semejante a la descrita en otros SST3.

La actividad de ATPasa de EscN es dependiente de su concentración, lo que indica que su activación se relaciona a la formación de oligómeros. De hecho, EscN puede autoasociarse en diferentes formas oligoméricas, siendo la forma hexamérica la de mayor actividad hidrolítica, Debido a esto, y a su similitud con las subunidades α y β del sector F_1 de la ATPasa, proponemos que la forma funcional de EscN es el homohexámero.

La proteína EscL interactúa a través de su región C-terminal con el dominio N-terminal de EscN, y es la proteína reguladora negativa de EscN en el SST3 de EPEC ya que inhibe la actividad de ATPasa.

La mayoría de los residuos de la región C-terminal de EscN que están altamente conservados, se ubican en las α -hélices C1, C2 y el asa A del C-terminal de las ATPasas de SST3, se encuentran expuestos en el modelo del homohexámero y son importantes para la función de la proteína.

En EscN los cambios V393P, L395D, E401A, Y402A, D411A e I414P tienen un efecto negativo sobre la secreción de proteínas vía SST3, a pesar de no afectar la estabilidad de la proteína y de mantener una actividad hidrolítica semejante a la de la enzima silvestre.

Contrario a lo planteado en la hipótesis y a los antecedentes de la literatura, el defecto de las mutaciones en el C-terminal de EscN no está relacionado con el reconocimiento de los complejos chaperona-efector.

Como se ha descrito en diferentes SST3 la ATPasa asociada a éstos es una proteína que participa en múltiples interacciones, en este trabajo se identificaron tres nuevas interacciones para la proteína EscN con las proteínas EscL, SepL y Orf15.

PERSPECTIVAS

Para entender mejor el papel de la proteína EscL en el funcionamiento del SST3 se plantea realizar una mutante nula del gen *escL*, evaluar su fenotipo y la complementación de la misma con el gen silvestre y los recortes generados en este estudio. Además de evaluar el efecto dominante negativo de EscL y de los recortes generados sobre la cepa EPEC silvestre.

Para estudiar el estado oligomérico del complejo EscL-EscN se plantea correr muestras de las proteínas formando el complejo en una columna de filtración en gel o mediante electroforesis nativa y en segunda dimensión. El uso de entrecruzadores podría incrementar la estabilidad del complejo, y ser una herramienta útil.

Evaluar la actividad de ATPasa de EscN en complejo con EscL al adicionar alguna proteína del SST3 la cual pudiese desreprimir la actividad enzimática de EscN, por ejemplo con alguna proteína chaperona o la proteína Orf15.

Con la finalidad de conocer el defecto en la función de las diferentes mutantes puntuales del C-terminal de EscN se continuará evaluando las interacciones de la ATPasa con diferentes componentes del SST3, por ejemplo con las proteínas Orf15, SepL y EscQ además de una chaperona de una proteína translocadora. Se plantea la construcción de plásmidos bicistrónicos que coexpresen el gen *escN* junto con el gen *orf15* o *sepL* que faciliten la evaluación de las interacciones.

Para determinar la orientación de la ATPasa en la base del aparato de exportación se propone evaluar la interacción de los recortes de EscN generados en este estudio con las regiones solubles de las proteínas EscU y EscV.

Apéndice 1. Repertorio de efectores de EPEC E2348/69 y sus características funcionales conocidas, adaptada de [172].

Efactor	Función celular/fisiológica
Tir	Polimerización de actina, disrupción de uniones estrechas, eliminación de microvellosidades, inactivación de SGLT-1
Map	Disfunción mitocondrial , disrupción de uniones estrechas
EspB	Formación de poro, disrupción de actina , anti-fagocitosis
EspF	Apoptosis, Disrupción de uniones estrechas, eliminación de microvellosidades, inactivación de SGLT-1, disfunción mitocondrial, maduración del pedestal, redistribución de acuaporinas, remodelación membranal, activación de N-WASP
EspH	Disrupción del citoesqueleto, modulador de la dinámica de actina
EspG, EspG2	Disrupción de uniones estrechas y microtúbulos, redistribución de acuaporinas, formación de fibras de estrés, afecta la permeabilidad celular
NleH1, NleH2	Pro-inflamatoria
EspJ	Anti- fagocitosis
NleA (EspI)	Inhibición en la secreción de proteínas, afecta el aparato de Golgi
EspZ, NleB1, NleB2, NleC, NleD, NleG, NleF, EspL2	Desconocida
NleE1, NleE2	Migración transepitelial de polimorfonucleares
*En negritas se marcan los efectores codificados dentro de la isla LEE.	

Apéndice 2. Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio

nombre	secuencia	secuencia de restricción
escNFw	5' AGGAACGGCATATGATTTTCAGAGC 3'	<i>NdeI</i>
escNRv	5' ACTGTCCAGGATCCTCAGGCAACC 3'	<i>BamHI</i>
escNGSTF	5' GAAGGATCCATGATTTTCAGAGCATG 3'	<i>BamHI</i>
escNGSTR	5' CTGCTCGAGATACTCAGGCAACCAC 3'	<i>XhoI</i>
orf5BamF	5' CCAACTCGGATCCATGATTTAT 3'	<i>BamHI</i>
orf5SalR	5' GTCATTAATGTCGACATATCATCA 3'	<i>SalI</i>
L51escL	5' CTGATGATATTGGATCCCTGGCTCG 3'	<i>BamHI</i>
R90escL	5' CAATGAGAGAAAGGATCCCGAAAA 3'	<i>BamHI</i>
escLPst	5' CATTAAATGCTGCAGATCATCATT 3'	<i>PstI</i>
escNGLY42	5' CAAGATTATCCATATGGGCGGGAC 3'	<i>NdeI</i>
escNEND372	5' CGCAAAGGATCCGATCAAACAACG 3'	<i>BamHI</i>
nombre	secuencia	mutación que incorporan
FENK183E	5' GGTTTCAGGCGTTGGTGAAGTACGCTTTTGG 3'	Lys183Glu
RENK183E	5' CAAAAGCGTACTTTCACCAACGCCTGAACC 3'	
FENV393P	5' GCAACTTATAAAAATCCTGAGCTGCTTATTCG 3'	Val393Pro
RENV393P	5' CGAATAAGCAGCTCAGGATTTTTATAAGTTGC 3'	
NV393NFW	5' GCAACTTATAAAAATAATGAGCTGCTTATTCG 3'	Val393Asn
NV393NRV	5' CGAATAAGCAGCTCATTATTTTTATAAGTTGC 3'	
NV393AFW	5' GCAACTTATAAAAATGCTGAGCTGCTTATTCG 3'	Val393Ala
NV393ARV	5' CGAATAAGCAGCTCAGCATTTTTTATAAGTTGC 3'	
NL395DFW	5' TATAAAAATGTTGAGGATCTTATTCGTATTGGT 3'	Leu395Asp
NL395DRV	5' ACCAATACGAATAAGATCCCTATTATTTTTATA 3'	
NG400AFW	5' CTGCTTATTCGTA TTGCTGAGTA CACGATGGG 3'	Gly400Ala
NG400ARV	5' CCCATCGTG TACTCAGCAA TACGAATAAGCAG 3'	
NE401AFW	5' CTTATTCGTATTGGTGCGTACACGATGGGGC 3'	Glu401Ala
NE401ARV	5' GCCCATCGTG TACGCACCAATACGAATAAG 3'	
NY402AFW	5' ATTCGTATTGGTGAGGCCACGATGGGGCAAGA 3'	Tyr402Ala
NY402ARV	5' TCTTGCCCATCGTGGCCTCACCAATACGAAT 3'	
NT403AFW	5' CGTATTGGTGAGTACCGATGGGGCAAGATCC 3'	Tre403Ala
NT403ARV	5' GGATCTTGCCCATCGCGTACTCACCAATACG 3'	

NM404AFW	5' ATTGGTGAGTACACGGCGGGGCAAGATCCTGA 3'	Met404Ala
NM404ARV	5' TCAGGATCTTGCCCCGCGCGTGTACTCACCAAT 3'	
ND411AFW	5' GATCCTGAAGCAGCTAAGGCAATAAAAAATAG 3'	Asp411Ala
ND411ARV	5' CTATTTTTTATTGCCTTAGCTGCTTCAGGATC 3'	
NI414AFW	5' GAAGCAGATAAGGCAGCAAAAAATAGGAAATT 3'	Ile414Ala
NI414ARV	5' AATTCCTATTTTTTGCTGCCTTATCTGCTTC 3'	
NI414PrFW	5' GAAGCAGATAAGGCACCAAAAAATAGGAAATT 3'	Ile414Pro
NI414PrRV	5' AATTCCTATTTTTTGGTGCCTTATCTGCTTC 3'	
NQ426AFW	5' CAGAACTTTATACAAGCAAGCACCAAAGATATC 3'	Gln426Ala
NQ426ARV	5' GATATCTTTGGTGCTTGCTTGTATAAAGTTCTG 3'	

