



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**Papel de la proteína EscP en la biogénesis y regulación de la
secreción de sustratos del inyectisoma de *Escherichia coli*
enteropatógena**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
Biól. JULIA VICTORIA MONJARÁS FERÍA

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO, IFC-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. CARMEN GÓMEZ EICHELMANN, IIB-UNAM
DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ, IIB-UNAM

MÉXICO, D.F. MARZO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A G R A D E C I M I E N T O S

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Bertha González Pedrajo y el apoyo técnico de la Dra. Norma Espinosa Sánchez, en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante la realización del mismo se recibió una beca para estudios de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (211365) y para elaboración de Tesis de la Fundación Miguel Alemán, A.C.; así como estímulos complementarios para congresos y estancias del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado.

Durante estos estudios, se realizó una estancia en el “Graduate School of Frontier Biosciences” de la Universidad de Osaka, en el laboratorio del Prof. Keiichi Namba y con apoyo complementario del programa “Global COE”.

El comité tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por los doctores Bertha González Pedrajo, Carmen Gómez Eichelmann y Luis Servín González.

El jurado que examinó el presente trabajo estuvo conformado por los doctores Diego González Halphen, Dimitris Georgellis, María Imelda López Villaseñor, Luis Servín González y Fernando Navarro García, gracias por sus enriquecedores comentarios y el tiempo dedicado.

El trabajo se desarrolló con el apoyo técnico de los miembros de la Unidad de Biología Molecular: Dra. Laura Ongay Larios, Biól. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera; de la Unidad de Cómputo: Biól. Gerardo Coello Coutiño, Ing. Juan Barbosa Castillo e Ing. Ivette Rosas Arciniega; del personal de la Unidad de Microscopía Electrónica, del Bioterio, MVZ. Héctor Malagón Rivero y del Taller de Mantenimiento: Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortíz Benavides.

Para la realización del presente proyecto de investigación se contó con el apoyo de los donativos IN212911 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM; 81847 y 180460 del CONACyT y un apoyo complementario de la Fundación Miguel Alemán, A.C.

ÍNDICE

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
1. EPEC: <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	2
2. Modelo de infección por EPEC: Lesión A/E	3
2.1. Adherencia inicial	3
2.2. Translocación de efectores y transducción de señales	6
2.3. Adherencia íntima y formación de pedestal	7
3. Sistema de secreción tipo 3	10
3.1. Cuerpo basal	12
3.2. Componentes extracelulares	15
ANTECEDENTES	20
Reglas moleculares bifuncionales: control de la longitud del gancho/aguja y cambio en la especificidad de secreción de sustratos	20
En el flagelo: FliK y FlhB	20
En <i>Yersinia</i> : YscP y YscU	28
En <i>Shigella</i> : Spa32 y Spa40	31
En <i>Salmonella</i> : InvJ y SpaS	33
En <i>Xanthomonas</i> : HpaC y HrcU	35
HIPÓTESIS	39
OBJETIVO GENERAL	39
OBJETIVOS PARTICULARES	39
MATERIALES Y MÉTODOS	40
1. Crecimiento de cepas bacterianas	40
2. Manipulación de ADN	42
3. Producción de proteínas recombinantes	45
4. Purificación de proteínas	45
4.1 MBP-EscP	45
4.2 His-EscU _C y generación de anticuerpos	46
5. Generación de mutantes nulas en los genes <i>escP</i> , <i>escF</i> y <i>escI</i>	47

6. Ensayo de secreción	47
7. Purificación de inyectisomas	48
8. Microscopía electrónica	49
9. Ensayo de hemólisis	49
10. Rasurado de filamentos EspA	50
11. Copurificaciones	51
12. Ensayo de doble híbrido en levadura	52
13. Ensayos de nado en <i>Salmonella</i>	53
RESULTADOS	54
1. Análisis bioinformático de EscP y EscU	55
2. Purificación de proteínas y producción de anticuerpos	59
3. EscP regula la secreción de translocadores y efectores	66
4. EscP regula la longitud de la aguja del inyectisoma de EPEC	73
5. EscP contribuye en el proceso de ensamblaje del inyectisoma	77
6. EscP es un sustrato que se secreta por el SST3 y regula la secreción de la proteína que forma el eje interno	80
7. EscP interacciona con múltiples componentes del SST3	82
7.1. EscP interacciona con la región carboxilo de EscU	82
7.2. EscP interacciona con los sustratos tempranos EscF y EscI	85
7.3. EscP interacciona con la chaperona de multi-efectores CesT	87
8. EscP tiene efecto multicopia sobre el nado de <i>Salmonella enterica</i>	89
9. Orf16 de <i>Citrobacter rodentium</i> cumple la misma función que EscP	90
DISCUSIÓN	93
CONCLUSIONES	108
PERSPECTIVAS	109
ANEXO I	111
ANEXO II	117
ANEXO III	119
REFERENCIAS	120

A B R E V I A T U R A S

A/E	Adherencia y esfacelamiento
Aa	Aminoácido(s)
Arp 2/3	<i>Actin-related protein2/3</i>
BFP	<i>Bundle forming pilus</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CR	<i>Citrobacter rodentium</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
EAF	<i>EPEC adherence factor</i>
EHEC	<i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>
EPEC	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
Esp	<i>EPEC secreted protein</i>
HA	Hemaglutinina
His	Histidina(s)
HGT	<i>Horizontal Gene Transfer</i>
kDa	Kilodalton
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
MBP	<i>Maltose binding protein</i>
ME	Membrana externa
MH	Membrana del hospedero
MI	Membrana interna
Nle	<i>Non-LEE encoded effector</i>
N-WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
SST3	Sistema de secreción tipo III
T3S4	<i>Type III secretion substrate specificity switch</i>
Tir	<i>Translocated intimin receptor</i>
WT	<i>Wild type</i>

R E S U M E N

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es la principal causa de diarrea en niños de países en vías de desarrollo. EPEC coloniza el intestino delgado produciendo una lesión histopatológica característica de adherencia y eliminación, denominada lesión A/E. Todos los genes necesarios para el desarrollo de la lesión A/E, incluyendo aquellos necesarios para el ensamblaje del sistema de secreción tipo III (SST3), están codificados en una isla de patogenicidad cromosomal conocida como locus de eliminación enterocítica (LEE).

El SST3 o inyectisoma es un dispositivo molecular de inyección que transfiere proteínas de virulencia directamente a la célula hospedera. El ensamblaje de un SST3 funcional es un proceso secuencial que requiere una regulación estricta. Tres conjuntos diferentes de proteínas se secretan de manera ordenada: los sustratos tempranos (subunidades del eje y aguja), sustratos intermedios (translocadores) y finalmente los sustratos tardíos (efectores). El cambio de especificidad de sustratos de tempranos a intermedios y tardíos ocurre una vez que la aguja alcanzó una longitud determinada.

En este estudio identificamos un gen del LEE de función desconocida, *orf16*. Encontramos que es sinténico a los genes *yscP*, *spa32*, *invJ* y al gen flagelar *fliK*. Reportamos que en una cepa nula en *orf16*, se disminuye drásticamente la secreción de translocadores mientras se incrementa la de los efectores. Un análisis de secreción reveló que Orf16 se secreta y que regula la secreción de la proteína del eje, EscI. La mutante en *orf16* forma un menor número de inyectisomas completamente ensamblados, los cuales tienen agujas largas con filamento que causan poca hemólisis de eritrocitos. Además, reportamos que Orf16 interacciona con múltiples componentes del SST3 (EscU_C, EscF, EscI y CesT). En conjunto, nuestros resultados demuestran que Orf16 es una proteína bifuncional que actúa midiendo la longitud de la aguja y como parte de un *switch* molecular de manera similar a los miembros de las familia YscP/FliK. De acuerdo con los resultados de este trabajo decidimos renombrar esta proteína como EscP.

A B S T R A C T

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a major cause of infant diarrhea in developing countries. EPEC colonizes the small intestine producing a characteristic histopathology known as attaching and effacing (A/E) lesion. All the genes needed for the development of the A/E lesion, including those needed for type III secretion system (T3SS) assembly, are encoded on a chromosomal pathogenicity island known as the locus of enterocyte effacement (LEE).

The T3SS or injectisome is an injection device that can transfer bacterial virulence proteins directly into host cells. The assembly of a functional T3SS is a sequential process that requires tight regulation. Three distinct sets of proteins are secreted in an orderly manner: the early substrates (inner rod and needle subunits), then the middle substrates (translocators), and finally the late substrates (effectors). The substrate specificity switch from early to middle and late substrates (translocators and effectors) occurs once the needle has reached its full length.

In this study, we identified a LEE open reading frame of unknown function, *orf16*, which is syntenic to *yscP*, *spa32*, *invJ*, and to the flagellar *fliK* gene. We report that an in-frame deletion of *orf16* resulted in a reduced secretion of translocators and increased secretion of effectors. Analysis of protein secretion revealed that Orf16 is a T3SS-secreted substrate and regulates the secretion of the inner rod component, EscI. The *orf16* null strain showed a reduced the number of fully assembled T3S structures that have abnormally long needles and filaments, and caused weak hemolysis of red blood cells. Furthermore, Orf16 interacts with several T3 components (EscU_C, EscF, EscI and CesT). Overall, our results suggest that Orf16 is a bifunctional protein that acts as a molecular measuring device and as molecular switch in a way similar to that of members of the YscP/FliK protein family. Therefore, we renamed this protein EscP.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es el principal organismo anaerobio facultativo de la biota microbiana que reside en el colon humano. Coloniza al hospedero desde el nacimiento con una o dos cepas que residen de manera permanente en el intestino y establecen una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida. Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* se han relacionado con una gran variedad de enfermedades tanto en animales como en humanos. Existen ocho patotipos¹ de patógenos de humanos, cuyos mecanismos de infección han sido ampliamente estudiados (Figura 1) (Matsuzawa, Kuwae et al. 2005; Croxen and Finlay 2010).

- Patovares extraintestinales:

E. coli uropatógena (UPEC)

E. coli causante de meningitis

neonatal (NMEC)

- Patovares diarreagénicos:

E. coli enterohemorrágica (EHEC)

E. coli enterotoxigénica (ETEC)

E. coli enteroinvasiva (EIEC)

E. coli enteroagregativa (EAEC)

E. coli de adherencia difusa (DAEC)

E. coli enteropatógena (**EPEC**)

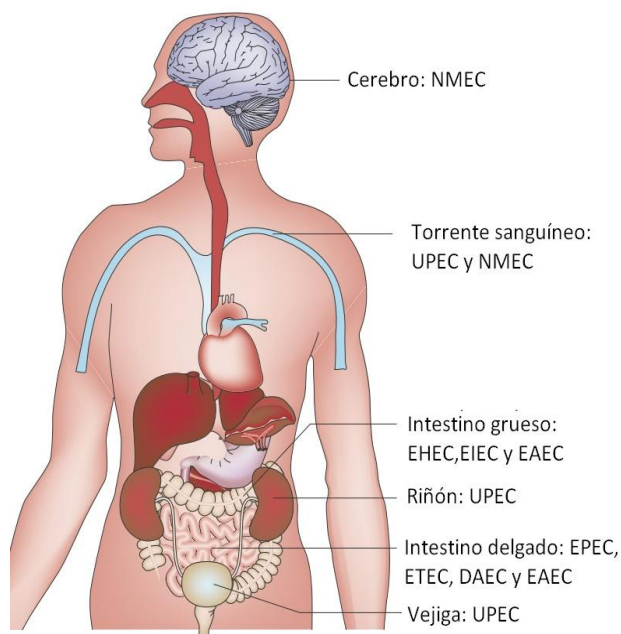


Fig. 1 Patotipos patógenos de *E. coli*. Sitios de colonización de cepas de *E. coli* patógenas de humanos. Modificada de (Croxen and Finlay 2010).

¹ Patotipo: Grupo de cepas de la misma especie que utilizan diferentes factores de virulencia, infectando un hospedero específico y que causan diferentes enfermedades. Se usa como sinónimo de patovar. (Kaper, J. B., J. P. Nataro, et al. (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." *Nat Rev Microbiol* 2(2): 123-140.)

La pérdida y ganancia de elementos genéticos móviles juega un papel esencial en la formación de los genomas de bacterias patógenas. La transferencia horizontal de genes (HGT por *Horizontal Gene Transfer*) es un mecanismo importante que rápidamente disemina nuevos atributos a organismos receptores. La adquisición de dichos atributos es crucial para promover la adecuación y supervivencia de un patógeno mientras coevoluciona con su hospedero, así como para permitir a la bacteria colonizar nuevos nichos.

Muchos de los factores de virulencia asociados con *E. coli* patógenas han sido estudiados y recientemente se han empezado a dilucidar las interacciones claves entre las proteínas del hospedero y los factores de virulencia. Por ser el modelo de estudio en este trabajo, describo con más detalle a EPEC.

EPEC: Escherichia coli enteropatógena

A principios de los años 40's se relacionó a *E. coli* con enfermedades diarreicas en humanos, y desde entonces, a esa cepa se le denominó *E. coli* enteropatógena. Sin embargo, no fue sino hasta 1978 que Levine realizó estudios con voluntarios, demostrando que la cepa de EPEC con serotipo O127:H6 era patógena. Con base en estos estudios y muchos otros posteriores, EPEC E2348/69 O127:H6 se convirtió en la cepa prototipo (Levine, Bergquist et al. 1978; Schmidt 2010).

EPEC es la principal causa de diarrea en niños menores de 2 años, principalmente en países en vías de desarrollo (Kaper, Nataro et al. 2004). Este patovar pertenece a una familia de patógenos que forma lesiones de adherencia y eliminación (A/E) en las células del intestino; otros miembros de la familia incluyen a EHEC, al patógeno de conejos REPEC y al patógeno de ratones *Citrobacter rodentium* (CR).

Estudios epidemiológicos realizados en países en vías de desarrollo, incluido México, han demostrado que ETEC y EPEC son dos de los principales patógenos aislados en casos de diarrea infantil (Vidal, Canizalez-Roman et al. 2007).

Modelo de infección por EPEC: Lesión A/E

EPEC induce en el intestino una histopatología característica conocida como lesión de adherencia y eliminación (A/E). La lesión es resultado de un mecanismo de virulencia complejo en el que se induce la pérdida de las microvellosidades del enterocito y se altera la morfología normal de la región apical de la célula hospedera. Basándose en estudios de adherencia *in vitro*, se ha propuesto un modelo de patogénesis de EPEC dividido en tres fases: 1) adherencia inicial, 2) inyección de efectores (vía SST3) y transducción de señales y 3) adherencia íntima y formación de pedestal² (ver video 1).

1 Adherencia inicial. Un prerequisite para el desarrollo de cualquier infección bacteriana es la localización de la bacteria en un nicho que sea adecuado para su desarrollo y la patogénesis. EPEC no permanece dispersa sobre las células que infecta sino forma microcolonias adherentes en la superficie de las células epiteliales, formando un patrón denominado adherencia localizada (AL) (Figura 2) (Scaletsky, Silva et al. 1984). La habilidad de producir el fenotipo de AL es dependiente de un plásmido de 95 kb denominado EAF (EPEC *Adherence Factor*), contenido en las cepas EPEC típicas. Una cepa curada del plásmido

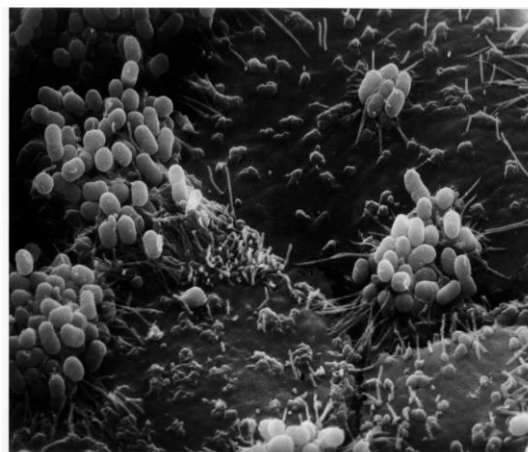


Fig. 2 Formación de microcolonias. Fotografía de microscopía electrónica de barrido mostrando el patrón de adherencia localizada (AL) por EPEC en células HEp-2. Tomada de <http://medschool.umaryland.edu/infemsd/Images.htm>

EAF (EPEC atípica) causa significativamente menos diarrea en voluntarios que la producida en aquellos infectados con la cepa EPEC típica (Levine, Nataro et al. 1985).

² Pedestal: Estructura en forma de podio característica de la lesión A/E. Se compone de proteínas del citoesqueleto del enterocito que se reorganizan durante la infección. Ver figura 7B. Goosney, D. L., M. de Grado, et al. (1999). "Putting E. coli on a pedestal: a unique system to study signal transduction and the actin cytoskeleton." *Trends Cell Biol* 9(1): 11-14.

El plásmido EAF de EPEC contiene un operón de 14 genes (*bfpA* a *bfpL*, *bfpP* y *bfpU*) necesarios para la biogénesis y función de un pilus tipo IVb (Tfp por type IV pili) denominado BFP (*Bundle Forming Pilus*) (Giron, Ho et al. 1991; Donnenberg, Giron et al. 1992; Giron, Donnenberg et al. 1993; Craig and Li 2008). El pilus BFP es un filamento homopolimérico y flexible formado por subunidades de pilina (proteína de 15-20 kDa) que sobresale de la superficie de la bacteria y puede llegar a medir varios micrómetros de longitud (Figura 3). Se ha demostrado que el BFP es importante para la adherencia inicial de la bacteria en el epitelio intestinal (Figura 4), facilita la autoagregación (los pili se agregan de manera lateral formando trenzas) (Bieber, Ramer et al. 1998; Pizarro-Cerda and Cossart 2006), formación de biopelícula (Ramboarina, Fernandes et al. 2005) e incluso se ha propuesto que el BFP juega un papel importante en la adherencia dependiente del tipo celular (Tobe and Sasakawa 2002).