REFERENCIAS

1. Nataro JP, Kaper JB: **Diarrheagenic Escherichia coli**. *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**:142-201.
2. Chen HD, Frankel G: **Enteropathogenic Escherichia coli: unravelling pathogenesis**. *FEMS Microbiol Rev* 2005, **29**:83-98.
3. Siitonen A: **Escherichia coli in fecal flora of healthy adults: serotypes, P and type 1C fimbriae, non-P mannose-resistant adhesins, and hemolytic activity**. *J Infect Dis* 1992, **166**:1058-1065.
4. Pallen MJ, Wren BW: **Bacterial pathogenomics**. *Nature* 2007, **449**:835-842.
5. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL: **Pathogenic Escherichia coli**. *Nat Rev Microbiol* 2004, **2**:123-140.
6. Spears KJ, Roe AJ, Gally DL: **A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli pathogenesis**. *FEMS Microbiol Lett* 2006, **255**:187-202.
7. Torres AG, Zhou X, Kaper JB: **Adherence of diarrheagenic Escherichia coli strains to epithelial cells**. *Infect Immun* 2005, **73**:18-29.
8. Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, Waterman DH, Hornick RB, Young CR, Sotman S: **Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive**. *Lancet* 1978, **1**:1119-1122.
9. Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E: **New insights into the epidemiology of enteropathogenic Escherichia coli infection**. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008, **102**:852-856.
10. Cravioto A, Vasquez V: **[Escherichia coli: pathogenic mechanisms and enterohemorrhagic strains]**. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1988, **45**:196-197.
11. Clarke SC, Haigh RD, Freestone PP, Williams PH: **Virulence of enteropathogenic Escherichia coli, a global pathogen**. *Clin Microbiol Rev* 2003, **16**:365-378.
12. Staley TE, Norris HT, Smith-Staley JA: **Response of the rabbit ileal loop to four serotypes of enteropathogenic Escherichia coli**. *Am J Vet Res* 1974, **35**:1235-1240.
13. Polotsky YE, Dragunskaya EM, Seliverstova VG, Avdeeva TA, Chakhutinskaya MG, Ketyi I, Vertenyl A, Ralovich B, Emody L, Malovics I, et al.: **Pathogenic effect of enterotoxigenic Escherichia coli and Escherichia coli causing infantile diarrhoea**. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1977, **24**:221-236.
14. Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA: **Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines**. *Infect Immun* 1983, **41**:1340-1351.
15. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF: **Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli infections: translocation, translocation, translocation**. *Infect Immun* 2005, **73**:2573-2585.
16. Vallance BA, Finlay BB: **Exploitation of host cells by enteropathogenic Escherichia coli**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:8799-8806.
17. Stone KD, Zhang HZ, Carlson LK, Donnenberg MS: **A cluster of fourteen genes from enteropathogenic Escherichia coli is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus**. *Mol Microbiol* 1996, **20**:325-337.
18. Cravioto A, Gross, R.J., Scotland, S.M. and Rowe, B. : **An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes**. *Curr. Microbiol.* 1979, **3**:95-99.
19. Sohel I, Puente JL, Ramer SW, Bieber D, Wu CY, Schoolnik GK: **Enteropathogenic Escherichia coli: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis**. *J Bacteriol* 1996, **178**:2613-2628.
20. Giron JA, Torres AG, Freer E, Kaper JB: **The flagella of enteropathogenic Escherichia coli mediate adherence to epithelial cells**. *Mol Microbiol* 2002, **44**:361-379.
21. Nougayrede JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS: **Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to host cells**. *Cell Microbiol* 2003, **5**:359-372.
22. Kenny B: **Mechanism of action of EPEC type III effector molecules**. *Int J Med Microbiol* 2002, **291**:469-477.
23. Viswanathan VK, Lukic S, Koutsouris A, Miao R, Muza MM, Hecht G: **Cytokeratin 18 interacts with the enteropathogenic Escherichia coli secreted protein F (EspF) and is redistributed after infection**. *Cell Microbiol* 2004, **6**:987-997.

24. Kanack KJ, Crawford JA, Tatsuno I, Karmali MA, Kaper JB: **SepZ/EspZ is secreted and translocated into HeLa cells by the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system.** *Infect Immun* 2005, **73**:4327-4337.
25. Crane JK, McNamara BP, Sonnenberg MS: **Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic Escherichia coli.** *Cell Microbiol* 2001, **3**:197-211.
26. Elliott SJ, Krejany EO, Mellies JL, Robins-Browne RM, Sasakawa C, Kaper JB: **EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic Escherichia coli with similarities to VirA of Shigella flexneri.** *Infect Immun* 2001, **69**:4027-4033.
27. Tomson FL, Viswanathan VK, Kanack KJ, Kanteti RP, Straub KV, Menet M, Kaper JB, Hecht G: **Enteropathogenic Escherichia coli EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier.** *Mol Microbiol* 2005, **56**:447-464.
28. Matsuzawa T, Kuwae A, Abe A: **Enteropathogenic Escherichia coli type III effectors EspG and EspG2 alter epithelial paracellular permeability.** *Infect Immun* 2005, **73**:6283-6289.
29. Marches O, Nougayrede JP, Boullier S, Mainil J, Charlier G, Raymond I, Pohl P, Boury M, De Rycke J, Milon A, et al.: **Role of tir and intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic Escherichia coli serotype O103:H2.** *Infect Immun* 2000, **68**:2171-2182.
30. Ritchie JM, Thorpe CM, Rogers AB, Waldor MK: **Critical roles for stx2, eae, and tir in enterohemorrhagic Escherichia coli-induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits.** *Infect Immun* 2003, **71**:7129-7139.
31. Campellone KG, Leong JM: **Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic E. coli and enterohemorrhagic E. coli O157:H7.** *Curr Opin Microbiol* 2003, **6**:82-90.
32. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB: **Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells.** *Cell* 1997, **91**:511-520.
33. Kalman D, Weiner OD, Goosney DL, Sedat JW, Finlay BB, Abo A, Bishop JM: **Enteropathogenic E. coli acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals.** *Nat Cell Biol* 1999, **1**:389-391.
34. Sal-Man N, Biemans-Oldehinkel E, Finlay BB: **Structural microengineers: pathogenic Escherichia coli redesigns the actin cytoskeleton in host cells.** *Structure* 2009, **17**:15-19.
35. Saldana Z, Xicohtencatl-Cortes J, Avelino F, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, Giron JA: **Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing Escherichia coli and identification of Fis as a negative regulator of curli.** *Environ Microbiol* 2009, **11**:992-1006.
36. Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Sonnenberg MS, Frankel G, Knutton S: **Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin.** *Microbiology* 2004, **150**:527-538.
37. Jarvis KG, Giron JA, Jerse AE, McDaniel TK, Sonnenberg MS, Kaper JB: **Enteropathogenic Escherichia coli contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:7996-8000.
38. McDaniel TK, Jarvis KG, Sonnenberg MS, Kaper JB: **A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:1664-1668.
39. Bustamante VH, Santana FJ, Calva E, Puente JL: **Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic Escherichia coli: Ler antagonizes H-NS-dependent repression.** *Mol Microbiol* 2001, **39**:664-678.
40. Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P, et al.: **Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:3597-3602.
41. Barba J, Bustamante VH, Flores-Valdez MA, Deng W, Finlay BB, Puente JL: **A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrIA.** *J Bacteriol* 2005, **187**:7918-7930.
42. Mellies JL, Barron AM, Carmona AM: **Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli virulence gene regulation.** *Infect Immun* 2007, **75**:4199-4210.

43. McDaniel TK, Kaper JB: **A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12.** *Mol Microbiol* 1997, **23**:399-407.
44. Dean P, Maresca M, Kenny B: **EPEC's weapons of mass subversion.** *Curr Opin Microbiol* 2005, **8**:28-34.
45. Hueck CJ: **Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, **62**:379-433.
46. Cornelis GR: **The type III secretion injectisome.** *Nat Rev Microbiol* 2006, **4**:811-825.
47. Dale C, Plague GR, Wang B, Ochman H, Moran NA: **Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:12397-12402.
48. Macnab RM: **How bacteria assemble flagella.** *Annu Rev Microbiol* 2003, **57**:77-100.
49. Gophna U, Ron EZ, Graur D: **Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events.** *Gene* 2003, **312**:151-163.
50. Macnab RM: **Type III flagellar protein export and flagellar assembly.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**:207-217.
51. Ghosh P: **Process of protein transport by the type III secretion system.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, **68**:771-795.
52. Blocker A, Jouihri N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, Parsot C, Sansonetti P, Allaoui A: **Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretion.** *Mol Microbiol* 2001, **39**:652-663.
53. Feldman MF, Muller S, Wuest E, Cornelis GR: **SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system.** *Mol Microbiol* 2002, **46**:1183-1197.
54. Stafford GP, Evans LD, Krumscheid R, Dhillon P, Fraser GM, Hughes C: **Sorting of early and late flagellar subunits after docking at the membrane ATPase of the type III export pathway.** *J Mol Biol* 2007, **374**:877-882.
55. Riordan KE, Schneewind O: **YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes.** *Mol Microbiol* 2008, **68**:1485-1501.
56. Homma M, Kutsukake K, Iino T, Yamaguchi S: **Hook-associated proteins essential for flagellar filament formation in *Salmonella typhimurium*.** *J Bacteriol* 1984, **157**:100-108.
57. Sukhan A, Kubori T, Wilson J, Galan JE: **Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated needle complex.** *J Bacteriol* 2001, **183**:1159-1167.
58. Minamino T, Imada K, Namba K: **Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly.** *Mol Biosyst* 2008, **4**:1105-1115.
59. Glaser P, Sakamoto H, Bellalou J, Ullmann A, Danchin A: **Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*.** *Embo J* 1988, **7**:3997-4004.
60. Lee VT, Schneewind O: **Yop fusions to tightly folded protein domains and their effects on *Yersinia enterocolitica* type III secretion.** *J Bacteriol* 2002, **184**:3740-3745.
61. Sorg JA, Blaylock B, Schneewind O: **Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:16490-16495.
62. Bennett JC, Hughes C: **From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones.** *Trends Microbiol* 2000, **8**:202-204.
63. Feldman MF, Cornelis GR: **The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa.** *FEMS Microbiol Lett* 2003, **219**:151-158.
64. Lee SH, Galan JE: ***Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity.** *Mol Microbiol* 2004, **51**:483-495.
65. Thomas NA, Deng W, Puente JL, Frey EA, Yip CK, Strynadka NC, Finlay BB: **CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 2005, **57**:1762-1779.
66. Parsot C, Hamiaux C, Page AL: **The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems.** *Curr Opin Microbiol* 2003, **6**:7-14.
67. Macnab RM: **The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus.** *J Bacteriol* 1999, **181**:7149-7153.
68. Minamino T, Macnab RM: **Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates.** *J Bacteriol* 1999, **181**:1388-1394.

69. Suzuki H, Yonekura K, Murata K, Hirai T, Oosawa K, Namba K: **A structural feature in the central channel of the bacterial flagellar FliF ring complex is implicated in type III protein export.** *J Struct Biol* 1998, **124**:104-114.
70. McMurry JL, Van Arnam JS, Kihara M, Macnab RM: **Analysis of the cytoplasmic domains of Salmonella FlhA and interactions with components of the flagellar export machinery.** *J Bacteriol* 2004, **186**:7586-7592.
71. Kihara M, Minamino T, Yamaguchi S, Macnab RM: **Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FliF of Salmonella and FlhA, a membrane component of its export apparatus.** *J Bacteriol* 2001, **183**:1655-1662.
72. Minamino T, Macnab RM: **Interactions among components of the Salmonella flagellar export apparatus and its substrates.** *Mol Microbiol* 2000, **35**:1052-1064.
73. Zhu K, Gonzalez-Pedrajo B, Macnab RM: **Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of Salmonella.** *Biochemistry* 2002, **41**:9516-9524.
74. Fraser GM, Gonzalez-Pedrajo B, Tame JR, Macnab RM: **Interactions of FliJ with the Salmonella type III flagellar export apparatus.** *J Bacteriol* 2003, **185**:5546-5554.
75. Edqvist PJ, Olsson J, Lavander M, Sundberg L, Forsberg A, Wolf-Watz H, Lloyd SA: **YscP and YscU regulate substrate specificity of the Yersinia type III secretion system.** *J Bacteriol* 2003, **185**:2259-2266.
76. Sorg I, Wagner S, Amstutz M, Muller SA, Broz P, Lussi Y, Engel A, Cornelis GR: **YscU recognizes translocators as export substrates of the Yersinia injectisome.** *Embo J* 2007, **26**:3015-3024.
77. Fraser GM, Hirano T, Ferris HU, Devgan LL, Kihara M, Macnab RM: **Substrate specificity of type III flagellar protein export in Salmonella is controlled by subdomain interactions in FlhB.** *Mol Microbiol* 2003, **48**:1043-1057.
78. Ferris HU, Furukawa Y, Minamino T, Kroetz MB, Kihara M, Namba K, Macnab RM: **FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism.** *J Biol Chem* 2005, **280**:41236-41242.
79. Wiesand U, Sorg I, Amstutz M, Wagner S, van den Heuvel J, Luhrs T, Cornelis GR, Heinz DW: **Structure of the Type III Secretion Recognition Protein YscU from Yersinia enterocolitica.** *J Mol Biol* 2008.
80. Claret L, Calder SR, Higgins M, Hughes C: **Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly.** *Mol Microbiol* 2003, **48**:1349-1355.
81. Minamino T, Kazetani K, Tahara A, Suzuki H, Furukawa Y, Kihara M, Namba K: **Oligomerization of the bacterial flagellar ATPase FliI is controlled by its extreme N-terminal region.** *J Mol Biol* 2006, **360**:510-519.
82. Minamino T, Macnab RM: **FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of Salmonella, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity.** *Mol Microbiol* 2000, **37**:1494-1503.
83. Minamino T, Gonzalez-Pedrajo B, Oosawa K, Namba K, Macnab RM: **Structural properties of FliH, an ATPase regulatory component of the Salmonella type III flagellar export apparatus.** *J Mol Biol* 2002, **322**:281-290.
84. Gonzalez-Pedrajo B, Fraser GM, Minamino T, Macnab RM: **Molecular dissection of Salmonella FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway.** *Mol Microbiol* 2002, **45**:967-982.
85. Okabe M, Minamino T, Imada K, Namba K, Kihara M: **Role of the N-terminal domain of FliI ATPase in bacterial flagellar protein export.** *FEBS Lett* 2009, **583**:743-748.
86. Blaylock B, Riordan KE, Missiakas DM, Schneewind O: **Characterization of the Yersinia enterocolitica type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL.** *J Bacteriol* 2006, **188**:3525-3534.
87. Minamino T, Gonzalez-Pedrajo B, Kihara M, Namba K, Macnab RM: **The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH.** *J Bacteriol* 2003, **185**:3983-3988.
88. Gonzalez-Pedrajo B, Minamino T, Kihara M, Namba K: **Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export.** *Mol Microbiol* 2006, **60**:984-998.
89. McMurry JL, Murphy JW, Gonzalez-Pedrajo B: **The FliN-FliH Interaction Mediates Localization of Flagellar Export ATPase FliI to the C Ring Complex.** *Biochemistry* 2006, **45**:11790-11798.

90. Jackson MW, Plano GV: **Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system.** *FEMS Microbiol Lett* 2000, **186**:85-90.
91. Jouihri N, Sory MP, Page AL, Gounon P, Parsot C, Allaoui A: **MxiK and MxiN interact with the Spa47 ATPase and are required for transit of the needle components MxiH and MxiI, but not of Ipa proteins, through the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*.** *Mol Microbiol* 2003, **49**:755-767.
92. Johnson DL, Stone CB, Mahony JB: **Interactions between CdsD, CdsQ, and CdsL, three putative *Chlamydomphila pneumoniae* type III secretion proteins.** *J Bacteriol* 2008, **190**:2972-2980.
93. Minamino T, Chu R, Yamaguchi S, Macnab RM: **Role of FliJ in flagellar protein export in *Salmonella*.** *J Bacteriol* 2000, **182**:4207-4215.
94. Evans LD, Stafford GP, Ahmed S, Fraser GM, Hughes C: **An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:17474-17479.
95. Evans LD, Hughes C: **Selective binding of virulence type III export chaperones by FliJ escort orthologues InvI and YscO.** *FEMS Microbiol Lett* 2009.
96. Journet L, Agrain C, Broz P, Cornelis GR: **The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler.** *Science* 2003, **302**:1757-1760.
97. Minamino T, Yamaguchi S, Macnab RM: **Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*.** *J Bacteriol* 2000, **182**:3029-3036.
98. Akeda Y, Galan JE: **Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion.** *Nature* 2005, **437**:911-915.
99. Thomas J, Stafford GP, Hughes C: **Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:3945-3950.
100. Minamino T, Namba K: **Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export.** *Nature* 2008, **451**:485-488.
101. Paul K, Erhardt M, Hirano T, Blair DF, Hughes KT: **Energy source of flagellar type III secretion.** *Nature* 2008, **451**:489-492.
102. Imada K, Minamino T, Tahara A, Namba K: **Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1-ATPase subunits.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:485-490.
103. Zarivach R, Vuckovic M, Deng W, Finlay BB, Strynadka NC: **Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system.** *Nat Struct Mol Biol* 2007, **14**:131-137.
104. Auvray F, Ozin AJ, Claret L, Hughes C: **Intrinsic membrane targeting of the flagellar export ATPase FliI: interaction with acidic phospholipids and FliH.** *J Mol Biol* 2002, **318**:941-950.
105. Akeda Y, Galan JE: **Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains.** *J Bacteriol* 2004, **186**:2402-2412.
106. Silva-Herzog E, Dreyfus G: **Interaction of FliI, a component of the flagellar export apparatus, with flagellin and hook protein.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1431**:374-383.
107. Gauthier A, Finlay BB: **Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 2003, **185**:6747-6755.
108. Stone CB, Johnson DL, Bulir DC, Gilchrist JD, Mahony JB: **Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN (Cpn0707) of *Chlamydomphila pneumoniae*.** *J Bacteriol* 2008, **190**:6580-6588.
109. Lorenz C, Buttner D: **Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.** *J Bacteriol* 2009, **191**:1414-1428.
110. Pozidis C, Chalkiadaki A, Gomez-Serrano A, Stahlberg H, Brown I, Tampakaki AP, Lustig A, Sianidis G, Politou AS, Engel A, et al.: **Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization.** *J Biol Chem* 2003, **278**:25816-25824.