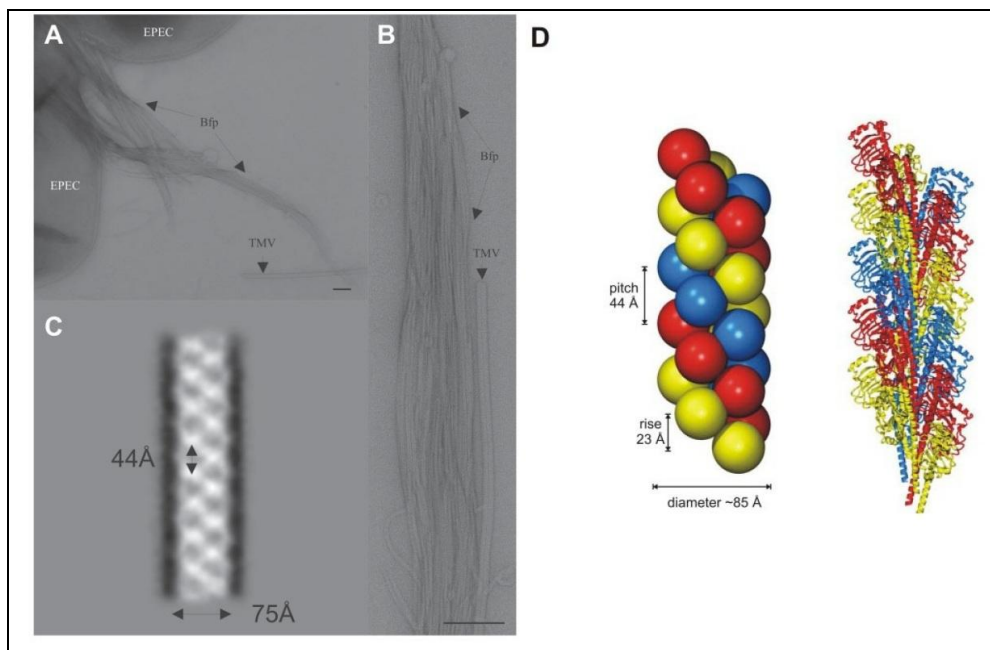


Fig. 3 Fotografías de microscopía electrónica del BFP expresado por EPEC. (A) Células de EPEC teñidas negativamente, donde las flechas señalan los pilus (BFP). (B) Pilus alineados a mayor magnificación. (C) Imagen que muestra el patrón helicoidal y el diámetro del pilus. El virus del mosaico del tabaco (TMV) se usó como estándar de calibración. Las barras representan 200 nm. (D) Modelos del BFP por resolución atómica. Se representa el filamento BFP formado de 3 hélices (azul, amarilla y roja), con cada subunidad como una esfera (izquierda) o representada como listón (derecha). Tomadas de (Ramboarina, Fernandes et al. 2005).

Recientemente se ha demostrado que el pilus es una fimbria retráctil, que una vez que la bacteria hizo contacto con la célula hospedera, las subunidades de pilina (BfpA o bundlina)

se despolimerizan para facilitar el contacto de la bacteria con el epitelio, y así hacer más eficiente la translocación de efectores o proteínas de virulencia (Zahavi, Lieberman et al. 2011).

Se ha demostrado que la adherencia localizada de EPEC en el intestino, se inicia con la interacción entre la bundlina del BFP y un receptor que contiene N-acetil lactosamina (LacNAc) (Vanmaele, Heerze et al. 1999; Tobe and Sasakawa 2002; Hyland, Sun et al. 2008; Humphries, Griener et al. 2010). También se han reportado otras moléculas como candidatos a receptores de EPEC, como la fosfatidiletanolamina (PE) (Barnett Foster, Philpott et al. 1999) y los glucolípidos Gg3 y Gg4 (Jagannatha, Sharma et al. 1991). Es probable que todos o algunos de estos factores celulares estén involucrados en la unión específica de EPEC al intestino humano (Tobe and Sasakawa 2002).

Se ha reportado que el flagelo, el pilus común de *E. coli* (ECP) y el filamento EspA (que forma parte del SST3) están también directamente involucrados en la adherencia de EPEC a células humanas (Figura 4) (Giron, Torres et al. 2002; Cleary, Lai et al. 2004; Torres, Zhou et al. 2005; Saldana, Erdem et al. 2009). Otra adhesina que participa en la adhesión es LifA, ya que se ha demostrado que una mutante en el gen que codifica a esta proteína reduce la adhesión (Torres, Zhou et al. 2005).

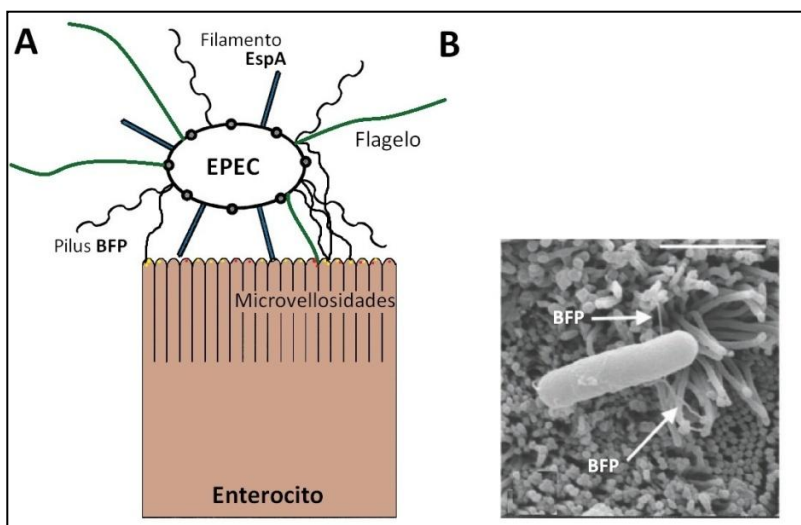


Fig. 4 Adherencia inicial. (A) EPEC utiliza diferentes adhesinas para unirse al epitelio intestinal. Modificada de (Clarke, Haigh et al. 2003). (B) Fotografía de microscopía de barrido mostrando la adhesión de EPEC a células Caco-2 y señalando los pilus BFP. La barra representa 1 μm . Tomada de (Cleary, Lai et al. 2004).

La adherencia de las bacterias patógenas a la célula hospedera es indispensable para obtener soporte para futuras interacciones que lleven al establecimiento de la enfermedad. El hospedero tiene muchas barreras innatas para impedir la colonización. Entre estas están

la desecación, acidez, las mucosidades, enzimas y péptidos antimicrobianos, la peristalsis, exfoliación celular y la biota intestinal (Nougayrede, Fernandes et al. 2003), por lo que es de suma importancia la estrategia utilizada por EPEC para la colonización inicial del epitelio intestinal.

2 Translocación de efectores y transducción de señales. Una vez adherida, EPEC induce e interfiere con una variedad de vías de señalización en la célula eucarionte. Los genes responsables de esta actividad están codificados en una isla de patogenicidad denominada locus de esfacelamiento enterocítico (LEE) (más adelante explicado a detalle). El LEE codifica los genes necesarios para el ensamblaje de un sistema de secreción tipo 3 (SST3), proteínas de virulencia (efectores) que son secretadas a través del SST3, reguladores transcripcionales, así como una adhesina de membrana externa necesaria para la virulencia, llamada intimina (Nataro and Kaper 1998). La intimina está codificada por el gen *eaeA*, y mutantes en este gen no forman el patrón de adherencia íntima (Rosenshine, Ruschkowski et al. 1996; Kenny, DeVinney et al. 1997).

EPEC transloca al citoplasma de la célula eucarionte vía el SST3 un amplio repertorio de efectores que alteran numerosos procesos celulares dentro del enterocito y que causan: rearrreglos en el citoesqueleto, afectando la integridad de las uniones estrechas, modulando el sistema inmune, alterando la secreción de iones, modificando la homeostasis en organelos, bloqueando el ciclo celular; todo esto contribuyendo a la diarrea, evitando la fagocitosis y promoviendo la dispersión de la bacteria (Figura 5 y Anexo I) (DeVinney, Gauthier et al. 1999; Kenny, Ellis et al. 2002; Dean, Maresca et al. 2005; Hardwidge, Deng et al. 2005; Tomson, Viswanathan et al. 2005; Croxen and Finlay 2010; Ham, Sreelatha et al. 2011).

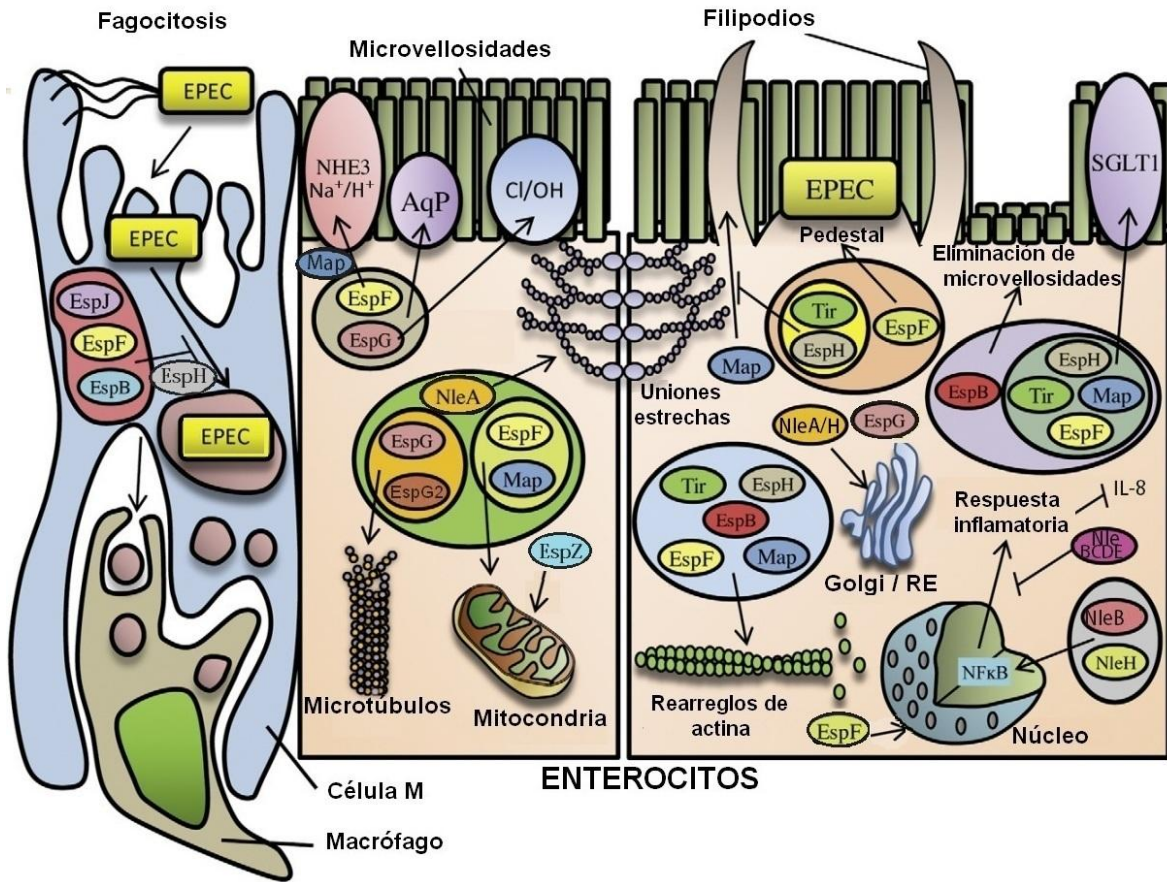


Fig.5 Vías de señalización y procesos celulares afectados por la infección de EPEC. Complejidad en la función de los efectores translocados al enterocito. Modificada de (Dean and Kenny 2009).

3 Adherencia íntima y formación de pedestal. EPEC utiliza el SST3 (descrito a detalle más adelante) para translocar su propio receptor de intimina, Tir (*Translocated intimin receptor*), hacia la superficie de la célula hospedera (Kenny, DeVinney et al. 1997). Tir posee dominios transmembranales y se inserta en la membrana de la célula eucarionte adoptando una estructura de tallo-asa. La región entre los dos dominios transmembranales forma un asa extracelular que funciona como dominio de unión a intimina, mientras que las regiones amino (N) y carboxilo (C) permanecen del lado citoplásmico de la célula hospedera (Figura 6).

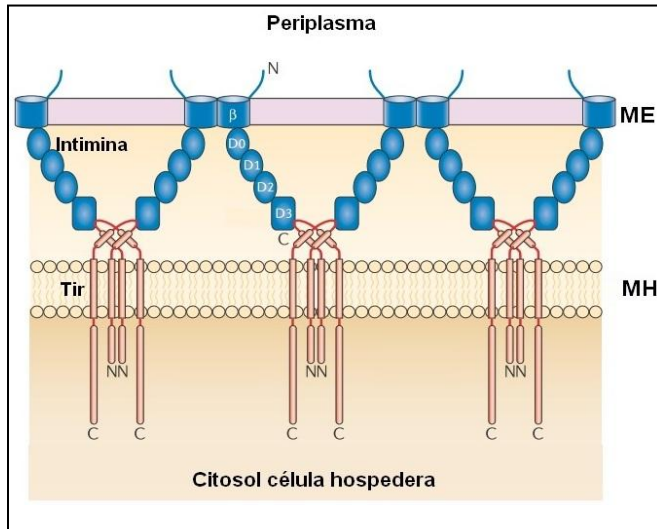


Fig. 6 La intimina induce el agrupamiento de Tir en la membrana del hospedero. En azul se representa a la adhesina intimina localizada en la membrana externa (ME) de EPEC. Tir se inserta en la membrana del hospedero (MH) e interactúa con la intimina en su dominio extracelular. Las porciones amino (N) y carboxilo (C) de Tir permanecen en el citosol. Modificada de (Hayward, Leong et al. 2006).

Una vez translocado e insertado en la membrana del hospedero, Tir interactúa con la intimina, se agrupa y es fosforilado por tirosin-quinasas del hospedero (como: Fyn, Abl, Arg y Etk) en el residuo de tirosina 474 (Y474), localizado en el dominio C de la proteína y también, en menor medida en la tirosina 454 (Y454) (Figura 7A) (Kenny 1999; Frankel, Phillips et al. 2001; Campellone, Rankin et al. 2004; Phillips, Hayward et al. 2004; Hayward, Leong et al. 2006; Swimm and Kalman 2008; Campellone 2010). La interacción Tir-intimina lleva a la adherencia íntima entre la bacteria y el enterocito (10 nm de separación). El aminoácido Y474 fosforilado y los residuos que lo flanquean, unen a la proteína adaptadora Nck (a través de su dominio SH2), que es un activador de la vía de polimerización de actina en células de mamífero (Figura 7A) (Gruenheid, DeVinney et al. 2001; Campellone, Giese et al. 2002; Campellone 2010). El reclutamiento de Nck por Tir es un paso esencial en la formación de la lesión A/E y se ha demostrado que la sola agrupación del carboxilo de Tir (promovida por la interacción con la intimina) es suficiente para generar una cascada de señalización dependiente de Nck (Campellone, Rankin et al. 2004). Más recientemente se ha sugerido que la actividad de Tir va más allá de reclutar a Nck para modular la polimerización de actina y formar pedestales, ya que se ha visto que EPEC puede reclutar a la proteína N-WASP (*Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*) y formar pedestales en células que carecen de Nck; sugiriendo que Tir pudiera tener blancos auxiliares que afecten la dinámica de la actina (Campellone 2010).

NcK contiene dominios (SH3) que promueven el reclutamiento del factor N-WASP, y esa interacción es suficiente para estimular la nucleación de actina dependiente del

complejo Arp2/3 (*Actin-related protein 2/3 complex*), que es un grupo de siete proteínas que actúan colectivamente para generar nuevos filamentos de actina (Figura 7A) (Rohatgi, Nollau et al. 2001; Hayward, Leong et al. 2006; Campellone 2010). Esto lleva a numerosas alteraciones en el citoesqueleto del enterocito en el sitio de adhesión de la bacteria, generando estructuras especializadas ricas en actina, conocidas como pedestales (Figura 7B-C) (Goosney, DeVinney et al. 2000; Lin and Guttman 2012).