111. Muller SA, Pozidis C, Stone R, Meesters C, Chami M, Engel A, Economou A, Stahlberg H: **Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN.** *Mol Microbiol* 2006, **61**:119-125.
112. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K: **Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy.** *Nature* 2003, **424**:643-650.
113. Minamino T, Imada K, Namba K: **Molecular motors of the bacterial flagella.** *Curr Opin Struct Biol* 2008, **18**:693-701.
114. Martin A, Baker TA, Sauer RT: **Diverse pore loops of the AAA+ ClpX machine mediate unassisted and adaptor-dependent recognition of ssrA-tagged substrates.** *Mol Cell* 2008, **29**:441-450.
115. Fan F, Macnab RM: **Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in Salmonella typhimurium.** *J Biol Chem* 1996, **271**:31981-31988.
116. Eichelberg K, Ginocchio CC, Galan JE: **Molecular and functional characterization of the Salmonella typhimurium invasion genes invB and invC: homology of InvC to the FOF1 ATPase family of proteins.** *J Bacteriol* 1994, **176**:4501-4510.
117. Wilharm G, Lehmann V, Krauss K, Lehnert B, Richter S, Ruckdeschel K, Heesemann J, Trulzsch K: **Yersinia enterocolitica type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB.** *Infect Immun* 2004, **72**:4004-4009.
118. Galperin M, Dibrov PA, Glagolev AN: **delta mu H+ is required for flagellar growth in Escherichia coli.** *FEBS Lett* 1982, **143**:319-322.
119. Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Sonnenberg MS, Kaper JB: **The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic Escherichia coli E2348/69.** *Mol Microbiol* 1998, **28**:1-4.
120. Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C, Abe A: **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* 2001, **98**:11638-11643.
121. Ogino T, Ohno R, Sekiya K, Kuwae A, Matsuzawa T, Nonaka T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Abe A: **Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2006, **188**:2801-2811.
122. Marlovits TC, Kubori T, Sukhan A, Thomas DR, Galan JE, Unger VM: **Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex.** *Science* 2004, **306**:1040-1042.
123. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galan JE, Aizawa SI: **Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system.** *Science* 1998, **280**:602-605.
124. Gauthier A, Puente JL, Finlay BB: **Secretin of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization.** *Infect Immun* 2003, **71**:3310-3319.
125. Crepin VF, Prasanna S, Shaw RK, Wilson RK, Creasey E, Abe CM, Knutton S, Frankel G, Matthews S: **Structural and functional studies of the enteropathogenic Escherichia coli type III needle complex protein EscJ.** *Mol Microbiol* 2005, **55**:1658-1670.
126. Kresse AU, Schulze K, Deibel C, Ebel F, Rohde M, Chakraborty T, Guzman CA: **Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1998, **180**:4370-4379.
127. Morita-Ishihara T, Ogawa M, Sagara H, Yoshida M, Katayama E, Sasakawa C: **Shigella Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery.** *J Biol Chem* 2006, **281**:599-607.
128. Pallen MJ, Beatson SA, Bailey CM: **Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion.** *BMC Microbiol* 2005, **5**:9.
129. Wood SE, Jin J, Lloyd SA: **YscP and YscU switch the substrate specificity of the Yersinia type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI.** *J Bacteriol* 2008, **190**:4252-4262.
130. Wilson RK, Shaw RK, Daniell S, Knutton S, Frankel G: **Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic Escherichia coli.** *Cell Microbiol* 2001, **3**:753-762.

131. Neves BC, Knutton S, Trabulsi LR, Sperandio V, Kaper JB, Dougan G, Frankel G: **Molecular and ultrastructural characterisation of EspA from different enteropathogenic Escherichia coli serotypes.** *FEMS Microbiol Lett* 1998, **169**:73-80.
132. Daniell SJ, Takahashi N, Wilson R, Friedberg D, Rosenshine I, Booy FP, Shaw RK, Knutton S, Frankel G, Aizawa S: **The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic Escherichia coli.** *Cell Microbiol* 2001, **3**:865-871.
133. Ide T, Laarmann S, Greune L, Schillers H, Oberleithner H, Schmidt MA: **Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic Escherichia coli.** *Cell Microbiol* 2001, **3**:669-679.
134. Wachter C, Beinke C, Mattes M, Schmidt MA: **Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic Escherichia coli.** *Mol Microbiol* 1999, **31**:1695-1707.
135. Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G, Frankel G: **A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic Escherichia coli involved in protein translocation into epithelial cells.** *Embo J* 1998, **17**:2166-2176.
136. Deng W, Li Y, Hardwidge PR, Frey EA, Pfuetzner RA, Lee S, Gruenheid S, Strynacka NC, Puente JL, Finlay BB: **Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens.** *Infect Immun* 2005, **73**:2135-2146.
137. Thomas NA, Deng W, Baker N, Puente J, Finlay BB: **Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic Escherichia coli.** *J Biol Chem* 2007, **282**:29634-29645.
138. Wang D, Roe AJ, McAteer S, Shipston MJ, Gally DL: **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* 2008, **69**:1499-1512.
139. Mills E, Baruch K, Charpentier X, Kobi S, Rosenshine I: **Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic Escherichia coli.** *Cell Host Microbe* 2008, **3**:104-113.
140. Ohnishi K, Ohto Y, Aizawa S, Macnab RM, Iino T: **FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in Salmonella typhimurium.** *J Bacteriol* 1994, **176**:2272-2281.
141. Ryu J, Hartin RJ: **Quick transformation in Salmonella typhimurium LT2.** *Biotechniques* 1990, **8**:43-45.
142. Ohnishi K, Fan F, Schoenhals GJ, Kihara M, Macnab RM: **The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of Salmonella typhimurium: putative components for flagellar assembly.** *J Bacteriol* 1997, **179**:6092-6099.
143. Díaz-Guerrero MA: **Purificación de complejos efector-chaperona y su reconocimiento por la ATPasa del sistema de secreción tipo III de Escherichia coli enteropatogena.** Tesis de Maestría. México D.F.: UNAM: 2009.
144. Camberg JL, Sandkvist M: **Molecular analysis of the Vibrio cholerae type II secretion ATPase EpsE.** *J Bacteriol* 2005, **187**:249-256.
145. Schagger H, von Jagow G: **Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form.** *Anal Biochem* 1991, **199**:223-231.
146. Wittig I, Schagger H: **Advantages and limitations of clear-native PAGE.** *Proteomics* 2005, **5**:4338-4346.
147. W.D. D: *The PyMOL Molecular Graphics System 0.99 edn.* Edited by DeLano Scientific SC; 2002.
148. Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson IR, Harris D, Asadulghani M, Kurokawa K, Dean P, et al.: **Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic Escherichia coli O127:H6 strain E2348/69.** *J Bacteriol* 2009, **191**:347-354.
149. Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA: **An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate.** *Anal Biochem* 1979, **100**:95-97.
150. Andrade A, Pardo JP, Espinosa N, Perez-Hernandez G, Gonzalez-Pedrajo B: **Enzymatic characterization of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion ATPase EscN.** *Arch Biochem Biophys* 2007, **468**:121-127.
151. Pallen MJ, Bailey CM, Beatson SA: **Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases.** *Protein Sci* 2006, **15**:935-941.

152. Lane MC, O'Toole PW, Moore SA: **Molecular basis of the interaction between the flagellar export proteins FliI and FliH from Helicobacter pylori.** *J Biol Chem* 2006, **281**:508-517.
153. Yagi H, Tsujimoto T, Yamazaki T, Yoshida M, Akutsu H: **Conformational change of H⁺-ATPase beta monomer revealed on segmental isotope labeling NMR spectroscopy.** *J Am Chem Soc* 2004, **126**:16632-16638.
154. Botteaux A, Sory MP, Biskri L, Parsot C, Allaoui A: **MxiC is secreted by and controls the substrate specificity of the Shigella flexneri type III secretion apparatus.** *Mol Microbiol* 2008.
155. Ferracci F, Schubot FD, Waugh DS, Plano GV: **Selection and characterization of Yersinia pestis YopN mutants that constitutively block Yop secretion.** *Mol Microbiol* 2005, **57**:970-987.
156. Henkel RD, VandeBerg JL, Walsh RA: **A microassay for ATPase.** *Anal Biochem* 1988, **169**:312-318.
157. Wilks JC, Slonczewski JL: **pH of the cytoplasm and periplasm of Escherichia coli: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry.** *J Bacteriol* 2007, **189**:5601-5607.
158. Pallen MJ, Chaudhuri RR, Henderson IR: **Genomic analysis of secretion systems.** *Curr Opin Microbiol* 2003, **6**:519-527.
159. Boyer PD: **The ATP synthase--a splendid molecular machine.** *Annu Rev Biochem* 1997, **66**:717-749.
160. Capaldi RA, Aggeler R: **Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor.** *Trends Biochem Sci* 2002, **27**:154-160.
161. Minamino T, Tame JR, Namba K, Macnab RM: **Proteolytic analysis of the FliH/FliI complex, the ATPase component of the type III flagellar export apparatus of Salmonella.** *J Mol Biol* 2001, **312**:1027-1036.
162. Dunn SD, McLachlin DT, Revington M: **The second stalk of Escherichia coli ATP synthase.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1458**:356-363.
163. Riordan KE, Sorg JA, Berube BJ, Schneewind O: **Impassable YscP substrates and their impact on the Yersinia enterocolitica type III secretion pathway.** *J Bacteriol* 2008, **190**:6204-6216.
164. Park E, Rho YM, Koh OJ, Ahn SW, Seong IS, Song JJ, Bang O, Seol JH, Wang J, Eom SH, et al.: **Role of the GYVG pore motif of HslU ATPase in protein unfolding and translocation for degradation by HslV peptidase.** *J Biol Chem* 2005, **280**:22892-22898.
165. Wang J, Song JJ, Franklin MC, Kamtekar S, Im YJ, Rho SH, Seong IS, Lee CS, Chung CH, Eom SH: **Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism.** *Structure* 2001, **9**:177-184.
166. Erlandson KJ, Miller SB, Nam Y, Osborne AR, Zimmer J, Rapoport TA: **A role for the two-helix finger of the SecA ATPase in protein translocation.** *Nature* 2008, **455**:984-987.
167. Siddiqui SM, Sauer RT, Baker TA: **Role of the processing pore of the ClpX AAA+ ATPase in the recognition and engagement of specific protein substrates.** *Genes Dev* 2004, **18**:369-374.
168. Hinnerwisch J, Fenton WA, Furtak KJ, Farr GW, Horwich AL: **Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation.** *Cell* 2005, **121**:1029-1041.
169. Ibuki T, Shimada M, Minamino T, Namba K, Imada K: **Structure of FliJ, a cytoplasmic component of the flagellar type III protein export apparatus of Salmonella.** In *BLAST X*. Edited by. Cuernavaca, México; 2009.
170. Ibuki T, Shimada M, Minamino T, Namba K, Imada K: **Crystallization and preliminary X-ray analysis of FliJ, a cytoplasmic component of the flagellar type III protein-export apparatus from Salmonella sp.** *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2009, **65**:47-50.
171. Boyer PD: **ATP synthase--past and future.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1365**:3-9.
172. Dean P, Kenny B: **The effector repertoire of enteropathogenic E. coli: ganging up on the host cell.** *Curr Opin Microbiol* 2009, **12**:101-109.



ELSEVIER

Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN

Angel Andrade ^a, Juan Pablo Pardo ^b, Norma Espinosa ^a, Gerardo Pérez-Hernández ^b,
Bertha González-Pedrajo ^{a,*}

^a Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-243, México, DF 04510, Mexico

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, Mexico

Received 17 August 2007, and in revised form 22 September 2007

Available online 29 September 2007

This paper is dedicated to May Kihara Macnab on the occasion of her retirement and to the memory of Robert M. Macnab.

Abstract

Type III secretion is a transport mechanism by which bacteria secrete proteins across their cell envelope. This protein export pathway is used by two different bacterial nanomachines: the flagellum and the injectisome. An indispensable component of these secretion systems is an ATPase similar to the F₁-ATPase β subunit. Here we characterize EscN, an enteropathogenic *Escherichia coli* type III ATPase. A recombinant version of EscN, which was fully functional in complementation tests, was purified to homogeneity. Our results demonstrate that EscN is a Mg²⁺-dependent ATPase (k_{cat} 0.35 s⁻¹). We also define optimal conditions for the hydrolysis reaction. EscN displays protein concentration-dependent activity, suggesting that the specific activity changes with the oligomeric state of the protein. The presence of active oligomers was revealed by size exclusion chromatography and native gel electrophoresis.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Type III secretion system (T3SS); Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC); EscN; ATPase; Injectisome

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)¹ is a bacterial pathogen which colonizes the human intestine causing severe diarrhea, especially among children in the developing world [1]. Upon infection, EPEC leads to the formation of attaching and effacing (A/E) lesions, which are characterized by disruption of epithelial microvilli, and the formation of actin-rich pedestal-like structures beneath the adherent bacteria [2,3]. EPEC virulence and A/E lesion development are conferred by a pathogenicity island within its genome, termed the locus of enterocyte effacement

(LEE) [4,5], that contains genes encoding a type III secretion system (T3SS) [6,7].

T3SSs are used by many Gram-negative pathogenic bacteria to deliver effector proteins into eukaryotic host cells and to assemble flagella required for motility [8,9]. These protein export pathways assemble into complex macromolecular structures composed of more than 20 proteins that transverse the bacterial cell envelope [10]. The virulence-associated T3SS or injectisome is composed of a multiring base that spans both membranes, and extends a needle-like projection that protrudes out of the cell from the bacterial surface [11]. EPEC poses a unique T3SS that attaches a filamentous extension to the needle complex called the EspA filament [12,13]. A central channel within this structure appears to function as a conduit for the translocation of effector proteins directly into enterocyte cells [14].

* Corresponding author. Fax: +52 55 56225611.

E-mail address: bpedrajo@ifc.unam.mx (B. González-Pedrajo).

¹ Abbreviations used: EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC); A/E, attaching and effacing; LEE, locus of enterocyte effacement; T3SS, type III secretion system; LB, Luria-Bertani broth; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; Pi, inorganic phosphate.

The injectisome is evolutionarily related to the flagellum [15], sharing a similar basal structure with a core of 8 proteins that are extensively conserved [11] (Fig. 1). Among these, an essential component of all T3SSs is a highly conserved ATPase that is thought to energize the secretion process. Flagellar and virulence-associated ATPases share significant amino acid sequence similarity with the catalytic β subunit of the F_0F_1 -ATPases and are able to hydrolyze ATP [16–19]. It has been shown that type III ATPases behave as peripheral membrane proteins that are activated by oligomerization [20,21]. Furthermore, it is known that these enzymes are engaged in multiple protein–protein interactions [22–28]. In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium docking of a chaperone-substrate complex at the flagellar ATPase of the membrane export apparatus has been demonstrated [29]. Additionally, it has been shown that the virulence ATPase InvC induces chaperone release and unfolding of the secreted protein in an ATP-dependent manner [30].

Recently, the first high resolution structural data were obtained for the flagellar ATPase FliI [31] and for EscN, the ATPase associated with the T3SS encoded by EPEC

[32]. EscN is essential for the virulence of this bacterial pathogen, and despite many recent advances in the study of this important enzyme family, little is known about the mechanism by which ATPase activity is linked to the transport of effectors. In order to have a better understanding of how ATPase activity is regulated during multiple dynamic protein interactions, we performed a thorough enzymatic characterization of EscN.

Materials and methods

Bacterial strains and media

Escherichia coli NovaBlue (Novagen) was used as the recipient in cloning experiments, and BL21 (DE3) pLysS (Novagen) was used for overproduction of proteins from pET-based plasmids. Streptomycin resistant wild-type EPEC strain E2348/69 [33] was used to prepare chromosomal DNA for PCR amplification and to test for secreted proteins, and an *escN* deletion mutant [34] was used for complementation assays. Luria–Bertani broth (LB) contained 10 g l⁻¹ Bacto-Tryptone, 5 g l⁻¹ yeast extract and 5 g l⁻¹ NaCl. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) was from Gibco. Ampicillin, streptomycin and chloramphenicol were added to the media to a final concentration of 100 μ g ml⁻¹, 50 μ g ml⁻¹ and 25 μ g ml⁻¹, respectively.

DNA manipulations

Synthetic primers containing restriction sites NdeI and BamHI were from IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). PCR was carried out using *Pfu Turbo* DNA polymerase (Stratagene). PCR products were purified using a Qiaquick gel extraction kit (Qiagen). Restriction enzymes and T4 DNA ligase (New England Biolabs) were used according to the manufacturers' recommendations. DNA sequencing was performed by the Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Plasmid vector expressing polyhistidine-tagged *escN* (pAEscN) was constructed by cloning PCR-amplified *escN* into NdeI/BamHI-digested pET19b vector (Novagen). Recombinant plasmids were purified using a QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Purification of recombinant EscN

Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS cells carrying plasmid pAEscN were grown in LB containing ampicillin and incubated at 30 °C with shaking until the cell density reached an OD₆₀₀ of 0.7. IPTG was added to a final concentration of 0.1 mM and incubation was continued for another 4 h. Bacterial cells were collected by centrifugation and stored at -20 °C. The cells were thawed, suspended in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 M NaCl and 20 mM imidazole), and lysed using a French press (10,000 psi). Cell lysates were centrifuged (24,000g, 15 min), to pellet undisrupted cells and inclusion bodies. Cleared lysates, which constituted the soluble fraction of EscN, were obtained after further centrifugation (145,000g, 1 h), and loaded onto a Ni-NTA agarose column pre-equilibrated with binding buffer. After extensive washing with binding buffer containing 50 mM and 70 mM of imidazole, the protein was eluted with a buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl and increasing concentrations of imidazole (150 mM and 400 mM). Purified recombinant protein was dialyzed overnight against 2.5 l of TNED buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA and 1 mM DTT) with three changes. Protein concentration was determined by using the Bio-Rad protein assay dye-binding reagent (Bio-Rad).

Secretion assays

EPEC protein secretion assays were performed as described [32] with minor modifications. Briefly, 80 μ l of an overnight EPEC culture (grown

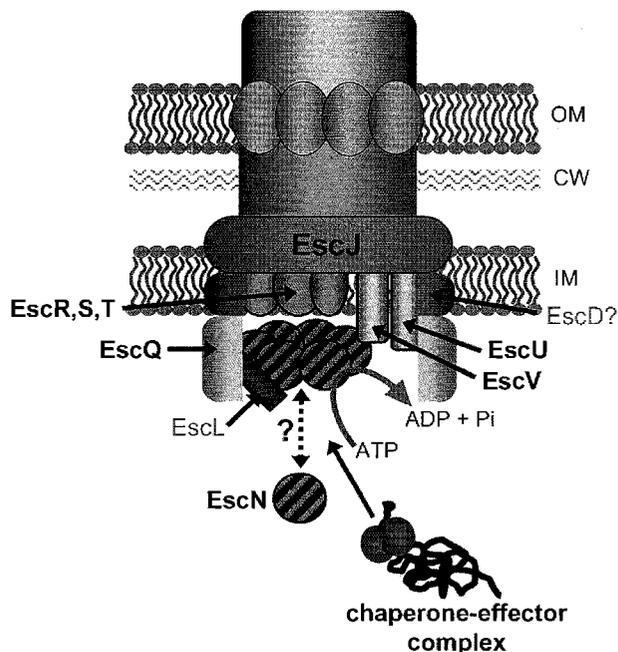


Fig. 1. Cartoon illustrating the basal structure of the EPEC type III secretion apparatus. Proteins are represented according to what is known for their orthologues in the flagellar system [9]. There are five inner membrane components of which EscV and EscU are predicted to have large soluble domains, although their stoichiometry and exact location are not known [11]. The eight proteins that share significant similarity with components of the flagellum are shown in bold. The EscJ lipoprotein forms a periplasmic ring that is anchored to the inner membrane [44]. We have established the existence of interactions between EscN–EscL and EscN–EscQ (unpublished results). EscN monomeric and hexameric forms observed in this study are indicated by hatching. The dynamic equilibrium between monomeric and multimeric forms of EscN is indicated by double-headed arrow. The other proteins were not a part of this study, and no conclusions should be drawn from the way they are depicted. OM, outer membrane; CW, cell wall; IM, inner membrane.

in LB with shaking) was inoculated into 4 ml prewarmed DMEM. Growth was continued as standing cultures in an incubator at 37 °C until OD₆₀₀ reached 0.7–0.9. After which, 3 ml of culture was harvested by centrifugation at 16,100g for 5 min, and the resulting pellet was resuspended in 200 µl of 1× SDS–PAGE sample buffer. The supernatant (3 ml) was transferred to new tubes and trichloroacetic acid was added to a final concentration of 10% (vol/vol). Tubes were incubated at 4 °C for 12 h and then centrifuged for 25 min. The pellet was air-dried and resuspended in 20 µl of 2× SDS–PAGE sample buffer containing 10% (vol/vol) of saturated Tris base. The protein concentration of different cultures was normalized to the OD₆₀₀ value.