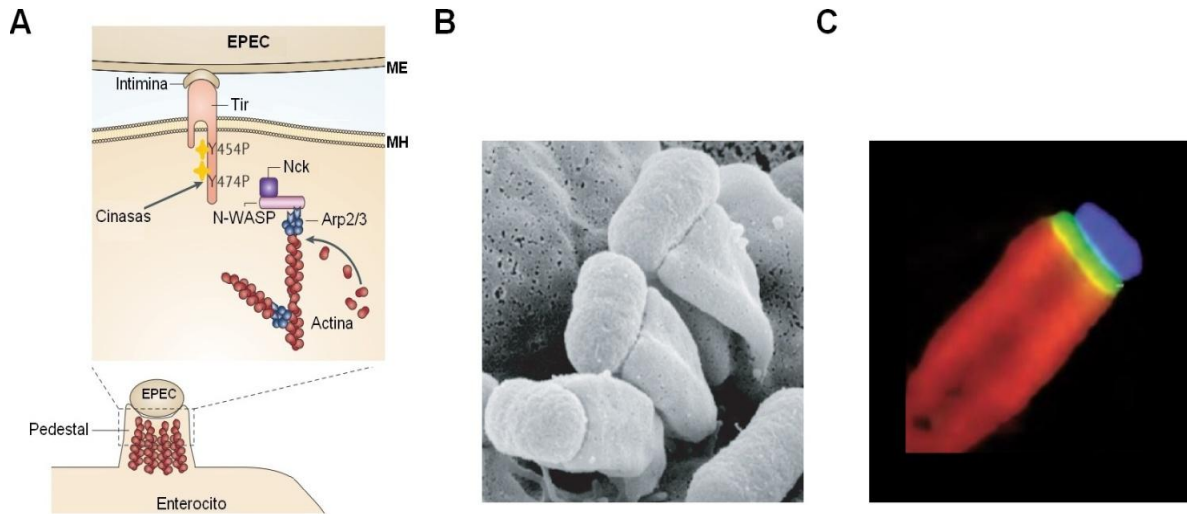


Fig. 7 Formación del pedestal. (A) Cascada de señalización provocada por la interacción Tir-intimina. La fosforilación de Tir (estrellas amarillas) en los residuos de tirosina (Y454 y Y474) genera un sitio de unión para Nck que activa a N-WASP, el cual estimula al complejo de polimerización de actina Arp2/3. La acumulación de actina debajo del sitio de adhesión de EPEC, lleva a la formación de estructuras denominadas pedestales. Modificada de (Hayward, Leong et al. 2006). (B) Fotografía de microscopía electrónica de barrido donde se observan los pedestales sobre los cuales permanece adherida EPEC. Tomada de (Pizarro-Cerda and Cossart 2006). (C) La triple tinción por inmunofluorescencia muestra a la bacteria (azul), a la proteína Tir (verde) y al pedestal compuesto de F-actina (rojo). Tomada de (Hayward, Leong et al. 2006).

Aunque la función biológica del pedestal aún se está estudiando, se ha propuesto que podría tener varias; es posible que la adherencia íntima al epitelio haga a la bacteria más resistente a despegarse con el flujo producido por la diarrea, que facilite la colonización (evitando defensas del hospedero) o como mecanismo antifagocítico (Campellone 2010). Existe también la propuesta de que el pedestal es lo menos importante de la infección, que mecanismos como la adherencia a la mucosa y la eliminación de las microvellosidades, que garantizan la adherencia íntima de la bacteria a la superficie, pueden ser los

acontecimientos fundamentales que le dan a EPEC una ventaja adaptativa (Frankel and Phillips 2008).

Se ha visto que los dominios citoplásmicos de Tir (en especial el amino), se unen a otros componentes del citoesqueleto, como a las proteínas de adhesiones focales: α -actinina, talina y vinculina, y dichas proteínas se han encontrado reclutadas como parte de los pedestales (Campellone, Rankin et al. 2004). Recientemente se demostró que EPEC es un patógeno que permanece extracelular ya que Tir no es ubiquitinado, tal y como sucede con los receptores de las células hospederas de patógenos invasivos (Lin and Guttman 2012).

Una característica importante, resultado de la adherencia de la bacteria y los dramáticos cambios en el citoesqueleto de la célula hospedera, es también el esfacelamiento de las microvellosidades del enterocito (Thomas, Deng et al. 2007). Ya que en los pedestales se ha encontrado a una proteína que forma parte de las microvellosidades (ezrina), existe la propuesta de que los pedestales, en parte (ya que se reclutan muchas otras proteínas no derivadas de las microvellosidades) se forman a partir de proteínas reabsorbidas de las microvellosidades eliminadas (Goosney, DeVinney et al. 2001).

Sistema de secreción tipo 3

El sistema de secreción tipo 3 (SST3), también conocido como inyectisoma, contribuye en la generación de numerosas enfermedades en animales, con una gran variedad de síntomas y severidades, desde la diarrea hasta la septicemia. El SST3 se encuentra tanto en patógenos de animales (*e.g. Yersinia, Salmonella, Shigella* y EPEC), como en patógenos de plantas (*e.g. Pseudomonas, Ralstonia* y *Xanthomonas*) y también en simbioses (*Rhizobium*) (Cornelis and Van Gijsegem 2000). El SST3 se encarga a su vez de la biogénesis del flagelo. Los SST3 flagelar y de virulencia son genética, estructural y funcionalmente semejantes y se propone que evolucionaron a la par a partir de un ancestro común (Blocker, Komoriya et al. 2003; Gophna, Ron et al. 2003; Macnab 2004; Erhardt, Namba et al. 2010). Recientemente, mediante un análisis filogenómico se evidenció que los

SST3 no flagelares (de virulencia y simbiontes) surgieron a partir del flagelo y que una etapa importante en la evolución fue la adquisición de las secretinas (Abby and Rocha 2012).

Para promover las interacciones con el epitelio intestinal y generar la lesión A/E, EPEC utiliza el SST3 para translocar proteínas de virulencia hacia al citoplasma de la célula hospedera (Garmendia, Frankel et al. 2005; Campellone 2010).

Como se mencionó anteriormente, los genes necesarios para el ensamblaje del SST3 se encuentran codificados en una isla de patogenicidad cromosomal llamada locus de eliminación enterocítica (LEE), la cual está presente en todos los patógenos de la familia A/E (Figura 8).

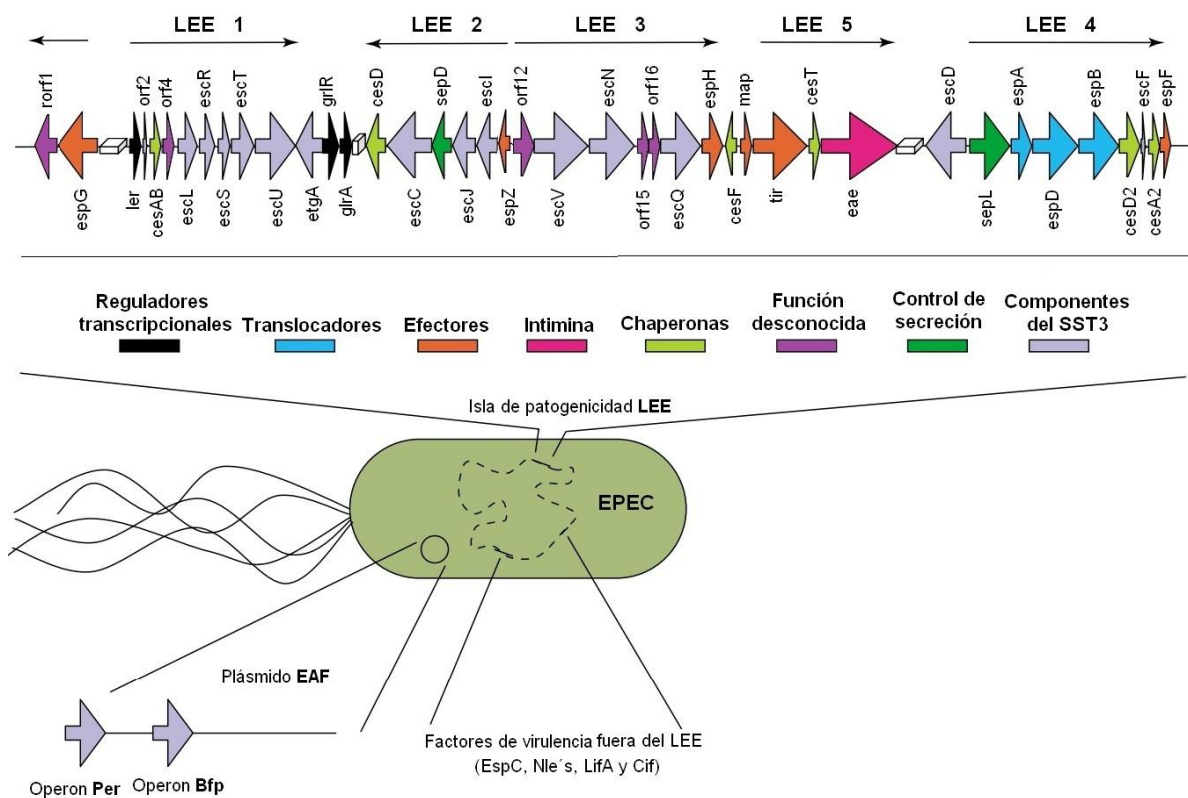


Fig. 8 Representación esquemática de los factores de virulencia de EPEC codificados en el cromosoma o en el plásmido EAF. Modificada de (Dean, Maresca et al. 2005).

Un elegante estudio demostró que la isla contiene los genes necesarios para la inducción de la lesión A/E, ya que la transferencia de la isla LEE completa hacia una cepa de *E. coli*

no patógena (K-12), le confirió la secreción de proteínas de virulencia, la alteración de las vías de señalización dentro del citoplasma de la célula hospedera y causó la lesión A/E en células eucariontes (McDaniel and Kaper 1997).

El LEE es una región de 35.4 kb, cuya composición nucleotídica G+C es ~38%, lo cual es menor comparado con el contenido G+C del resto del genoma (~50%); se encuentra insertada en el gen *selC* que codifica para el tRNA de selenocisteína (que es el mismo sitio en el que UPEC tiene una isla de patogenicidad no relacionada) (Donnenberg, Lai et al. 1997; Chandry, Gladman et al. 2012). El LEE contiene 41 genes organizados en 5 operones, así como unidades transcripcionales individuales (Figura 8) (Donnenberg, Lai et al. 1997).

En el anexo I se detalla la función de cada uno de los 41 genes de la isla LEE de EPEC, así como de algunos factores de virulencia codificados fuera del LEE.

Es claro que la transferencia horizontal de genes juega un papel importante en la evolución de las regiones asociadas a patogenicidad. Se cree que el LEE se adquirió por HGT, pero la fuente aún no se conoce (Chandry, Gladman et al. 2012).

El SST3 de EPEC consiste de aproximadamente 17 proteínas (Figura 9), tiene una masa estimada de 3.5 MDa (Schraidt and Marlovits 2011) y estructuralmente se compone de dos partes:

1) Cuerpo basal. Compuesto de 12 proteínas transmembranales, periplásmicas y citoplásmicas (EscR, S, T, U, V, C, D, J, I, Q, N, L), de las cuales 8 están altamente conservadas entre los diversos SST3 (ver Anexo II), incluyendo al flagelo, y se ensamblan para formar el aparato de exportación (Figura 9). Una característica importante es que todos los componentes del aparato de exportación, son esenciales para la biogénesis del inyectisoma y por lo tanto, para la secreción.

La secretina **EscC** (homólogos InvG de *S. enterica*, MxiD de *S. flexneri* y YscC de *Y. enterocolitica*) se exporta vía Sec, oligomeriza y forma un anillo en la membrana externa de 12 a 15 subunidades con un diámetro externo de 110 Å. Este anillo provee un canal de salida para las proteínas y sirve de interfase o conexión con otros componentes del cuerpo

basal como las proteínas que forman el anillo MS (EscD y EscJ) a través de un dominio amino periplásmico, actuando así, como un centro de nucleación (Spreter, Yip et al. 2009; Diepold, Wiesand et al. 2011; Kosarewicz, Konigsmailer et al. 2012).

La proteína **EscJ** (homólogos PrgK de *S. enterica*, MxiJ de *S. flexneri* y YscJ de *Y. enterocolitica*) se exporta vía Sec y forma un anillo en la membrana interna que se predice está formado de 24 subunidades con un diámetro externo de 170 Å. La proteína se encuentra posicionada hacia la cara periplásmica de la membrana interna y anclada a esta por su amino terminal de lipidación (Yip, Kimbrough et al. 2005; Spreter, Yip et al. 2009; Kosarewicz, Konigsmailer et al. 2012).

La proteína **EscD** (homólogos PrgH de *S. enterica*, MxiG de *S. flexneri* y YscD de *Y. enterocolitica*) se exporta vía Sec, consiste de un dominio amino citoplásmico y un dominio carboxilo periplásmico que forma un anillo de 18 a 24 subunidades concéntrico al anillo EscJ. EscD es necesaria para que la secretina se conecte con EscJ (Spreter, Yip et al. 2009; Kosarewicz, Konigsmailer et al. 2012).

La proteína **EscQ** (homólogos SpaO de *S. enterica*, Spa33 de *S. flexneri* y YscQ de *Y. enterocolitica*) forma una estructura homóloga al anillo C flagelar, se localiza en la base del aparato mediante su interacción con EscD y EscJ. Forma un complejo con las proteínas EscN y EscL (Biemans-Oldehinkel, Sal-Man et al. 2011). Por estudios de las proteínas Spa33 y SpaO, se pueden inferir algunos sustratos con los que EscQ podría interactuar: EscP, efectores y complejos sustrato-chaperona. Se propone que el complejo de proteínas asociadas a la ATPasa junto con EscQ actúa como plataforma de clasificación/selección de sustratos (Morita-Ishihara, Ogawa et al. 2006; Diepold, Amstutz et al. 2010; Lara-Tejero, Kato et al. 2011).

Las proteínas **EscR**, **EscS** y **EscT** son proteínas transmembranales exportadas vía Sec, que se ensamblan en la membrana interna y forman parte del aparato de exportación y aunque algunas contienen dominios citoplásmicos (EscR) y periplásmicos (EscR y EscS), su función, aparte de ser componentes estructurales del aparato de secreción, aún se desconoce (Moraes, Spreter et al. 2008; Berger, Robin et al. 2010; Worrall, Lameignere et al. 2011).

La proteína **EscV** (homólogos InvA de *S. enterica*, MxiA de *S. flexneri* y YscV de *Y. enterocolitica*) se exporta vía Sec, es un componente embebido en la membrana interna y forma parte del aparato de exportación. Contiene en su porción amino 8 cruces transmembranales y un dominio carboxilo citoplásmico muy grande que consiste de cuatro dominios estructurales, y se ha sugerido que podría ser el único componente del aparato de exportación que oligomeriza (Diepold, Wiesand et al. 2011).

Recientemente se cristalizó la región citoplásmica del homólogo MxiA en *S. flexneri*, y encontraron que forma un anillo de 9 subunidades con 110-170 Å de diámetro externo, un grosor/ancho de 55 Å y con un poro de 50 Å de diámetro. Demuestran que la naturaleza de la cara interna del poro del anillo es importante para la

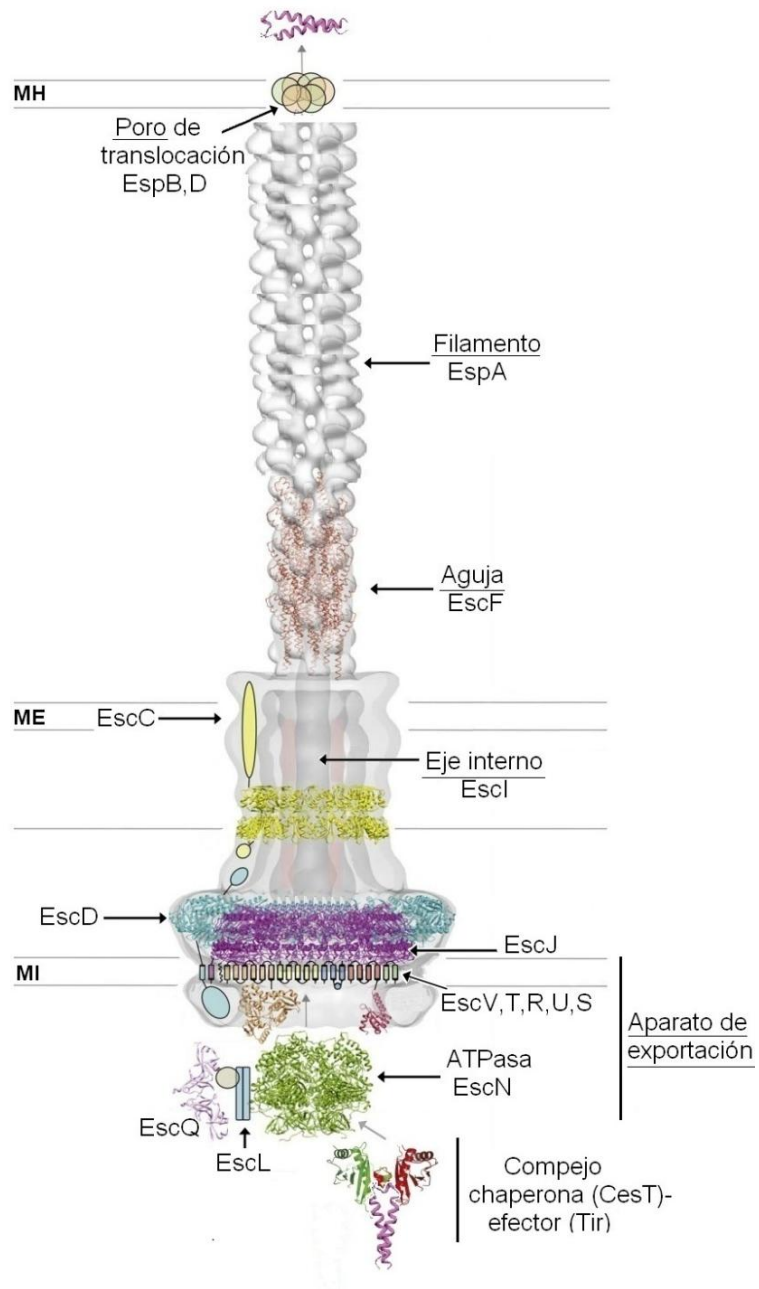


Fig. 9 Representación esquemática del inyectisoma de EPEC. La posición y modelado de las proteínas está representada de acuerdo a estudios en proteínas homólogas en los SST3 de *Salmonella* y *Shigella*. MI: membrana interna, ME: membrana externa y MH: membrana del hospedero. Modificada de (Worrall, Lameignere et al. 2011).

secreción de sustratos (Abrusci, Vergara-Irigaray et al. 2013).