Immunoblotting

Immunoblotting was carried out with polyclonal anti-EspB, anti-EspA and monoclonal anti-His (India-His-Probe-HRP; Pierce) antibodies. Samples subjected to SDS–PAGE were transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was then blocked for 1 h with Tris-buffered saline plus 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk, and incubated with primary antibodies. Secondary antibody was a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (Sigma). Immunodetection was performed with an ECL chemiluminescence detection kit (Amersham).

ATPase activity measurements

A modification of the malachite green ATPase assay as described in [35] was used to measure ATP hydrolysis. For all experiments, specific activity was calculated from the slopes obtained in time course analyses. A typical reaction mixture containing 0.25 µM EscN, 3 mM ATP and 4 mM MgCl₂ was incubated at 37 °C in 100 mM Tris–HCl, pH 8.0. At various time points, 100 µl of the reaction mixture was withdrawn and the reaction was stopped by adding 800 µl of color reagent (0.034% malachite green hydrochloride, 1 N HCl, 1.05% ammonium molybdate and 0.1% Triton X-100). After 2 min 100 µl of 34% citric acid was added and the reaction mixtures were incubated for 25 min. The release of inorganic phosphate (Pi) was determined by comparing the absorbance at 650 nm with a Pi standard curve. The following conditions were modified for enzymatic characterization: divalent metal ion specificity (4 mM of CaCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, CuCl₂ and MgCl₂), EscN concentration (0.02–0.45 µM), ATP concentration (0.3–4.5 mM), ADP concentration (0–2 mM), temperature (16–55 °C) and pH dependence (100 mM MES, pH 6.0–6.5; HEPES, pH 7.0–7.5 and Tris, pH 8.0–9.0). All assays were done in triplicate using different EscN samples.

Native electrophoresis

A modification of the blue native electrophoresis technique (BN–PAGE) [36] was carried out to analyze oligomeric forms of EscN. Purified recombinant EscN was subjected to BN–PAGE (linear polyacrylamide gradient gels 4–15%), in 100 mM Tris–HCl, pH 7.5. Gels were run at 50 V for 12 h at 4 °C, in cathode buffer 30 mM Tris, 100 mM glycine and 0.002% Serva blue G (Coomassie blue G-250, from Serva) and anode buffer 100 mM Tris–HCl, pH 7.5. In gel ATPase assay was performed as described previously [37]. After removal of excess dye by semidry electroblotting at 10 V for 20 min, in 20 mM Tris, 150 mM glycine and 20% methanol; gels were pre-incubated for 2 h in 270 mM glycine and 35 mM Tris–HCl, pH 8.0. ATP hydrolysis was assayed in 270 mM glycine, 35 mM Tris–HCl, pH 8.0, 5 mM ATP, 10 mM MgSO₄ and 0.15% Pb(NO₃)₂ at 30 °C. The lead–phosphate precipitates appeared after a 12 h incubation. Protein standards thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa) and bovine serum albumin (67 kDa) were used for molecular mass calibration. Densitometric analysis was carried out using the AlphaEase StandAlone Software (Alpha Innotech).

Size exclusion chromatography

Purified recombinant EscN was subjected to gel filtration chromatography on a Superdex 200 HR 10/30 column (Amersham Pharmacia),

equilibrated with TNED buffer (alone or supplemented with 2 mM ADP, ATP or AMP-PNP), and run at a flow rate of 0.4 ml min⁻¹. The protein standards described previously plus ovalbumin (43 kDa) and chymotrypsinogen A (25 kDa), were used as size markers.

Results and discussion

Purification of a functional His-EscN

N-terminally histidine-tagged EscN was overproduced under the control of the T7 promoter using pAEscN and *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Following induction by IPTG, the amount of His-EscN increased greatly although most of it formed inclusion bodies (data not shown). After high speed centrifugation, about 10% of the overproduced protein remained in the soluble fraction (Fig. 2a, lysate), which was purified to homogeneity on a nickel-affinity column (Fig. 2a, eluate), yielding 1 mg of pure protein from 300 ml of culture. His-EscN behaved anomalously in SDS–PAGE, *i.e.* it runs at an apparent molecular mass of 45 kDa whereas the deduced molecular mass for the recombinant protein is 51.8 kDa. Nevertheless, the identity of the protein was confirmed by immunoblotting using anti-His antibody (data not shown).

In order to assess the functionality of His-tagged EscN we performed *in vivo* complementation assays. Type III-dependent secretion of the translocator proteins EspA, EspB and EspD was evaluated in wild-type and Δ escN EPEC strains (Fig. 2b). The results show that the Δ escN mutant strain, which completely lost secretion competence (Fig. 2b, lane 2), was complemented by plasmid producing His-EscN (Fig. 2b, lane 4). As shown by Coomassie staining and immunoblotting, the introduction of *his-escN* into a Δ escN strain restored secretion comparable to wild-type strain (Fig. 2b, lanes 1 and 4), establishing that the recombinant EscN protein was fully functional. We also demonstrated functionality of a GST-tagged EscN protein (data not shown). This is consistent with previous reports showing that an N-terminally His-tagged FliI complements a nonflagellate *fliI* null mutant [18], interacts with its regulator FliH which inhibits ATPase activity [24], and is able to oligomerize [38]. Similar results of functional versions of recombinant proteins have been obtained for virulence type III ATPases GST-YscN [39] and His-InvC [28].

Thus, we were able to purify EscN in sufficient amounts for detailed enzymatic analysis under native conditions, avoiding the previously observed refolding problems which rendered inactive protein [16].

ATPase activity of EscN

His-tagged EscN was shown to have ATPase activity. His-EscN hydrolyzes ATP in a linear time-dependent manner, with a Mg²⁺-dependent ATPase activity of $0.36 \pm 0.02 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Fig. 3a). This rate of ATP hydrolysis is similar to the rates observed for other type III secretion family members, including InvC and FliI

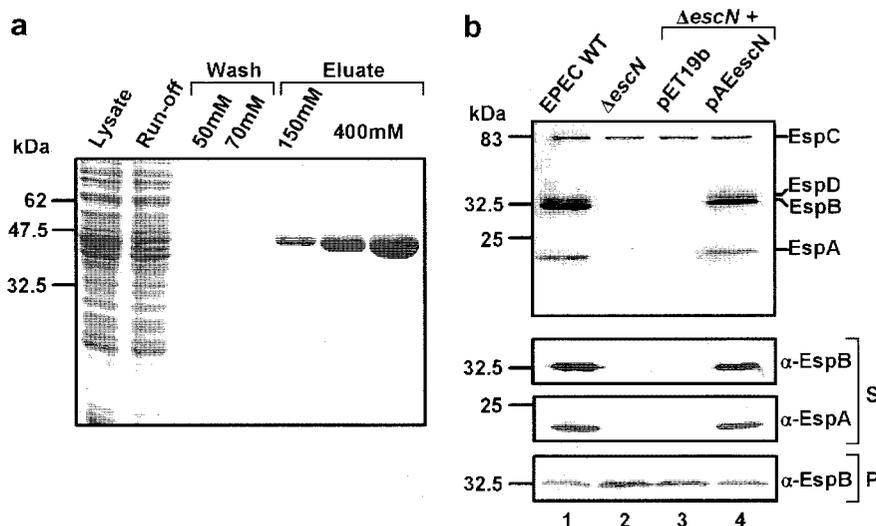


Fig. 2. Purification and functionality of His-EscN. (a) Recombinant EscN was purified by nickel affinity chromatography after elution with 400 mM imidazole. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and stained by Coomassie brilliant blue. (b) Complementation analysis of $\Delta escN$ mutant strain with plasmid-expressed His-EscN (pAEscN). Secreted protein profile of wild-type EPEC (WT) and $\Delta escN$ strains grown in DMEM at 37 °C. The secreted proteins were visualized by CBB staining (upper panel), or immunodetected (lower panels) with anti-EspA and anti-EspB antibodies in the culture supernatant (S) and anti-EspB antibody in whole-cell extracts (P). The EspC protein is not secreted through the T3SS.

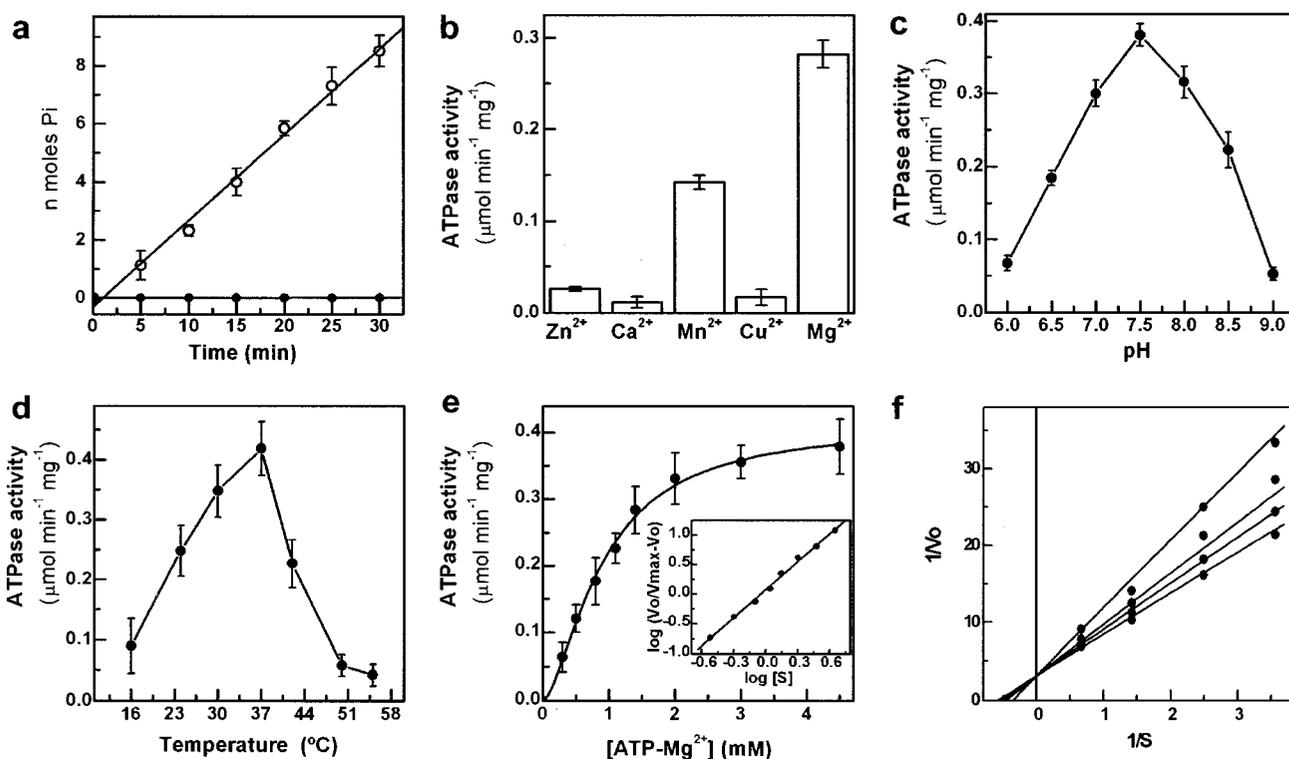


Fig. 3. ATPase activity of EscN under various conditions determined by measuring phosphate release. (a) Time course of EscN ATP hydrolysis using 3 mM ATP, in the presence of 4 mM $MgCl_2$ (open symbols), or in the absence of $MgCl_2$ (closed symbols). (b) Divalent metal ion specificity to support ATPase activity. (c) Influence of pH on ATPase activity. (d) Temperature dependence of the ATPase activity. (e) Effect of substrate concentration on the ATPase activity. Specific activity was measured with 0.25 μM of EscN in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) and increasing amounts of ATP- Mg^{2+} (0–4.5 mM), with 1 mM of $MgCl_2$ in excess. The plot of the logarithmic form of the Hill equation is shown inset. (f) Competitive inhibition by ADP- Mg^{2+} . The enzyme (0.25 μM EscN) was incubated with varying ATP- Mg^{2+} concentrations (0.28–1.5 mM) at fixed ADP- Mg^{2+} concentrations (0.4, 0.7, 1.0 or 2.0 mM).

[17,18]. The substrate ATP- Mg^{2+} could be substituted by ATP- Mn^{2+} , although the reaction rate was reduced by

50%. Other divalent cations such as Zn^{2+} , Ca^{2+} and Cu^{2+} could not substitute for Mg^{2+} (Fig. 3b).

Next, the conditions for optimal ATPase activity were determined. The hydrolytic reaction showed a maximal peak around pH 7.5 and the ATPase activity drops at pH values below 6.5 and above 8.5 (Fig. 3c). The optimal enzymatic activity was observed at a temperature between 30 and 37 °C (Fig. 3d). Activity decreased abruptly at 42 °C, suggesting protein denaturation or oligomer dissociation (see below).

Subsequently, initial velocities of ATP hydrolysis by EscN were measured as a function of the ATP-Mg²⁺ concentration. The reaction followed sigmoid kinetics (suggesting cooperativity) and data were adjusted to Hill equation (Fig. 3e). The resulting V_{\max} was found to be $0.41 \pm 0.01 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ and the $K_{0.5}$ for ATP was $0.90 \pm 0.05 \text{ mM}$. The Hill coefficient calculated from the Hill plot (Fig. 3e, inset) was 1.59 ± 0.13 indicating positive cooperativity and suggesting that oligomerization stimulates enzymatic activity. Furthermore, we showed that ADP behaved as a competitive inhibitor, with a K_i of $2.06 \pm 0.24 \text{ mM}$ (Fig. 3f).

This study represents the first characterization of ATPase activity for EscN. ATP hydrolysis by EscN is coupled to the secretion process through dynamic physical interactions with multiple proteins (*e.g.* EscL and EscQ, Andrade et al., unpublished results), the effector Tir and its chaperone CesT [25], and most likely with membrane components of the secretion apparatus as has been demonstrated for the flagellar ATPase [27,40]. The enzymatic data obtained in this work will help to further understand how ATPase activity is regulated by protein interactions occurring during its recruitment to the secretion apparatus or the ones required to aid in effector recognition and transport. Current efforts are being directed towards analyzing how kinetic constants are modified in the presence of other components and if a given protein-protein interaction could promote or restrain cooperativity (*i.e.* by measuring a change in Hill coefficient).

EscN oligomerization

To examine EscN multimerization and its effect on ATPase activity, we measured EscN specific activity at different protein concentrations under near saturating substrate conditions (3 mM ATP-Mg²⁺) (Fig. 4a). The results showed a nonlinear increase in the ATPase activity, consistent with protein oligomerization. Previous studies have shown that T3SS ATPases can form oligomers and that oligomerization stimulates ATPase activity [21,38,41]. Moreover, it has been proposed by electron microscopic analysis that these enzymes function as homohexamers [41]. Therefore, we sought to identify the oligomeric state of EscN.

Purified recombinant EscN was subjected to gel filtration chromatography and the elution profile revealed the main form to be a monomer, eluting at an estimated molecular mass of 47.3 kDa (Fig. 4b). Even though a hexameric form was not detected, a peak eluting at 646.9 kDa which

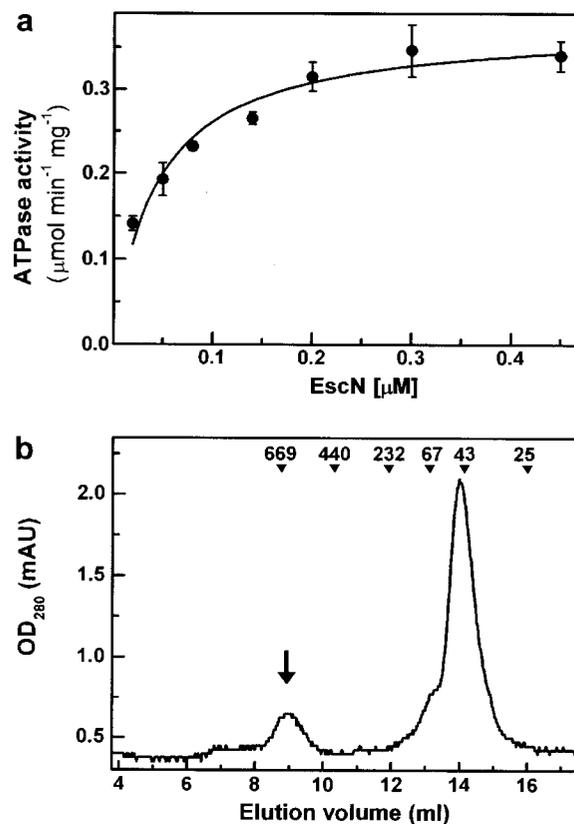


Fig. 4. (a) Protein concentration-dependent specific activity of EscN (0.02–0.45 μM) under near saturating substrate conditions (3 mM ATP and 4 mM MgCl₂). (b) Size exclusion chromatography. Elution profile of EscN from Superdex 200 HR 10/30. Arrowheads show the elution positions of molecular mass markers; thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa) and chymotrypsinogen A (25 kDa).

corresponds closely to a dodecamer was identified (Fig. 4b, arrow). Repeated chromatography after addition of magnesium and ATP, ADP or AMP-PNP did not reveal any other peak, although all these nucleotides promoted the formation of higher order aggregates (data not shown). These results are in agreement with those obtained previously for FliI [24,41] and more recently for YscN of *Yersinia enterocolitica* [39], where the putative hexameric functional form could not be detected by size exclusion chromatography. Interestingly, consistent with our results, a highly active dodecameric form was identified for HrcN of *Pseudomonas syringae*, which has been proposed by cryo-electron microscopy to be comprised of two stacked hexameric rings associated by their C-terminal domains [21,42]. The presence of hexamers and dodecamers have also been observed in ATPases of other secretion systems [35,43].