La proteína **EscU** (homólogos SpaS de *S. enterica*, Spa40 de *S. flexneri* y YscU de *Y. enterocolitica*) posee 4 cruces transmembranales que se insertan en la membrana interna y un dominio grande citoplásmico que se autoprocesa, es parte del aparato de exportación y contribuye en la jerarquía de secreción de sustratos. Por ser una proteína de interés en este trabajo, se describirá detalladamente más adelante (Diepold, Wiesand et al. 2011).

La proteína **EscN** (homólogos InvC de *S. enterica*, Spa47 de *S. flexneri* y YscN de *Y. enterocolitica*), forma una ATPasa hexamérica, relacionada a la F₁-ATPasa (Andrade, Pardo et al. 2007; Zarivach, Vuckovic et al. 2007). La actividad de la ATPasa se regula negativamente por su asociación con la proteína **EscL**.

La proteína **EscI** (homólogos PrgJ de *S. enterica*, MxiI de *S. flexneri* y YscI de *Y. enterocolitica*) polimeriza para formar un eje interno, que es esencial para la secreción de proteínas, funcionando como un canal de conexión entre la aguja y el centro del cuerpo basal. Se ha reportado que EscI interacciona con EscU y con EscC. Recientemente, estudios en PrgJ sugieren que la proteína es flexible y demostraron que el residuo Tyr-77 localizado en una hélice en la porción carboxilo juega un papel crítico en el ensamblaje del inyector (Sal-Man, Deng et al. 2012; Zhong, Lefebvre et al. 2012).

2) Componentes extracelulares. La aguja es un homopolímero helicoidal de más de 100 subunidades de una proteína pequeña (**EscF**, 8 kDa), y dicha estructura sobresale de la membrana externa de la bacteria y establece un túnel necesario para la secreción de proteínas. La aguja de EPEC tiene una longitud de 40-50 nm, un diámetro externo de 8 nm y uno interno de 2.5 nm. El ensamblaje de la aguja ocurre en dos pasos: nucleación y elongación, su polimerización ocurre hacia el extremo distal (Wilson, Shaw et al. 2001; Poyraz, Schmidt et al. 2010; Kosarewicz, Konigsmair et al. 2012).

Se ha determinado la estructura de los homólogos a EscF, MxiH de *S. flexneri* (Deane, Roversi et al. 2006), BsaL de *Burkholderia* (Zhang, Wang et al. 2006) y PrgI de *S. enterica* (Wang, Ouellette et al. 2007), y las tres estructuras revelaron a la proteína que conforma la

aguja como un “*coiled-coil*”³ formado por dos hélices unidas por un giro de 6 residuos (Blocker, Deane et al. 2008). Para EscF sólo se ha visto que interacciona con EspA (Wilson, Shaw et al. 2001). Para los homólogos YscF de *Y. enterocolitica* y PscF de *Pseudomonas* se han identificado y cristalizado en complejo, una chaperona y una co-chaperona YscG/YscE y PscG/PscE, respectivamente y se demostró que su función es prevenir la polimerización prematura de la aguja (Quinaud, Chabert et al. 2005; Quinaud, Ple et al. 2007; Sun, Tropea et al. 2008; Ple, Job et al. 2010).

Recientemente se propuso que la polimerización de la aguja es necesaria para abrir la secreción desde la secretina, ya que en ausencia de la aguja, los sustratos se acumulan en el periplasma (Diepold, Wiesand et al. 2012).

EPEC, al igual que *Bordetella* spp., posee un filamento que se polimeriza a partir de la punta de la aguja y se conforma por miles de subunidades de la proteína **EspA** (Blocker, Deane et al. 2008; Medhekar, Shrivastava et al. 2009). El filamento tiene una longitud variable (60-700 nm), un diámetro externo de 12 nm y un canal interno de 2.5 nm (Sekiya, Ohishi et al. 2001; Daniell, Kocsis et al. 2003). La formación del filamento EspA es indispensable para la formación del poro y para la translocación de proteínas (Shaw, Daniell et al. 2001).

Se propone que una de las funciones del filamento es la de detectar el contacto con la célula hospedera y activar la secreción de las proteínas translocadoras hidrofóbicas (**EspB** y **EspD**) que se insertan directamente en la membrana del enterocito para formar un poro de 25 Å (Blocker, Deane et al. 2008). Inicialmente se había descrito la interacción EspB-EspD y recientemente se describió la interacción EspA-EspD, sin embargo no se

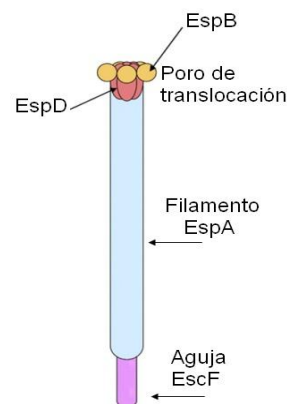


Fig. 10 Representación de la aguja, filamento y poro de translocación del SST3 de EPEC. Modificada de (Luo and Donnenberg 2011).

³ Coiled-coil: Es un motivo estructural formado por dos o más α -hélices yuxtapuestas. A menudo, estas dos hélices interactúan entre sí mediante cadenas laterales de leucina. Se ha descrito que estos dominios son comunes e importantes para la función de las proteínas de los SST3. Knodler, L. A., J. A. Ibarra, et al. (2011). "Coiled-coil domains enhance the membrane association of Salmonella type III effectors." *Cell Microbiol* **13**(10): 1497-1517.

ha encontrado un complejo en el que las tres proteínas translocadoras interaccionen al mismo tiempo y tampoco se ha observado la interacción EspA- EspB. Se propuso un orden de interacción entre los translocadores en el cual, EspA interacciona con EspC y con EspD, EspD interacciona con EspA y con EspB y finalmente EspB interacciona sólo con EspD (Figura 10) (Luo and Donnenberg 2011).

Existen varios modelos que tratan de explicar cómo, una vez que hay contacto con la célula hospedera, la señal se transmite a través del SST3 para activar la secreción de proteínas desde el citoplasma de la bacteria. El primero propone que la punta de la aguja (llamada “tip” en inyectisomas que no poseen filamento, pero las proteínas que los forman son homólogas) sufre cambios estructurales con el contacto y que podría tener una conformación abierta o cerrada, y que ese cambio activa la secreción. Esta hipótesis se refuerza en el hecho de que en *S. flexneri*, se han encontrado a los translocadores IpaD e IpaB en la punta del inyectisoma ensamblado y se ha propuesto que podrían adoptar conformaciones como un poro abierto o cerrado, por lo tanto, es posible que un cambio en la porción extracelular y más distal del aparato es lo que active la secreción. Otras evidencias apoyan un segundo modelo basado en mecanismos de compuerta desde el citoplasma bacteriano (o desde la cara citoplásmica de la membrana interna). Este modelo se basa en la función que tienen complejos proteicos (familia de proteínas YopN/TyeA), que se activan por señales endógenas (cambios de pH o en la concentración de iones) y que actúan como represores selectivos o activadores de la secreción de cierta clase de sustratos, sirviendo como reguladores de la jerarquía de secreción. El tercer modelo propone que la aguja juega un papel activo en transmitir la señal al contacto con la célula hospedera, generando cambios estructurales a lo largo de sus subunidades que llegan hasta la base del inyectisoma (Blocker, Deane et al. 2008).

El ensamblaje del inyectisoma y la secreción de proteínas ocurren de manera secuencial y son procesos altamente regulados y coordinados. Diferentes estudios han demostrado que los anillos de las membranas interna y externa de la bacteria, se ensamblan de manera independiente (Figura 11).

La rama de ensamblaje en la membrana externa comienza con la formación del anillo de la secretina (EscC), a lo cual procede el anclaje de EscD y EscJ (Figura 11A). Por otro lado, la rama de ensamblaje en la membrana interna, que contiene al aparato de exportación, comienza con la inserción de las proteínas EscR, EscS y EscT, que promueven la oligomerización de EscV y el anclaje a EscJ (Figura 11B). Ya que ambas ramas reclutan a EscJ, se propone que esta proteína es el elemento que une a las dos subestructuras (Figura 11C). Posteriormente, se ensamblan el complejo de la ATPasa y el anillo C, completando el aparato de exportación (Figura 11D). Finalmente se permite la salida de la proteína que forma la aguja, EscF (Figura 11E) (Diepold, Amstutz et al. 2010; Wagner, Konigsmair et al. 2010; Diepold, Wiesand et al. 2011).

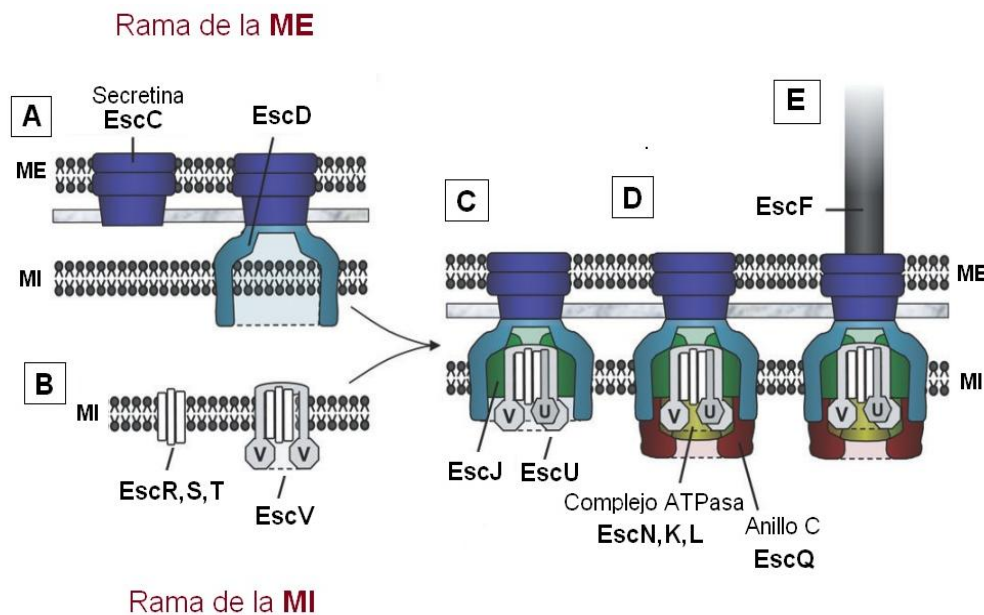


Fig. 11. Modelo de ensamblaje del cuerpo basal del inyectisoma. MI: membrana interna y ME: membrana externa bacteriana. Modificada de (Diepold, Wiesand et al. 2011).

Una vez que está ensamblada la base del SST3, los sustratos son secretados en un orden secuencial. Primero los sustratos tempranos que forman el eje (EscI) y la aguja (EscF), incluyendo a la proteína reguladora de la longitud de la aguja (EscP), después los sustratos intermedios o translocadores que forman el filamento (EspA) y el poro en la membrana de la célula eucarionte (EspB y EspD) y finalmente los sustratos tardíos o efectores. Con este control en la jerarquía de secreción, se asegura que los efectores sean translocados

directamente del citoplasma de la bacteria al citoplasma del enterocito en un solo paso y sin intermediarios (Kosarewicz, Konigsmair et al. 2012).

Se han descrito complejos proteicos, denominados “*Switches*” o interruptores moleculares, encargados de regular el cambio en la especificidad de sustratos.

En los SST3 de virulencia y flagelar, un primer *switch* se encarga de regular la salida de los sustratos tempranos hasta que la aguja alcance su longitud determinada genéticamente, y entonces se permite la secreción de translocadores (sustratos intermedios). Los complejos de proteínas encargadas de regular este mecanismo son las de la familia de YscP/YscU de *Y. enterocolitica*, Spa32/Spa40 de *S. flexneri*, InvJ/SpaS de *S. enterica* y FliK/FlhB del SST3 flagelar.

En los SST3 de virulencia, un segundo *switch* se encarga de permitir la salida de sustratos intermedios y hasta que se ensamble el filamento, se haga contacto con la célula eucarionte y se forme el poro, permite la salida de los sustratos tardíos (efectores). Se han identificado varios complejos proteicos que actúan en esta etapa: SepD/SepL de los patógenos A/E (Deng, Li et al. 2005; Deane, Abrusci et al. 2010), SpiC/SsaL/SsaM de *S. enterica* SPI-2 (Yu, McGourty et al. 2010), YscB/YopN-TyeA/SycN de *Y. enterocolitica* (Day and Plano 1998; Iriarte, Sory et al. 1998; Jackson, Day et al. 1998; Ferracci, Day et al. 2004) y también se han descrito proteínas con función de *switch 2* en las que no se ha identificado la formación de complejos proteicos, MxiC de *S. flexneri* (Botteaux, Sory et al. 2009; Martinez-Argudo and Blocker 2010) e InvE de *S. enterica* SPI-1 (Kubori and Galan 2002). El fenotipo de una mutante en cualquiera de los genes que codifican para las proteínas de los complejos del *switch 2*, es el de un aumento en la secreción (hipersecreción) de proteínas efectoras. Existen diferentes modelos para tratar de explicar cómo funciona este segundo *switch*, pero el mecanismo a detalle aún se desconoce.

A N T E C E D E N T E S

Reglas moleculares bifuncionales: control de la longitud del gancho/aguja y cambio en la especificidad de secreción de sustratos

– **En el flagelo: FliK y FlhB**

El flagelo bacteriano es una máquina rotatoria impulsada por iones que permite la movilidad de las bacterias y les ha conferido ventajas adaptativas sobre organismos no móviles (Erhardt, Namba et al. 2010).

Como se mencionó anteriormente, el flagelo y el inyectisoma son estructural y funcionalmente similares. Ambos consisten de 3 subestructuras: (i) el cuerpo basal embebido en las membranas de la bacteria (ii) el gancho (SST3 flagelar) o aguja (SST3 de virulencia) que sobresalen al exterior y (iii) el filamento que se extiende a partir del gancho/aguja (Figura 12). El flagelo se ensambla de manera jerárquica, comenzando en el cuerpo basal y terminando en el filamento (Ver video 2).

El gancho actúa como una unión flexible que transmite el movimiento rotacional generado en el cuerpo basal hacia el filamento. Se ha postulado que el gancho necesita tener una longitud adecuada para su función en la movilidad de la bacteria; ya que si es muy corto no es capaz de generar suficiente ángulo de flexión, y si es muy largo no es eficiente para la transmisión del torque (Waters, O'Toole et al. 2007).

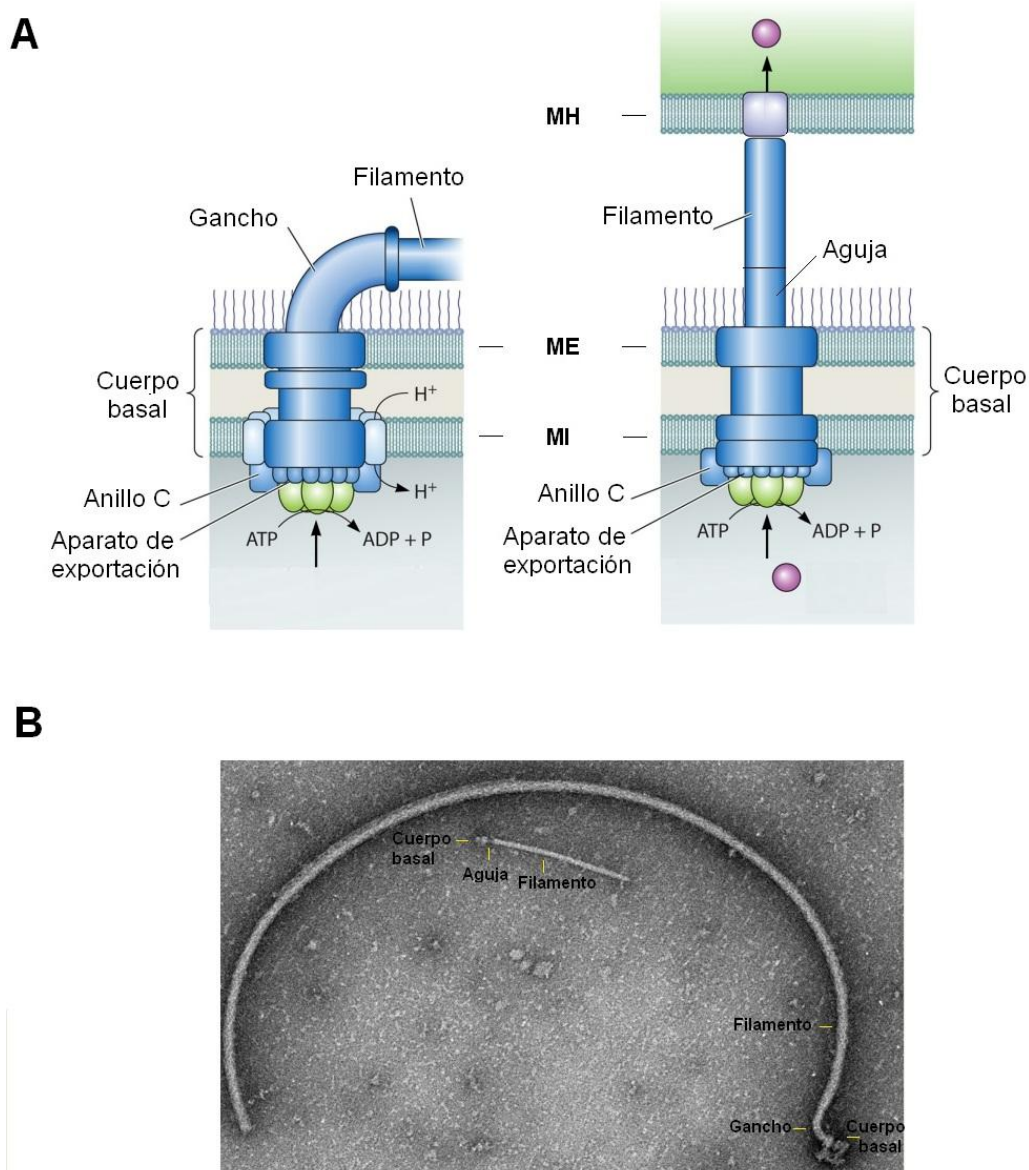


Fig.12 Sistema de secreción tipo III (A) Representación esquemática donde se muestra la similitud estructural del SST3 flagelar (izquierda) y de virulencia (derecha). Modificada de (Buttner 2012). **(B)** Fotografía de microscopía electrónica mostrando la diferencia de tamaños entre el flagelo y el inyectisoma de EPEC. Tomada por Monjarás Feria J, Universidad de Osaka, 2009.

Desde principios de los 70's se reportó que mutantes en el gen *fliK* (antes *flaR*) de *S. enterica* generan ganchos mucho más largos (de hasta 1000 nm) comparados con los de la cepa silvestre (55 nm) y que estas no ensamblan filamentos; a ese fenotipo se le denominó “poliganchos” (Patterson-Delafield, Martinez et al. 1973; Suzuki and Iino 1981).

Estudios posteriores demostraron que mutaciones en el gen *flhB* podían suprimir el defecto en la formación del filamento en un fondo Δ *fliK*, sugiriendo que ambas proteínas asisten la secreción de la flagelina (Hirano, Yamaguchi et al. 1994; Kutsukake, Minamino et al. 1994).

FliK es una proteína de 405 residuos de aminoácidos (aa) y consiste de al menos tres regiones: (i) la región amino terminal (FliK_{N1-180}) que contiene la señal de secreción (en los primeros 40 aa) y que está involucrada en la medición de la longitud del gancho; (ii) una porción conectora central rica en prolinas (FliK_{N181-205}) y (iii) una región carboxilo terminal (FliK_{C265-405}), denominada T3S4 (*Type III Secretion Substrate Specificity Switch*) involucrada en el cambio de especificidad de secreción de sustratos (*Switch*). De la región T3S4, los aa 305-350 y 400-405 son esenciales para el *switch*. Se ha encontrado que FliK_N interacciona con la proteína que forma la tapa del gancho FlgD y con la proteína del gancho FlgE, mientras que FliK_C interacciona con la porción citoplásmica de la proteína de membrana interna FlhB (Minamino, Saijo-Hamano et al. 2004; Minamino, Ferris et al. 2006; Moriya, Minamino et al. 2006). En 2011 se determinó la estructura cristalográfica de un fragmento (aa 204 al 370) de la región carboxilo de FliK, la cual consiste de dos α -hélices y cuatro hojas β (Mizuno, Amida et al. 2011).

FliK es un sustrato temprano que se secreta durante el ensamblaje del gancho y que pertenece a la misma clase de las proteínas que forman el gancho y el eje. Su señal de secreción está en los primeros 10 residuos y se calculó que se exportan de 30 a 100 moléculas de FliK por célula. Estudios preliminares mostraron que FliK es una proteína elongada, que su porción amino es importante para su secreción y que el extremo carboxilo es importante para su función de *switch* (Minamino, Gonzalez-Pedrajo et al. 1999; Minamino, Saijo-Hamano et al. 2004).

FliK controla la longitud del gancho, y una vez que este llega a su longitud óptima de 55 nm, junto con FlhB causa un cambio de especificidad en la secreción de sustratos que permite la secreción de sustratos tardíos y el ensamblaje del filamento (Minamino, Saijo-Hamano et al. 2004).

FlhB es una proteína de membrana interna que forma parte del aparato de exportación, posee una región amino que contiene cuatro cruces transmembranales y un dominio carboxilo citoplásmico de 172 aa (FlhB_{C211-383}) que se autoprocresa entre los residuos Asn-269 y Pro-270, en un motivo altamente conservado entre la familia de proteínas FlhB/YscU, denominado motivo NPTH. Como resultado de la proteólisis, el dominio carboxilo se subdivide en dos polipéptidos (FlhB_{CN} y FlhB_{CC}), los cuales interactúan entre sí aún después del corte. Se encontró que FlhB_C interactúa con FliK, y que la interacción se requiere para promover un cambio conformacional en FlhB_C, necesario para el *switch* (Minamino and Macnab 2000; Ferris, Furukawa et al. 2005). Se sabe que si FlhB no se corta, se forman poliganchos que ya no ensamblan el filamento (Fraser, Hirano et al. 2003).

También se han visto interacciones de FlhB_C con FlhA_C, FliH y con FliI (Zhu, Gonzalez-Pedrajo et al. 2002).

Con base en todos los estudios sobre FliK y FlhB, se han propuesto varios modelos para explicar cómo FliK podría estar midiendo la longitud del gancho y promover el *switch* junto con FlhB:

Copa medidora: La evidencia que llevó a plantear este modelo fue que mutantes en los genes que codifican a las proteínas que forman una estructura en forma de copa en la base del aparato (el anillo C ensamblado por FliG, FliM y FliN), producen un fenotipo de ganchos cortos. Se propuso que la longitud del gancho pudiera estar determinada por el número de subunidades de FlgE que caben en el anillo C y que una vez que son exportadas, FlhB queda libre para interactuar con FliK y mediar el *switch* (Figura 13) (Makishima, Komoriya et al. 2001)

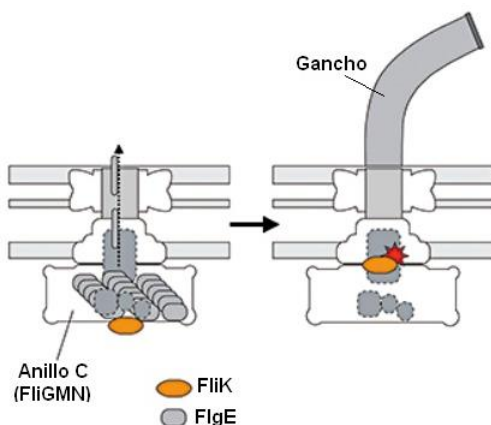


Fig. 13. Modelo de la copa medidora. El anillo C actúa como copa medidora que contiene una cantidad determinada de subunidades del gancho (FlgE en gris), que son secretadas y ensambladas. Una vez que todas las subunidades de FlgE se secretaron, FliK (en amarillo) puede interactuar con FlhB y provocar el cambio de especificidad (estrella roja). Modificada de (Erhardt, Hirano et al. 2010).

Algunos datos en contra de este modelo son: (i) que mutantes en la proteína que funciona como la tapa del gancho (FlgD) (en las cuales existe un anillo C intacto y FliK se secreta) no forman gancho; (ii) basados en las predicciones de las dimensiones del anillo C, este sólo podría contener 50 subunidades del gancho, cuando un gancho silvestre promedio está compuesto de *ca.* 130 subunidades (Waters, O'Toole et al. 2007; Erhardt, Hirano et al. 2010).

Este modelo se refutó recientemente con evidencia de que en ausencia del anillo C se ensamblan ganchos con filamento y que las proteínas que forman el anillo C no interactúan con la proteína que forma el gancho (Erhardt, Hirano et al. 2010).

Regla molecular estática: El modelo postula que FliK se secreta, FliK_N adopta una conformación elongada dentro del canal y la porción amino se une a la proteína-tapa del gancho (FlgD), favoreciendo la medición física de la longitud del gancho. Ya que FliK interactúa también con FlgE (proteína del gancho) se sugiere que dicha interacción favorece el anclaje temporal de FliK. Se propone que el carboxilo de FliK permanece en el citoplasma para poder interactuar con FlhB_C y cambiar la especificidad de secreción de sustratos (Figura 14 y ver video 3) (Moriya, Minamino et al. 2006).

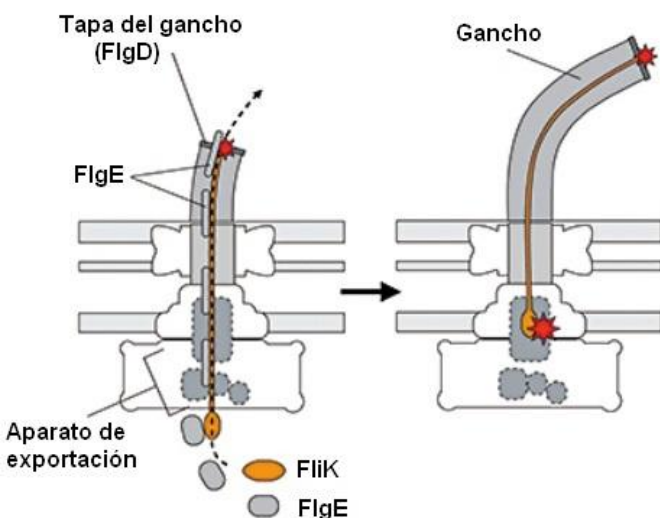


Fig. 14. Modelo de la regla molecular. Las subunidades del gancho (FlgE en gris), se secretan mientras FliK (en amarillo) se encuentra dentro del canal y anclada mediante su interacción con FlgD. Una vez que FliK está totalmente estirada interactúa con FlhB y provoca el cambio de especificidad (estrella roja). Modificada de (Erhardt, Hirano et al. 2010).

Existe evidencia experimental a favor de este modelo, ya que inserciones o ablaciones en FliK, generan ganchos más largos o más cortos, respectivamente. Está también el hecho de que bacterias con ganchos más largos, tienen proteínas FliK más largas (Shibata,

Takahashi et al. 2007; Waters, O'Toole et al. 2007). Un punto en contra de este modelo es que FliK necesitaría estirarse y medir la longitud del gancho (55 nm) más la longitud del eje, que va de la membrana interna a la externa (35 nm), y siendo que un polipéptido estirado sólo puede extenderse 0.37 nm por residuo, se necesitarían *ca.* 250 aa para abarcar los 90 nm. El amino de FliK es de 200 residuos, insuficientes para la función de regla, lo que sugiere que el modelo debe ser más flexible (Moriya, Minamino et al. 2006). Otro punto en contra de este modelo es que el canal de secreción es muy estrecho (2 nm) como para permitir la secreción de las subunidades del gancho al mismo tiempo que FliK está dentro de dicho conducto (Erhardt, Hirano et al. 2010).

Regla molecular infrecuente: Se propuso un modelo alternativo en el que FliK se secreta intermitentemente y al mismo tiempo que las subunidades del gancho. Durante su secreción, FliK toma medidas temporales de la longitud del gancho. La probabilidad de una interacción productiva de FliK_C con FlhB_C aumenta con la longitud del gancho (ya que hay interacciones más frecuentes de FliK con FlgE) y ya que la velocidad de secreción de FliK es menor cuando los ganchos son largos (Figura 15) (Moriya, Minamino et al. 2006; Erhardt, Hirano et al. 2010; Erhardt, Singer et al. 2011).

Recientemente este modelo se revalidó experimentalmente y se probó que el cambio de especificidad de sustratos se da inmediatamente después de que FliK se secreta; que la velocidad de secreción de FliK se correlaciona de manera inversa a la longitud del gancho (FliK se hipersecreta en una cepa $\Delta flgE$) y que si se expresan al mismo tiempo una versión corta y una larga de FliK, en cepas merodiploides, se producen sólo ganchos cortos controlados por la regla corta (Erhardt, Singer et al. 2011).

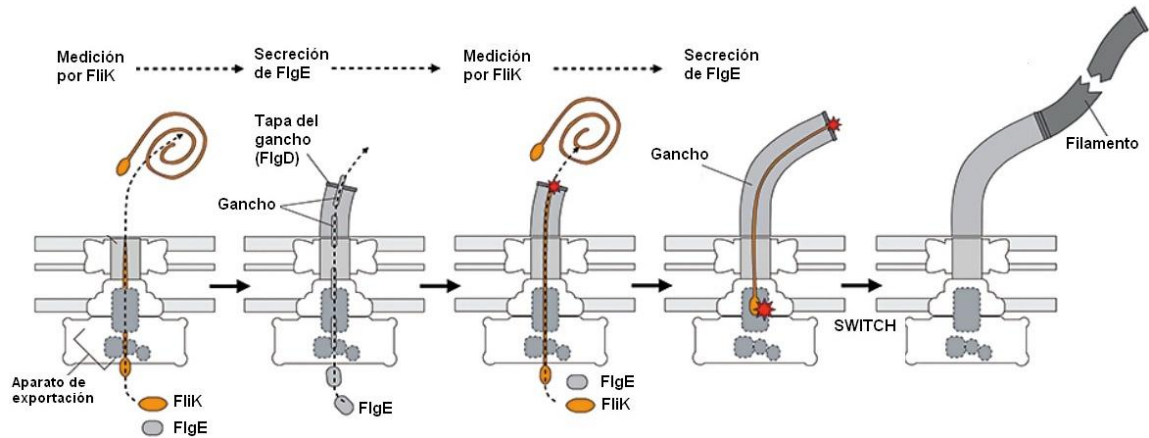


Fig. 15 Modelo de la regla molecular infrecuente. Las subunidades del gancho (FlgE en gris) y FliK (en amarillo) se secretan de manera intermitente durante el ensamblaje del gancho. Una vez que FliK está totalmente estirada, la interacción con FlgD y FlgE, provoca una pausa en su secreción, que permite que FliK interactúe con FlhB para promover el cambio de especificidad (estrella roja). Modificada de (Erhardt, Hirano et al. 2010).

A mediados del 2012, Aizawa (Aizawa 2012) criticó este modelo argumentando que no parece factible que una proteína pueda actuar tanto dentro como fuera de la célula bacteriana; que $FliK_N$ no es lo suficientemente larga como para actuar como “sensor”; que el modelo sigue sin explicar cómo FliK reconoce a un gancho de “longitud determinada” y que es improbable que FliK detecte que se alcanzó la longitud silvestre del gancho sin ser secretada. Otro argumento de Aizawa en contra de este modelo es que si en una cepa $\Delta fliK$ se sobreexpresa $FliK_C$ (que no se secreta), se restaura la longitud silvestre de los ganchos (Hirano, Shibata et al. 2005).

Reloj molecular: Este modelo propone que existe un dispositivo de temporización intrínseco que programa la maquinaria de exportación para cambiar la especificidad de sustratos, o al menos, frenar la exportación del eje/aguja. El modelo señala que FliK sí es necesaria para iniciar la secreción y ensamblaje del filamento (Moriya, Minamino et al. 2006). Hay varias evidencias que llevaron a proponer este modelo; una es que al sobreproducir a FliK se ensamblan ganchos ligeramente más cortos que en la cepa silvestre, probablemente debido a que se incrementa la probabilidad de que $FliK_C$ interactúe con $FlhB_C$; otra evidencia es que cuando se reducen los niveles de FliK se ensamblan poliganchos que ensamblan filamento, sugiriendo que existe un retardo en el *switch*. La última evidencia es que cuando se sobreexpresa FlgE se ensamblan ganchos más largos, ya que se disminuye la probabilidad de que FliK se exporte y también se retarda el cambio en

la especificidad de secreción de sustratos. Todos los fenotipos anteriores se deben a la tasa de secreción de FliK, la tasa de elongación del gancho y el tiempo en que FliK_C interacciona con FlhB_C. Otro dato importante que apoya esta hipótesis es el hecho de que en ausencia de FliK, aunque se forman poliganchos de longitudes variables, también existe una población con ganchos de longitud silvestre (55 nm) (Moriya, Minamino et al. 2006).

El ensamblaje del gancho comienza con una tasa de crecimiento muy rápida, que disminuye después de que este llega a una longitud de 55 nm. Durante el ensamblaje, sólo un pequeño número de moléculas de FliK se secretan. Cuando FliK_N está dentro del canal del gancho en crecimiento, esta región se une temporalmente a la tapa del gancho, pausando la secreción de FlgE y permitiendo que FliK_C se una a FlhB_C, ocurre un cambio conformacional en FlhB_C y se permite el cambio en la especificidad de secreción. Cuando el gancho es muy corto, FliK_C no puede interactuar de manera adecuada con FlhB_C; así que FliK se secreta y la polimerización del gancho continúa. Este modelo postula que el punto clave en el control de la longitud del gancho es la frecuencia apropiada de secreción de FliK (Moriya, Minamino et al. 2006).