To gain further insight into EscN oligomerization we used blue native electrophoresis. BN-PAGE showed that the majority of purified EscN is monomeric, however the presence of a population of active oligomers was revealed (Fig. 5). Molecular weight determinations were done using a BN-PAGE protein standard calibration curve

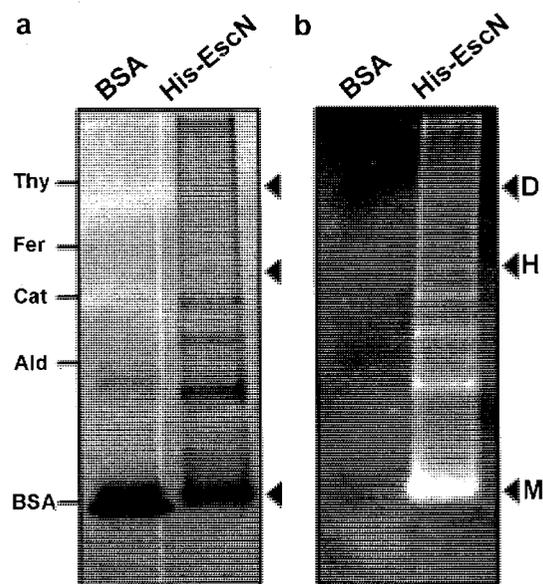


Fig. 5. EscN oligomeric forms and in gel ATPase activity. (a) Bovine serum albumin (BSA) and purified EscN were subjected to gradient BN-PAGE (4–15%) and stained with Coomassie. Molecular mass markers thyroglobulin (Thy), ferritin (Fer), catalase (Cat), aldolase (Ald, 158 kDa) and BSA are shown to the left. (b) In gel ATP hydrolysis of the same samples in (a). Arrowheads show the monomeric (M), hexameric (H) and dodecameric (D) forms.

($R^2 = 0.9752$) (protein markers are shown in Fig. 5a). The monomeric form migrated anomalously at 62 kDa probably due to the significantly lower resolution of this electrophoretic method for masses below 100 kDa [36]. Nevertheless, at higher molecular masses we identified different oligomeric forms with a good correlation to the predicted molecular mass (51.8 kDa), including a hexamer (327 kDa) and a dodecamer (622 kDa). The existence of different intermediate oligomers suggests a highly dynamic monomer–multimer equilibrium. In accordance with this, previous cross-linking experiments with FliI in the presence of phospholipids showed the formation of a dimer, trimer, tetramer and a higher order multimer above 230 kDa [41]. Also, a trimeric form of HrcN has been observed [21]. It could be that the transition between oligomeric states in these ATPases represents a regulatory checkpoint in the secretion process. Given that in our experiments most of the purified protein is found in a monomeric form, it is possible that EscN requires the presence of other components of the secretion apparatus for efficient oligomerization.

Densitometric analysis of the equivalent band in both gels (Fig. 5), showed that the activity/protein ratio is 12-fold higher for the hexamer than for the monomer (data not shown), suggesting a higher specific activity associated with the hexameric form. However, we cannot disregard the possibility of in gel oligomerization during the ATP hydrolysis reaction within the monomeric band.

The crystal structures recently obtained for FliI and EscN do not contain the N-terminal region [31,32] which is essential for oligomerization [38]. Nonetheless, given

the extensive structural similarity between these T3 ATPases and the α and β subunits of the F_0F_1 -ATP synthase, *in silico* homohexameric models have been constructed using the heterohexameric $\alpha_3\beta_3$ structure of the F_1 -ATPase [31,32]. However, the functional form of EscN *in vivo* remains to be elucidated, although our results together with the ones obtained for ortholog enzymes suggest it is most likely oligomeric. Still, many questions regarding the mechanism of action of the oligomeric form of type III ATPases remain to be answered. Further experimental data will be required to understand how the coupling of ATP binding/hydrolysis to secretion is achieved.

Acknowledgments

We are deeply indebted to May Macnab for continuous support. We thank Teresa Ballado and Javier de la Mora for technical assistance. We are grateful to José Luis Puente for kindly providing EPEC strains and advice. We acknowledge Georges Dreyfus, Tohru Minamino and Keiichi Namba for critical reading of the manuscript. This work was supported by Grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN217105) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (P46551-Q) to B.G.-P.

References

- [1] J.P. Nataro, J.B. Kaper, Clin. Microbiol. Rev. 11 (1998) 142–201.
- [2] H.W. Moon, S.C. Whipp, R.A. Argenzio, M.M. Levine, R.A. Giannella, Infect. Immun. 41 (1983) 1340–1351.
- [3] S. Knutton, T. Baldwin, P.H. Williams, A.S. McNeish, Infect. Immun. 57 (1989) 1290–1298.
- [4] T.K. McDaniel, K.G. Jarvis, M.S. Donnenberg, J.B. Kaper, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 1664–1668.
- [5] T.K. McDaniel, J.B. Kaper, Mol. Microbiol. 23 (1997) 399–407.
- [6] K.G. Jarvis, J.A. Giron, A.E. Jerse, T.K. McDaniel, M.S. Donnenberg, J.B. Kaper, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7996–8000.
- [7] S.J. Elliott, L.A. Wainwright, T.K. McDaniel, K.G. Jarvis, Y.K. Deng, L.C. Lai, B.P. McNamara, M.S. Donnenberg, J.B. Kaper, Mol. Microbiol. 28 (1998) 1–4.
- [8] C.J. Hueck, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (1998) 379–433.
- [9] R.M. Macnab, Biochim. Biophys. Acta 1694 (2004) 207–217.
- [10] A. Blocker, K. Komoriya, S. Aizawa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 3027–3030.
- [11] G.R. Cornelis, Nat. Rev. Microbiol. 4 (2006) 811–825.
- [12] S. Knutton, I. Rosenshine, M.J. Pallen, I. Nisan, B.C. Neves, C. Bain, C. Wolff, G. Dougan, G. Frankel, EMBO J. 17 (1998) 2166–2176.
- [13] K. Sekiya, M. Ohishi, T. Ogino, K. Tamano, C. Sasakawa, A. Abe, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 11638–11643.
- [14] R.K. Shaw, S. Daniell, F. Ebel, G. Frankel, S. Knutton, Cell Microbiol. 3 (2001) 213–222.
- [15] U. Gophna, E.Z. Ron, D. Graur, Gene 312 (2003) 151–163.
- [16] G. Dreyfus, A.W. Williams, I. Kawagishi, R.M. Macnab, J. Bacteriol. 175 (1993) 3131–3138.
- [17] K. Eichelberg, C.C. Ginocchio, J.E. Galan, J. Bacteriol. 176 (1994) 4501–4510.
- [18] F. Fan, R.M. Macnab, J. Biol. Chem. 271 (1996) 31981–31988.
- [19] S. Woestyn, A. Allaoui, P. Wattiau, G.R. Cornelis, J. Bacteriol. 176 (1994) 1561–1569.
- [20] F. Auvray, A.J. Ozin, L. Claret, C. Hughes, J. Mol. Biol. 318 (2002) 941–950.

- [21] C. Pozidis, A. Chalkiadaki, A. Gomez-Serrano, H. Stahlberg, I. Brown, A.P. Tampakaki, A. Lustig, G. Sianidis, A.S. Politou, A. Engel, N.J. Panopoulos, J. Mansfield, A.P. Pugsley, S. Karamanou, A. Economou, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 25816–25824.
- [22] E. Silva-Herzog, G. Dreyfus, *Biochim. Biophys. Acta* 1431 (1999) 374–383.
- [23] M.W. Jackson, G.V. Plano, *FEMS Microbiol. Lett.* 186 (2000) 85–90.
- [24] T. Minamino, R.M. Macnab, *Mol. Microbiol.* 37 (2000) 1494–1503.
- [25] A. Gauthier, B.B. Finlay, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 6747–6755.
- [26] N. Jouihri, M.P. Sory, A.L. Page, P. Gounon, C. Parsot, A. Allaoui, *Mol. Microbiol.* 49 (2003) 755–767.
- [27] T. Minamino, B. Gonzalez-Pedrajo, M. Kihara, K. Namba, R.M. Macnab, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 3983–3988.
- [28] Y. Akeda, J.E. Galan, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 2402–2412.
- [29] J. Thomas, G.P. Stafford, C. Hughes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 3945–3950.
- [30] Y. Akeda, J.E. Galan, *Nature* 437 (2005) 911–915.
- [31] K. Imada, T. Minamino, A. Tahara, K. Namba, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 485–490.
- [32] R. Zarivach, M. Vuckovic, W. Deng, B.B. Finlay, N.C. Strynadka, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 131–137.
- [33] M.M. Levine, E.J. Bergquist, D.R. Nalin, D.H. Waterman, R.B. Hornick, C.R. Young, S. Sotman, *Lancet* 1 (1978) 1119–1122.
- [34] A. Gauthier, J.L. Puente, B.B. Finlay, *Infect. Immun.* 71 (2003) 3310–3319.
- [35] J.L. Camberg, M. Sandkvist, *J. Bacteriol.* 187 (2005) 249–256.
- [36] H. Schagger, G. von Jagow, *Anal. Biochem.* 199 (1991) 223–231.
- [37] I. Wittig, H. Schagger, *Proteomics* 5 (2005) 4338–4346.
- [38] T. Minamino, K. Kazetani, A. Tahara, H. Suzuki, Y. Furukawa, M. Kihara, K. Namba, *J. Mol. Biol.* 360 (2006) 510–519.
- [39] B. Blaylock, K.E. Riordan, D.M. Missiakas, O. Schneewind, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 3525–3534.
- [40] K. Zhu, B. Gonzalez-Pedrajo, R.M. Macnab, *Biochemistry* 41 (2002) 9516–9524.
- [41] L. Claret, S.R. Calder, M. Higgins, C. Hughes, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 1349–1355.
- [42] S.A. Muller, C. Pozidis, R. Stone, C. Meesters, M. Chami, A. Engel, A. Economou, H. Stahlberg, *Mol. Microbiol.* 61 (2006) 119–125.
- [43] F.X. Gomis-Ruth, G. Moncalian, R. Perez-Luque, A. Gonzalez, E. Cabezon, F. de la Cruz, M. Coll, *Nature* 409 (2001) 637–641.
- [44] C.K. Yip, T.G. Kimbrough, H.B. Felise, M. Vuckovic, N.A. Thomas, R.A. Pfuetzner, E.A. Frey, B.B. Finlay, S.I. Miller, N.C. Strynadka, *Nature* 435 (2005) 702–707.