Sala de espera. Este modelo, propuesto recientemente, propone que todo ocurre desde el citoplasma. Se basa en el supuesto de que las proteínas flagelares se acumulan dentro y alrededor del anillo C antes de ser secretadas. El anillo C puede actuar como punto de reconocimiento y localización para la exportación de proteínas (Aizawa 2012).

El modelo plantea que cuando el área basal está llena de subunidades de FlgD/FlgE, FliK_N no puede acceder a la puerta de secreción porque está frenada por las subunidades acumuladas en el anillo C. Cuando la cantidad de FlgD/FlgE disminuye o se vacía la base, FliK_N puede localizarse en la base y FliK_C puede interactuar con FlhB. Cuando FliK_N se secreta a través del canal, FliK_C es jalada y deja de interactuar con FlhB, lo cual hace que se dé el cambio en la especificidad de sustratos (Figura 14). En este modelo, sólo se requiere una molécula de FliK para dar el *switch* (la que está interactuando con FlhB), y las moléculas de FliK libres se secretan sin afectar el estado de FlhB (Aizawa 2012).

– En *Yersinia*: YscP y YscU

En los SST3 de virulencia, la longitud de la aguja varía entre 45 y 80 nm de acuerdo a la especie bacteriana; por ejemplo, la aguja que posee *S. enterica* es más larga que la de *S. flexneri*. Sin embargo, al igual que el gancho del flagelo bacteriano, la longitud de la aguja del inyector de patógenos de animales está rigurosamente regulada en cada especie por una proteína determinada.

YscP es una proteína de 455 aa en *Yersinia pestis* y de 515 aa en *Yersinia enterocolitica*. Es un sustrato que se secreta vía SST3 en ausencia de calcio (condición que induce la secreción de proteínas translocadoras y efectoras denominadas Yops) pero no se transloca a la célula hospedera (Payne and Straley 1999; Stainier, Bleves et al. 2000).

YscP es esencial para la secreción de Yops, ya que una mutante en el gen *yscP* no es capaz de secretar ninguna clase de sustratos (Stainier, Bleves et al. 2000); además, análisis posteriores mostraron que la cepa $\Delta yscP$ secreta una mayor cantidad de YscF (proteína que forma la aguja) que la cepa WT⁴ (Edqvist, Olsson et al. 2003).

Se sabe que YscP, en su región carboxilo, posee un dominio T3S4 (residuos 405 al 500) que se caracteriza por ser globular, con un plegamiento predicho tipo α/β y una firma P-X-L-G. Este dominio es el involucrado en el cambio en la especificidad de secreción de sustratos (Agrain, Callebaut et al. 2005).

Se encontró que una versión recombinante de YscP (YscP-GST), que bloquea la secreción, interacciona con el complejo de la ATPasa (YscN-YscL), con YscO y con la proteína que forma el anillo C (YscQ) (Riordan, Sorg et al. 2008).

YscU es un componente esencial del aparato de exportación del inyector de *Y. enterocolitica*; es una proteína que contiene cuatro cruces transmembranales y un dominio carboxilo citosólico. Es homóloga a FlhB, comparten alta identidad de secuencia (40% de identidad) y YscU, al igual que FlhB, se autoprocasa proteolíticamente en la asparagina 264

⁴ Para fines prácticos, la abreviatura WT (del inglés wild-type) se usará de aquí en adelante para hacer referencia a “silvestre”.

del motivo altamente conservado NPTH. Se demostró que mutaciones en el dominio citoplásmico de la proteína (YscU_C) son capaces de suprimir el fenotipo de la cepa $\Delta yscP$, al reducir la secreción de YscF y permitir la secreción de Yops, sugiriendo un papel conjunto de estas proteínas en la regulación de la secreción de sustratos del SST3 (Allaoui, Woestyn et al. 1994; Lavander, Sundberg et al. 2002; Edqvist, Olsson et al. 2003).

La eliminación de los cuatro aminoácidos del motivo NPTH, hacen que YscU ya no sea funcional (no hay secreción de Yops) y la proteína se corta en sitios alternativos. Sustituciones individuales del mismo dominio previenen el corte, pero aún hay secreción de Yops, sugiriendo que el corte no es necesario para la secreción (Lavander, Sundberg et al. 2002)

Un estudio posterior mostró datos opuestos, donde las sustituciones N263A y P264A, previenen el corte y ya no se secretan proteínas translocadoras pero sí efectores. Las mutantes N263A y P264A forman agujas de mayor longitud que la cepa WT, sin *tip*⁵ y son incapaces de formar poro de translocación en la membrana de la célula eucarionte. Se propuso que el corte de YscU se requiere para que la proteína adquiriera una cierta conformación capaz de reconocer a los translocadores. Se reportó que la mutante YscU_{N263A} secreta una menor cantidad de YscP, y que cuando YscP se sobreexpresa en ese fondo genético, se restaura la longitud silvestre de las agujas (Sorg, Wagner et al. 2007).

Adicionalmente, se encontró que YscU interacciona con YscL, YscK, YscQ y con YscO, pero no se logró observar ver interacción directa con YscP. Se propuso un modelo en el que YscU sin cortar se une a YscO y esta interacción recluta a YscP. Una vez que se completa el ensamblaje de la aguja, YscU se corta e interacciona con YscL. El reclutamiento del complejo YscK-YscL-YscQ podría permitir la secreción dependiente de la ATPasa (Riordan and Schneewind 2008).

⁵ Translocador hidrofílico que forma una estructura anular pentamérica que se ensambla en la punta de la aguja. Se considera la estructura homóloga al filamento EspA de EPEC y se propone que es necesaria para el ensamblaje del poro de translocación en la célula eucarionte. Formado por la proteína LcrV en *Yersinia* Mueller, C. A., P. Broz, et al. (2008). "The type III secretion system tip complex and translocon." *Mol Microbiol* **68**(5): 1085-1095..

Con la resolución de la estructura cristalográfica de YscU_C, se vio que la conformación global de la proteína no cambia considerablemente después del corte (Wiesand, Sorg et al. 2009).

Con base en todos los estudios sobre YscP y YscU, se han propuesto dos modelos para explicar cómo YscP podría estar regulando la longitud de la aguja del inyectisoma y promoviendo el *switch* junto con YscU:

Regla molecular estática. Un trabajo clave en el estudio del mecanismo de regulación de la longitud de la aguja es el de Journet y col. (Journet, Agrain et al. 2003), donde observaron que la cepa $\Delta yscP$ ensambla agujas desde 45 hasta más de 1,000 nm de longitud, demostrando que YscP juega un papel esencial en el control de la longitud de la aguja. Tomando ventaja de los diferentes tamaños de YscP en diferentes especies de *Yersinia*, hicieron trans-complementaciones de la cepa $\Delta yscP$ con YscP de *Y. pestis* (405 aa) y con YscP de *Y. enterocolitica* (515 aa). El resultado fue que al complementar con YscP de *Y. pestis* se formaron agujas más cortas que complementando con la YscP más larga. Para investigar si la reducción de la longitud se debía al tamaño de la proteína (y no por cambios en los aminoácidos) crearon diferentes versiones de *yscP* con ablaciones e inserciones, las usaron para complementar a la cepa $\Delta yscP$ y encontraron que la longitud de las agujas siempre era proporcional al tamaño de YscP. Por lo tanto concluyeron que existe una relación lineal entre el número de aminoácidos y la longitud de la aguja ensamblada (abarcando 1.9Å por residuo). Esta fue la primera evidencia que llevó a proponer el modelo en el cual la proteína YscP actúa como regla molecular. Posteriormente, el modelo se complementó con resultados que mostraron que no sólo el número de residuos, sino el contenido helicoidal de YscP se relacionan con el control de la longitud de la aguja (Wagner, Sorg et al. 2009). El modelo de la regla molecular propone que la regla se localiza dentro de la aguja en crecimiento, y basados en esta hipótesis calcularon el ancho de la regla extendida. Encontraron que el valor máximo predicho es de 1.3 nm (mínimo 0.69) y que es suficiente para permitir que YscP se acomode dentro de la cavidad de la aguja (2-3 nm) junto con subunidades secretadas de YscF (Wagner, Sorg et al. 2009).

El modelo está apoyado con resultados que mostraron que sólo se requiere una molécula de YscP para regular la longitud de la aguja. Proponen que YscP se secreta y que cuando

YscP_C hace contacto con el aparato de exportación el dominio T3S4 está en la posición correcta para cambiar la especificidad de secreción de sustratos y así detener la elongación de la aguja (Wagner, Stenta et al. 2010).

Un tema de controversia es el de cuál es la razón por la que la regla molecular se secreta. Agrain *et al.*, demostraron que la secreción de YscP es importante para su función de controlar la longitud de la aguja, pero que es dispensable para cambiar la especificidad de secreción de sustratos (Agrain, Sorg et al. 2005).

Eje como regulador de la secreción. Existe una propuesta que plantea que la formación del eje, y no el ensamblaje de la aguja, es el paso crítico para el cambio de especificidad de secreción de sustratos, y que YscP junto con YscU son las proteínas encargadas de regular la secreción de YscI y promover el correcto ensamblaje del eje (Wood, Jin et al. 2008).

– **En *Shigella*: Spa32 y Spa40**

Con la purificación de los inyectisomas de *S. flexneri*, se demostró que la aguja mide entre 45 y 60 nm de longitud y que está conformada por la proteína MxiH (Tamano, Aizawa et al. 2000; Blocker, Jouihri et al. 2001). Posteriormente se encontró que al eliminar al gen que codifica a la proteína Spa32, las agujas ensambladas eran de longitudes variables, desde 40 hasta 1,150 nm (promedio 314 nm) y que la mutante era incapaz de secretar efectores; concluyendo que Spa32 juega un papel en la regulación de la longitud de la aguja y en la secreción de proteínas (Tamano, Katayama et al. 2002; Botteaux, Sani et al. 2008).

Spa32 es una proteína de 292 aa que se secreta a través del SST3 de *S. flexneri* y la secreción es importante para su función (Magdalena, Hachani et al. 2002; Tamano, Katayama et al. 2002).

Mediante ablaciones en Spa32 se encontró que las regiones amino (aa 1-36) y carboxilo (aa160-292) son importantes para la secreción de proteínas, para la invasión y para el control de la longitud de la aguja. Con estas versiones mutantes de Spa32, se demostró que

la longitud de la aguja no es proporcional al tamaño de Spa32. Se determinó la interacción de Spa32 con Spa40 (homólogo de FlhB y YscU) y que los residuos de Spa32 involucrados en la interacción se localizan en la región carboxilo (aa 206-246). Un resultado interesante fue que la mutante $\Delta spa32$ pudo complementarse al introducir en trans a *invJ* y a *yscP* (Botteaux, Sani et al. 2008).

Muy recientemente Blocker *et. al* (Shen, Moriya et al. 2012) reportan un fenotipo diferente de la mutante $\Delta spa32$, ya que encuentran que esta cepa es capaz de secretar translocadores y un efector temprano de manera similar a la cepa WT, y que la mutante $\Delta spa32$ secreta más MxiH (proteína de la aguja) que la cepa WT. Sugieren que en ausencia de Spa32 existe un retraso en el cambio de especificidad de secreción. Reportan que en la cepa $\Delta spa32$ aunque se producen agujas más largas que en la cepa WT, estas ensamblan una menor cantidad de translocadores en la punta de la aguja y lisan sólo el 20% de eritrocitos comparado con la cepa WT (ya que ensamblan menos poro en las membranas de los eritrocitos).

Spa40 es miembro de la familia de proteínas YscU/FlhB, se predice que forma cuatro cruces transmembranales, contiene un dominio carboxilo citoplásmico grande y se sabe que este último se corta en dos subdominios que permanecen fuertemente asociados después de la proteólisis. La estructura cristalográfica reveló que el dominio NPTH se localiza en un asa que cambia de posición después del corte pero que no ocasiona rearrreglos de los dominios CC y CN con respecto al otro. Al igual que otros miembros de la familia YscU/FlhB, Spa40 juega un papel dual como elemento central de la maquinaria de exportación y como regulador de la secreción (Deane, Graham et al. 2008; Botteaux, Kayath et al. 2010).

Spa40_C interacciona con Spa32 a través de los residuos 309-342 y se encontró que mutaciones en residuos que se localizan en esa región (V320K y L310A) no ensamblan agujas y abaten la secreción de proteínas (Botteaux, Kayath et al. 2010). En este mismo trabajo se encontró que Spa40_{CC} interacciona con MxiA, MxiN y Spa33 y que Spa40_{CN} interacciona con Spa47 y MxiK. Se reportó que Spa40 Δ NPTH puede interaccionar con MxiA, MxiK y MxiN pero no con Spa32, Spa33 o Spa47, sugiriendo que el procesamiento de Spa40 define su especificidad para interaccionar con componentes del aparato de

exportación. Con estos resultados se propuso un modelo en el que (i) Spa40 cortado interacciona con MxiK y MxiN, reclutando a la ATPasa Spa47 a la base del aparato, (ii) la nueva conformación de Spa40, junto con el complejo MxiK-Spa47-MxiN, expone algunos residuos que facilitan su interacción con Spa33, (iii) la nueva configuración permite la secreción de los sustratos tempranos (MxiH y MxiI), (iv) una vez que la aguja alcanza una longitud de 50 nm, Spa32 compite con MxiN por el sitio de interacción en Spa40 y se detiene la secreción de MxiH y se permite la secreción de translocadores; (v) finalmente, un cambio conformacional en la ATPasa ocasiona el cambio de especificidad de secreción hacia efectores (Botteaux, Kayath et al. 2010).

En un estudio más reciente se observó que una mutante en el dominio NPTH (N257A) no se corta, exporta niveles silvestres de Spa32, secreta más proteína de la aguja, secreta menos translocadores y efectores, la mutante ensambla agujas 50% más largas que la cepa silvestre (esto sugiere que aunque Spa40 no se corte, Spa32 puede regular parcialmente la longitud de la aguja), concluyendo que en *S. flexneri*, el cambio de especificidad de secreción de sustratos tempranos y la terminación de la aguja no son eventos robustamente acoplados. Reportan que la cepa Spa40 Δ N257A no tiene actividad hemolítica ya que no se pueden insertar los translocadores y formar el poro en las células eucariontes (Shen, Moriya et al. 2012).

Por otro lado, Spa32 no es necesaria para que Spa40 se corte, ya que en un fondo Δ spa32, Spa40 se corta igual que en la cepa WT. Se propone entonces que la autoproteólisis de Spa40 es vital para el *switch* y que Spa32 es mayoritariamente responsable del control de la longitud de la aguja y sólo hace más eficiente el cambio conformacional en Spa40 que ocurre de manera autónoma (en ausencia de Spa32) (Shen, Moriya et al. 2012).

– **En *Salmonella*: InvJ y SpaS**

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. enterica*) codifica dos SST3, que se requieren en diferentes momentos durante la patogénesis, uno de estos está codificado en la isla de patogenicidad SPI-1, y media las interacciones iniciales de la bacteria con las

células epiteliales del intestino, que promueven su internalización. El segundo sistema está codificado en la isla SPI-2, la cual no se expresa bajo condiciones estándar de crecimiento en el laboratorio y se requiere para la infección sistémica (Kubori, Sukhan et al. 2000; Russmann, Kubori et al. 2002).

InvJ es una proteína requerida para la invasión de células epiteliales, se secreta vía SST3, su señal de secreción se localiza en los primeros 7 residuos y la secreción es esencial para su función (Collazo, Zierler et al. 1995; Russmann, Kubori et al. 2002).

InvJ regula la longitud de la aguja del inyectisoma, ya que una cepa $\Delta invJ$ ensambla agujas de mayor longitud (hasta 1,000 nm) que las de la cepa silvestre (≈ 80 nm). Un resultado interesante es que en la cepa $\Delta invJ$ la proteína del eje (PrgJ) se puede secretar pero se detecta mayor cantidad en el citoplasma comparado con la cepa WT. Al purificar los inyectisomas de la cepa $\Delta invJ$ se observó que el eje no se ensambla (Kubori, Sukhan et al. 2000; Sukhan, Kubori et al. 2003). Este resultado se corroboró por microscopía electrónica (en ausencia de InvJ no se forma el eje), sugiriendo que InvJ estabiliza una estructura de la base del sistema denominada “*socket*”, y que esto es indispensable para el posicionamiento de PrgJ (proteína del eje) y el ensamblaje del eje (Marlovits, Kubori et al. 2006).

SpaS es miembro de la familia de proteínas YscU/FlhB. La región carboxilo (aa 211 a 356) de la proteína se purificó, cristalizó y los resultados mostraron que el dominio C-terminal está altamente conservado entre EscU y SpaS, que es un dominio monomérico con un plegamiento estable. La única desviación que observaron entre EscU_C y SpaS_C fue una hélice α elongada. Describieron que el mecanismo de corte es semejante al de las inteínas que involucra la ciclización de la asparagina. En el mismo trabajo reportaron que una mutante que no se autoproteoliza (N258A) no secreta proteínas translocadoras (SipB y SipC) pero sí secreta a la proteína T3S4 InvJ (Zarivach, Deng et al. 2008).

El ensamblaje del eje como señal de regulación de la secreción. Este modelo propone que la terminación del ensamblaje del eje resulta en el firme anclaje de la aguja a la base del aparato, provocando cambios conformacionales en la cara citoplásmica del inyectisoma y reprogramando al aparato para detener la secreción de las proteínas

tempranas (aguja y el eje). En este modelo InvJ se requiere para estabilizar la conformación del *socket*, que es necesario para el ensamblaje del eje. La función de InvJ podría ser similar a la propuesta para proteínas de andamiaje implicadas en el ensamblaje del flagelo y funcionar así como una “trampa cinética”, permitiendo que el *socket* pase de una conformación flexible y desestructurada a un estado competente para interactuar con PrgJ (Marlovits, Kubori et al. 2006).

– **En *Xanthomonas*: HpaC y HrcU**

La bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* es un patógeno de plantas (pimienta y tomate) que usa el SST3 para invadir a las células eucariontes. El SST3 de patógenos de plantas es estructural y funcionalmente idéntico al de los inyectisomas de patógenos de animales, la única diferencia está en que la estructura extracelular no es una aguja, sino un pilus de gran longitud (hasta 2 μm) necesario para atravesar la gruesa pared celular de las plantas (Buttner, Lorenz et al. 2006).

HpaC es una proteína de 212 aa que no se secreta al medio, es necesaria para la secreción de sustratos intermedios y tardíos (ya que una mutante en *hpaC* reduce severamente la secreción de proteínas efectoras y translocadoras) y es dispensable para la secreción de la proteína del pilus (HrpE), ya que la mutante $\Delta hpaC$ no afecta su secreción ni ensamblaje. Posteriormente se encontró que en la mutante $\Delta hpaC$ se secreta más proteína del eje (HrpB2) comparado con los niveles secretados por la cepa WT (Buttner, Lorenz et al. 2006; Lorenz, Schulz et al. 2008).

HpaC interactúa con la chaperona de efectores (HpaB), con efectores (AvrBs3 y XopF1), con un translocador (XopA), con un componente del aparato de exportación (HrcV), con la proteína que se propone forma el eje en el inyectisoma de plantas (HrpB2) y con con la ATPasa (HrcN) (Buttner, Lorenz et al. 2006; Lorenz, Schulz et al. 2008; Lorenz and Buttner 2009).

HpaC_C contiene un dominio T3S4, el cual es indispensable para su interacción con HrcU y para regular el cambio de especificidad de sustratos (Lorenz, Schulz et al. 2008).

HrcU pertenece a la familia de proteínas YscU/FlhB, interacciona con la ATPasa y con su regulador (HrcL), su región carboxilo interacciona con HpaCC (aa 112-212) y con HrpB2. El corte de HrcU es necesario para la secreción de translocadores y efectores pero no para la secreción de HrpB2. Mutaciones en el motivo NPTH evitan que HrcU interaccione con HpaC pero no con HrpB2. Se propone que los SST3 de bacterias patógenas de plantas y animales deben compartir los mecanismos de cambio de especificidad de sustratos, pero que probablemente difieren en los componentes que reconocen a los sustratos (ya que no encuentran interacción de HrcU con efectores ni translocadores). En *X. campestris* pv. *vesicatoria* otra diferencia importante es la del control de la longitud de las estructuras extracelulares, ya que aunque HpaC es una proteína T3S4 que participa en el *switch*, esta no se secreta y en su ausencia la longitud del pilus no se afecta (Lorenz, Schulz et al. 2008; Lorenz and Buttner 2009; Lorenz and Buttner 2011; Schulz and Buttner 2011).

A manera de resumen de los antecedentes aquí descritos, se presenta una tabla donde se condensan los datos más relevantes para cada proteína.

Proteínas	No de aa	Longitud de la aguja, gancho o pilus	Fenotipo de la mutante	Otras características	Interacciones
En flagelo (<i>Salmonella enterica</i>)					
FliK	405	55 nm	-Se forman poliganchos de longitudes variables sin filamento	-Sustrato temprano que se secreta durante el ensamblaje del gancho	FlgD, FlgE y FlhB _C
FlhB	383		- Si no se corta, se forman poliganchos que ya no ensamblan el filamento	-Autoprocesamiento en motivo NPTH	FliK, FlhA _C , FliH y FliI
En <i>Yersinia</i> spp.					
YscP	515	60 nm	-Ensambla agujas de más de 1,000 nm -No es capaz de secretar Yops pero	- Se secreta vía SST3 en ausencia de calcio -Posee un dominio T3S4 (residuos 405 al 500)	YscN-YscL, YscO y YscQ

YscU	354		hipersecreta YscF e YscI	-La longitud de la aguja es directamente proporcional al tamaño de YscP	YscL, YscK, YscQ y YscO
			-Mutantes N263A y P264A del motivo NPTH previenen el corte, ya no se secretan translocadores pero sí efectores, se forman agujas de mayor longitud que la cepa WT.	- Autoprocésamiento en motivo NPTH	
En <i>Shigella flexneri</i>					
Spa32	292	45 nm	-Ensambla agujas de hasta 1,050 nm -Reduce secreción de translocadores e incapaz de secretar efectores	-Se secreta vía SST3 -La longitud de la aguja no es proporcional al tamaño de Spa32 -No es necesaria para que Spa40 se autoproteolice	Spa40
Spa40	342		-Mutante en el motivo NPTH (N257A) no se corta, exporta niveles silvestres de Spa32, secreta más proteína de la aguja, secreta menos translocadores y efectores -Mutaciones en el carboxilo (V320A y L310A) no ensamblan agujas y abaten secreción de proteínas	- Autoprocésamiento en motivo NPTH	Spa32, MxiA, MxiN, Spa33, Spa47 y MxiK
En <i>Salmonella enterica</i>					
InvJ	336	80 nm	-Ensambla agujas de hasta 1,000 nm -Hipersecreción de la proteína del eje, PrgJ pero que no se ensambla	-Se secreta vía SST3	
SpaS	356		-Mutante que no se corta (N258A) no secreta proteína translocadoras pero sí a InvJ	- Autoprocésamiento en motivo NPTH	

En *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

HpaC	212	Hasta 2 μm	-Reduce la secreción de efectores y translocadores -Hipersecreta la proteína del eje, HrpB2 pero no afecta la secreción de la proteína del pilus, HrpE.	-No se secreta -Posee un dominio T3S4	HrcU, HpaB, AvrBs3, XopF1, XopA, HrcV, HrpB2 y HrcN
HrcU	357		-Mutaciones en el motivo NPTH evitan interacción con HpaC	- Autoprocésamiento en motivo NPTH	HpaC, HrcL, HrpB2

HIPÓTESIS

La proteína Orf16 de EPEC pertenece a la familia de proteínas YscP/FliK y puede cumplir las funciones de este grupo de proteínas: regular la longitud de la aguja y/o participar en el cambio de especificidad de secreción de sustratos del inyectisoma.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el papel de la proteína Orf16 en el ensamblaje y función del inyectisoma de *Escherichia coli* enteropatógena.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Clonar los genes *orf16* y *escU_C* en diferentes vectores de expresión.
- Producir y purificar las proteínas recombinantes Orf16 y EscU_C para la generación de anticuerpos policlonales en conejo.
- Construir una mutante nula en el gen *orf16* y caracterizar su fenotipo de:
 1. Secreción de proteínas.
 2. Longitud de la aguja de los inyectisomas.
 3. Capacidad hemolítica.
 4. Formación de filamento EspA.
- Determinar si la interacción Orf16-EscU se encuentra conservada en EPEC.
- Identificar interacciones de Orf16 con otros componentes del sistema de secreción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento de cepas bacterianas

E. coli se cultivó en medio LB (Luria Bertani) o en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado con 1% de LB y 4mg/litro de piridoxal a 37°C con agitación (250 rpm). Cuando fue necesario el medio se suplementó con los antibióticos ampicilina (Amp 100 µg/ml), cloranfenicol (Cm 25 µg/ml), estreptomina (Sm 25 µg/ml), tetraciclina (Tc 25 µg/ml) o kanamicina (Km 50 µg/ml) con el objetivo de seleccionar las bacterias resistentes a estos antibióticos, o que tengan el plásmido que confiere resistencia a los mismos. Para detalles respecto a las cepas y sus características ver Tabla 1.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio

Cepas y plásmidos	Características relevantes ^a	Fuente o referencia
<i>E. coli</i>		
E2348/69	EPEC cepa silvestre (WT), serotipo: O127:H6, Sm ^R	(Levine, Bergquist et al. 1978)
$\Delta escN$	E2348/69 con eliminación en fase del gen <i>escN</i> , Sm ^R	(Gauthier, Puente et al. 2003)
Δler (JPEP24)	E2348/69 con eliminación en fase del gen <i>ler</i> , Km ^R , Sm ^R	(Bustamante, Villalba et al. 2011)
$\Delta escV$	E2348/69 con eliminación en fase del gen <i>escV</i>	Donación del Dr. José Luis Puente, IBT, UNAM.
$\Delta escP$	E2348/69 con eliminación en fase del gen <i>escP</i> , Km ^R , Sm ^R	Este estudio
$\Delta escF$	E2348/69 con eliminación en fase del gen <i>escF</i> , Km ^R , Sm ^R	Este estudio
$\Delta escI$	E2348/69 con eliminación en fase del gen <i>escI</i> , Km ^R , Sm ^R	Este estudio
BL21(DE3) pLysS	Cepa utilizada para inducir proteína derivadas de plásmidos pET. El plásmido pLysS codifica para la lisozima T7, Cm ^R	Novagen
XL1-Blue	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada para clonación, Tc ^R	Stratagene
Top10	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada para clonación, Sm ^R	Invitrogen
<i>Citrobacter rodentium</i>		
DSB100	Cepa silvestre	Donación del Dr. José Luis Puente, IBT, UNAM.
<i>Salmonella</i>		
JR501	Para convertir plásmidos a compatibilidad en <i>Salmonella</i>	(Ryu and Hartin 1990)
SJW1103	Cepa de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium silvestre para nado y quimiotaxis (WT)	(Yamaguchi, Fujita et al. 1984)
SJW880	SJW1103 con eliminación en fase del gen <i>fliK</i>	(Suzuki and Iino 1981)
MKM30	SJW1103 con eliminación en fase del gen <i>fliI</i>	(Minamino, Kazetani et

Levadura		
AH109	Cepa hospedera de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usada en el sistema de doble híbrido	Clontech
Plásmidos		
pKD46	Plásmido de expresión de la recombinasa Red, Amp ^R . Sensible a temperatura.	(Datsenko and Wanner 2000)
pKD4	Plásmido utilizado en el sistema Red como molde para amplificar el casete de resistencia a Km, Km ^R , Amp ^R	(Datsenko and Wanner 2000)
PCR-Blunt-II TOPO	Vector de clonación directa de productos de PCR, Amp ^R	Invitrogen
pGEM-T-easy	Vector de clonación directa de productos de PCR, Amp ^R	Promega
pTrc99A	Vector de expresión, Amp ^R	Pharmacia
pTrc99AFF4	Vector de expresión modificado de pTrc99A, Amp ^R	(Ohnishi, Fan et al. 1997)
pTOPO-2HA	Vector derivado de pCR2.1-TOPO conteniendo al gen <i>espG</i> de <i>C. rodentium</i> fusionado a dos epítopes de HA en el extremo C-terminal	(Deng, Puente et al. 2004)
pMALc2x	Vector de expresión que expresa proteínas con una etiqueta de MBP en el N-terminal, Amp ^R	New England Biolabs
pET19b	Vector de expresión T7 que expresa proteínas con una etiqueta His ₁₀ en el N-terminal, Amp ^R	Novagen
pET-FLAG19b	Vector de expresión T7 que expresa proteínas con una etiqueta His ₁₀ -FLAG en el N-terminal, Amp ^R	(Fan and Macnab 1996)
pET23b	Vector de expresión T7 que expresa proteínas con una etiqueta His ₆ en el C-terminal, Amp ^R	Novagen
pACTrc	Híbrido de pTrc99A y pACYC184 con el promotor pTrc y origen de replicación p15A, Cm ^R	Gillian Fraser
pGADT7	Vector de doble híbrido en levadura que contiene el dominio de activación (AD) de GAL4 y el marcador nutricional <i>LEU2</i>	Clontech
pGBKT7	Vector de doble híbrido en levadura que contiene el dominio de unión a ADN (ADN-BD) de GAL4 y el marcador nutricional <i>TRP1</i>	Clontech
pGADT7-T	Fusión de GAL4 AD con p53	Clontech
pGBKT7-53	Fusión de GAL4 ADN-BD con p53	Clontech
pGBKT7-Lam	Fusión de GAL4 ADN-BD con laminina C humana	Clontech
pJRo16	<i>escP</i> clonado en PCR-Blunt-II TOPO, sitios de restricción NdeI y BamHI	Este estudio
pJATo16	<i>escP</i> clonado en pACTrc, sitios de restricción NdeI y BamHI	Este estudio
pJTo16	<i>escP</i> clonado en pTrc99AFF4, sitios de restricción NdeI y BamHI	Este estudio
pMMIK100	<i>fliK</i> clonado en pTrc99AFF4	(Minamino, Ferris et al. 2006)
pJTncoo16	<i>escP</i> clonado en pTrc99A, sitios de restricción NcoI y BamHI	Este estudio
pJTncoHo16	<i>His-escP</i> clonado en pTrc99A, sitios de restricción NcoI y BamHI	Este estudio
pMTBitirHcT	<i>tir</i> y His ₁₀ .cesT clonados en pTrc99AFF4	No publicado
pJHo16	<i>escP</i> con su RBSb nativo clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJHΔ11o16	<i>escP</i> sin los primeros 11 aminoácidos con su RBS nativo clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJHo16Δ15	<i>escP</i> sin los últimos 15 aminoácidos con su RBS nativo clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJHeH	<i>espH</i> con su RBS nativo clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJHtir	<i>tir</i> con su RBS nativo clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJHmap	<i>map</i> con su RBS nativo clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción	Este estudio

	HindIII y XhoI	
pJHnC	<i>nleC</i> con su RBS nativo clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJHnD	<i>nleD</i> con su RBS nativo clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJHnH	<i>nleHH</i> con su RBS nativo clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJHnI	<i>nleI</i> con su RBS nativo clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJHeI	<i>escI</i> con su RBS nativo clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJHA35o16CR	<i>orf16</i> de <i>C. rodentium</i> sin los primeros 35 aminoácidos clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJHo16CR	<i>orf16</i> de <i>C. rodentium</i> clonado en pTOPO-2HA, sitios de restricción HindIII y XhoI	Este estudio
pJLo16	<i>escP</i> clonado en pMALc2X, sitios de restricción BamHI y HindIII	Este estudio
pJEo16	<i>escP</i> clonado en pET19b, sitios de restricción NdeI y BamHI	Este estudio
pJEFo16	<i>escP</i> clonado en pET19bHF, sitios de restricción NdeI y BamHI	Este estudio
pJEeU _C	<i>escU_C</i> clonado en pET19b, sitios de restricción NdeI y BamHI	Este estudio
pJEeU _{CC}	<i>escU_{CC}</i> clonado en pET19b, sitios de restricción NdeI y BamHI	Este estudio
pJEEf	<i>escF</i> clonado en pET19b, sitios de restricción NdeI y BamHI	Tesis de licenciatura Monjarás Feria, J.
pJEEI	<i>escI</i> clonado en pET19b, sitios de restricción NdeI y BamHI	Tesis de licenciatura Monjarás Feria, J.
pMEcT	<i>cesT</i> clonado en pET19b	No publicado
pJE23bo16	<i>escP</i> clonado en pET23b	Este estudio
pOGADo16	<i>escP</i> clonado en pGADT7, sitios de restricción NdeI y BamHI	Onasis Vicente
pOGBKeU _C	<i>escU_C</i> clonado en pGBKT7, sitios de restricción NdeI y BamHI	Onasis Vicente
pOGBKeU _{CC}	<i>escU_{CC}</i> clonado en pGBKT7, sitios de restricción NdeI y BamHI	Onasis Vicente
pOGBKeF	<i>escF</i> clonado en pGBKT7, sitios de restricción NdeI y BamHI	Onasis Vicente
pNGBKeI	<i>escI</i> clonado en pGBKT7, sitios de restricción NdeI y BamHI	Este estudio
pMGBKcT	<i>cesT</i> clonado en pGBKT7, sitios de restricción NdeI y BamHI	No publicado

^a Sm, estreptomycin; Km, kanamicina ;Tc, tetraciclina; Cm, cloranfenicol ; ^b. RBS: Sitio de unión a ribosoma

Manipulación de ADN

Todas las amplificaciones por PCR se realizaron a partir de ADN cromosomal purificado de la cepa EPEC WT. Los productos obtenidos se purificaron (estuches comerciales de Promega o Qiagen), se digirieron con las enzimas correspondientes (NEB) y se clonaron en los vectores digeridos con las mismas enzimas. Las enzimas de restricción, la T4 ADN ligasa (NEB) y la Taq ADN polimerasa (Qiagen) se utilizaron de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

Al verificar por digestión enzimática que las clonas contenían los genes de interés, se secuenciaron a la Unidad de Biología Molecular (IFC, UNAM). En la Tabla 2 se detallan los plásmidos utilizados en este estudio, así como información sobre las construcciones. En la Tabla 3 se muestra la lista de oligonucleótidos diseñados, sintetizados (Sigma) y utilizados en este estudio.

Para construir la versión de EscP sin los primeros 11 aminoácidos, se diseñaron los oligonucleótidos $\Delta 11o16HA_A$ y $\Delta 11o16HA_B$ que contienen 12 bases idénticas localizadas río abajo de las bases que se eliminarán y dentro de las cuales se coloca un nuevo codón de inicio (Figura 16, panel 1).

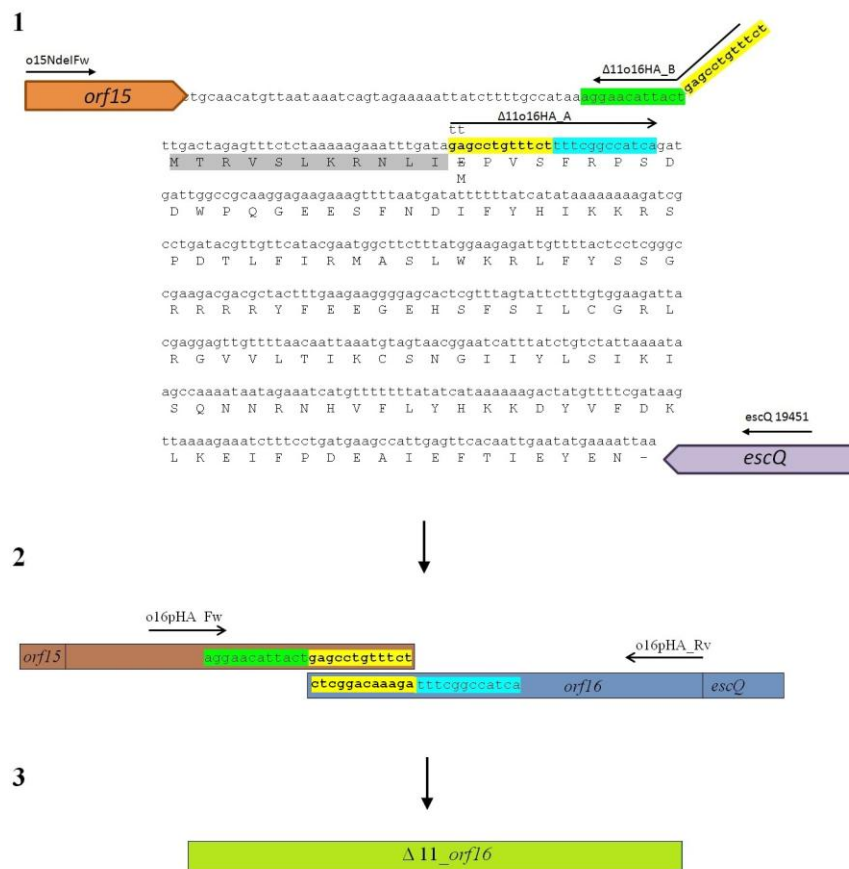


Fig. 16 (1) Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de EscP donde se muestra la posición de los oligonucleótidos $\Delta 11o16HA_A$ y $\Delta 11o16HA_B$ diseñados para hacer la mutante del amino terminal de EscP. En gris se resaltan los aminoácidos a eliminar (2) Cebadores que se utilizaron para hacer el PCR de de traslape (3) Finalmente se obtiene la versión de EscP sin los primeros 11 aminoácidos.

Posteriormente se realizaron dos PCR independientes, para el primero se usaron los oligonucleótidos o15NdeFw y $\Delta 11o16HA_B$; mientras que para el segundo se utilizaron el

Δ 11o16HA_A y el escQ19451 (Figura 16, panel 2). Se utilizaron los oligonucleótidos de los genes aledaños a *escP* para que los productos fueran de un tamaño apreciable y que contuvieran bases río arriba del inicio de *escP*. Los dos productos se purificaron y se usaron como templado para un PCR de traslape, y para el cual se ocuparon los cebadores o16pHA_Fw (que se alinea río arriba del sitio de unión a ribosoma predicho para *escP*) y o16pHA_Rv (Figura 16, panel 3). El producto de PCR se purificó, digirió con las enzimas HindIII y XhoI y se ligó en el vector pTOPO-2HA previamente digerido con las mismas enzimas. La construcción se corroboró con la secuenciación del plásmido.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados y utilizados en este estudio. En negritas se resalta la posición del sitio de restricción.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Sitio de restricción
Para plásmidos		
o16_Fw	GAACATTCATATGACTAGAGTTTC	NdeI
o16_Rv	GGCAAATAAGGATCCTTAATTTTC	BamHI
escU _C 631_Fw	AGAAAATGCATATGAGTAAAGATG	NdeI
escU _{CC} 772_Fw	GTTATTGTTTCATATGCCGACTCAC	NdeI
escU _C Rv	TGAGCAAGGATCCGATTAATAATC	BamHI
o16pMal_Fw	GAACATTGGATCCACTAGAGTTTC	BamHI
o16pMal_Rv	GGCAAATAAGCTTCGTTAATTTTC	HindIII
o16pHA_Fw	AATAAGCTTTGCCATAAAGGAAC	HindIII
o16pHA_Rv	TAAAAACTCGAGATTTTCATATTC	XhoI
o16 Δ 15HA_Rv	CTTCATCAGGCTCGAGTCTTTTA	XhoI
escIpHA_Fw	GGTGGCGTAAAGCTTGTGCGCG	HindIII
escIpHA_Rv	GTTTTTCACTCGAGTTGCATCGA	XhoI
espHpHA_Fw	ATT TACTATAAGCTTAGTAGTG	HindIII
espHpHA_Rv	ATAAAATAACTCGAGAAGCAATGG	XhoI
espZpHA_Fw	ACCAGGTAAAAAGCTTAAATTAGAC	HindIII
espZpHA_Rv	TGCGACTCGAGGGCATATTTTCATC	XhoI
mappHA_Fw	TTATAGGTGTAAAGCTTTTATG	HindIII
mappHA_Rv	TAAGTTTCCTCGAGCAGCCG	XhoI
tirpHA_Fw	CATAGTAATATAAAGCTTCGTGTC	HindIII
tirppHA_Rv	TCACAGATACTCGAGAACGAAACG	XhoI
nleCpHA_Fw	TAGTTAAGCTTGTGTAAATAAATG	HindIII
nleCpHA_Rv	AAAGACCTCGAGTCGCTGATTGTG	XhoI
nleDpHA_Fw	AGTGGTAAACAAGCTTCTAATAAG	HindIII
nleDpHA_Rv	CAAGAAACACTCGAGAAGCAATGG	XhoI
nleHpHA_Fw	TGTCTGTTAAGCTTAATTAGATAG	HindIII
nleHpHA_Rv	CTGGATAAAAACCTCGAGTATCTTAC	XhoI
nleIpHA_Fw	TTATGACTCCCAAGCTTTGGAATG	HindIII
nleIpHA_Rv	GGGTAATATTTCTCGAGCTTATCC	XhoI
Δ 35o16HACR_Fw	CATTAGAAGCTTGGTCACAAG	HindIII
Δ 35o16HACR_Rv	AAAAACTCGAGATTTTCATATTCG	XhoI
Δ 11o16HA_A	TTGCCTGTTTCTTTTCGGCCATCA	
Δ 11o16HA_B	AGAAACAGGCAAAGTAATGTTCCCT	
Para mutantes		
Δ orf16_Fw	GAAAAATTATCTTTTGGCATAAAGGAACATTACTTTGAC TAGAGTTTCTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
Δ orf16_Rv	GGCAAATAAAAATCGTTAATTTTCATATTCAATTGTGAA CTCAATGGCTTCATATGAATATCCTCCTTAG	
Δ escF_Fw	ATTATTTTATTAACCTCTGAGGGAAATTTAATGAATTTAT	

	CTGAAATTACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Δ escF_Rv	TATCATTAACCATAAAAAATTA AAAACTACGGTTAGAAAT GGTTGAGACCAATGAATATCCTCCTTAGTTC
Δ escI_Fw	GCATCGAAACTAATTTTGTAAACCGATGTTGAAAGGAGGC TTGCTAACTTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Δ escI_Rv	TCGCATCGCATAAAAAATAGAGAGGTAATGGATGCATTAT GCTATTGCCTCATTCCGGGGATCCGTCGACC

Producción de proteínas recombinantes

Se utilizó la cepa bacteriana de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (BDP) transformada con los plásmidos pJEo16, pJE23o16 y pJEEu_C que contienen a los genes *escP* y *escU* clonados en vectores del sistema pET, que se transcriben bajo el control de la T7 RNA polimerasa producida en la célula huésped y que además insertan una etiqueta de histidinas en la proteína. La expresión se induce con IPTG, el cual remueve al represor del operador para que se lleve a cabo la transcripción y se promueva la expresión de la proteína de interés.

Utilizando cultivos de 50 ml de la cepa de interés en LB, mediante varios ensayos se establecieron las concentraciones óptimas del agente inductor (IPTG), de la temperatura de crecimiento y del empleo de los plásmidos de expresión pET-19b o pET-23b.

Purificación de proteínas

MBP-EscP

Para la purificación de MBP-EscP, el plásmido pJLo16 se transformó en la cepa BDP y se indujo en 500 ml de LB a 30°C con 0.3 mM de IPTG por 4 horas. Las células se colectaron por centrifugación a baja velocidad (8,000 rpm por 10 minutos en el rotor JA14) y la pastilla se congeló a 20°C hasta su uso. La pastilla celular se incubó 30 min con 15 ml de amortiguador C (CB) (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl y 1 mM EDTA) y se agregó el inhibidor de proteasas (PMSF) a una concentración final de 1 mM, se resuspendió y las células se lisaron por sonicación, mediante un pulso de 2 min. Las fracciones celulares se separaron por centrifugación (15,000 rpm por 30 minutos en el rotor JA 25.50) y la fracción soluble se pasó por una columna que contenía 1 ml de resina de amilosa (NEB), previamente equilibrada con 10 volúmenes de CB. Se colectaron 50 μ l del lisado y de la fracción no unida a la columna y se guardaron a 4 °C. Para los lavados se utilizaron 100 ml

de CB, 30 ml de CB 500 mM de NaCl y se eluyó con 4 fracciones de 2 ml de CB con 10 mM de maltosa. Se colectaron 50 μ l de cada una de las diferentes fracciones y se almacenaron a 4 °C. El perfil de purificación se visualizó en gel desnaturalizante SDS-PAGE al 15%, teñido posteriormente con azul de Coomassie.

His-EscU_C y generación de anticuerpos

La proteína recombinante His-EscU_C se sobreprodujo a partir del plásmido pJEEU_C en la cepa BDP a 30°C y 0.5 mM de IPTG en un volumen de cultivo de 250 ml. Se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de Ni-NTA (Qiagen), ya que el níquel es un metal afín al anillo imidazol de las histidinas de la proteína recombinante. La proteína se indujo en las condiciones anteriormente descritas durante 4 h, las células se colectaron por centrifugación a baja velocidad (8,000 rpm por 20 minutos en el rotor JA14) y la pastilla se congeló a -20°C hasta su uso. La pastilla celular se incubó 30 min con 15 ml de amortiguador de unión (BB) (20 mM de Tris-HCl pH 8.0 y 500 mM NaCl) más PMSF 1 mM, se resuspendió y las células se lisaron por sonicación mediante dos pulsos de 2 min cada uno y con un periodo de reposo de 1 min. Las fracciones celulares se separaron por centrifugación (18,000 rpm por 20 minutos en el rotor JA 25.50) y la fracción soluble se pasó por una columna que contenía 1.5 ml de resina Ni-NTA, previamente equilibrada con 10 volúmenes de BB. Se colectaron 50 μ l del lisado y de la fracción no unida a la columna y se guardaron a 4 °C. Para los lavados se utilizaron 60 ml de BB 30 mM de imidazol, 20 ml de BB 60 mM de imidazol, 20 ml de BB 100 mM de imidazol y se eluyó con 3 ml de BB 200 mM de imidazol y dos eluciones de 3 ml de BB 300 mM de imidazol. Se colectaron 50 μ l de cada una de las diferentes fracciones y se almacenaron a 4 °C. El perfil de purificación de la proteína recombinante His-EscU_C se visualizó en gel desnaturalizante SDS-PAGE al 16.5%, teñido posteriormente con azul de Coomassie.

La proteína purificada se dializó en membranas de celulosa (Spectra/Por), se cuantificó mediante el método de Bradford (Bio-Rad *Protein Assay*) y se inyectó a un conejo hembra raza Nueva Zelanda. Las tres inmunizaciones (en intervalos de tres semanas) fueron vía subcutánea y se inyectaron 200 μ g con adyuvante de Freund completo (Difco) en la primera inmunización e incompleto para los refuerzos.

La sangre obtenida a las dos semanas de las inmunizaciones se incubó a temperatura ambiente por 1 hora, luego se mantuvo a 4°C por dos horas. Después se centrifugó a 4°C a 5000g por 20 min para separar el coagulo y recuperar el suero, que se alicuotó y almacenó a -70 °C.

Generación de mutantes de EPEC nulas en los genes escP, escF y escI

Para la eliminación en fase de *escP*, *escF* y *escI* se utilizó el sistema de la recombinasa Red del fago λ , que por medio de recombinación homóloga reemplaza el gen de interés por un casete de resistencia a algún antibiótico (Datsenko and Wanner 2000). Para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (de forma que se inserte en el mismo sentido de los genes del operón), se utilizó el plásmido templado pKD4 y se amplificó el casete utilizando los pares de cebadores $\Delta orf16_Fw$ y $\Delta orf16_Rv$, $\Delta escF_Fw$ y $\Delta escF_Rv$ y $\Delta escI_Fw$ y $\Delta escI_Rv$, respectivamente, que contienen 20 nucleótidos idénticos al templado y 50 nucleótidos homólogos a los extremos 5' y 3' del gen a eliminar. Los productos de PCR purificados se introdujeron por electroporación en la cepa EPEC WT (a la que previamente se le había transformado el plásmido pKD46). En cultivos de 40 ml, la recombinasa se indujo con arabinosa y se dejaron crecer por 3 horas a 30°C. Las mutantes se seleccionaron a 37°C (para eliminar el plásmido termosensible pKD46) en cajas de LB adicionadas con 100 μ g/ml de kanamicina para seleccionar la inserción del casete. La resistencia a kanamicina y sensibilidad a ampicilina se probaron también en medio LB líquido. La introducción del casete de kanamicina en lugar de *escP*, *escF* o *escI* se confirmó por PCR usando diferentes combinaciones de oligonucleótidos, que se alineaban tanto dentro del casete (k1, k2 y kt) como en las regiones fuera de él (en los genes aledaños)

Ensayo de secreción

Se pusieron precultivos de 3 ml de LB con los antibióticos adecuados a la resistencia de las cepas y/o plásmidos y se crecieron toda la noche (ON) a 37°C y agitación (250 rpm). 6 ml de DMEM (precalentado ON a 37°C) se inocularon con una dilución 1:50 del precultivo, se agregó 1% LB y se dejaron crecer hasta una DO_{600} de 0.6-0.8. Los cultivos se colectaron en 3 tubos de 1.5 ml y las células se cosecharon por centrifugación 3-5 minutos a 14,500 rpm en una centrífuga de mesa a temperatura ambiente (TA). Se tomaron tubos de

1.5 ml limpios, se pasaron 1.4 ml de cada sobrenadante y a cada uno se le agregaron 140 μ l de TCA frío (concentración final 10%). Las proteínas se precipitaron ON a 4°C (en el refrigerador) y al siguiente día se centrifugaron a 14,000 rpm por 30 min a 4°C. Los sobrenadantes se desecharon utilizando succión con vacío (usando una punta de micropipeta) y los tubos se dejaron secar destapados en hielo de 10-30 minutos. Por cada 1.5 ml de sobrenadante se normalizó multiplicando la DO X 10 (p.ej. si tenemos 3 tubos multiplicamos $DO=0.66 \times 30 = 19.8 \mu$ l) y el total es la cantidad de amortiguador de carga 1X que agregamos al primer tubo, se resuspendió bien (se puede ver una pequeña pastilla en el fondo del tubo), se agitó 10 segundos en vórtex y se fue pasando la muestra al siguiente tubo y así hasta el último tubo. Después los tubos se centrifugaron 1 minuto a 14,000 rpm para juntar todos los residuos de muestra que se dispersaron y al final nos quedamos con un solo tubo (p. ej. que contiene 19.8 μ l de muestra de sobrenadantes de 3 tubos de 1.5 ml). Por cada tubo de 1.5 ml se agregó 1 μ l de Tris saturado para neutralizar el ácido. Para las pastillas celulares totales, se normalizó multiplicando la DO X 200. Se cargaron 10 μ l de las muestras de los sobrenadantes en geles desnaturalizantes SDS-PAGE 15%.

Purificación de inyectisomas

Las muestras se obtuvieron de manera similar a protocolos previamente descritos (Kubori, Matsushima et al. 1998; Marlovits, Kubori et al. 2004) con algunas modificaciones. Cultivos de 20 ml de LB se crecieron toda la noche (ON) en agitación a 37 °C y 19 ml (1:50) se usaron para inocular 950 ml de DMEM (precalentado ON a 37 °C). Las bacterias se crecieron en agitación moderada (100 rpm) a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} cercana a 0.8 y se colectaron por centrifugación a baja velocidad (7,000 rpm por 15 minutos en el rotor JA10). El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 80 ml de solución de sacarosa (150 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M sacarosa). La suspensión se agitó a 4°C (en cuarto frío) y se le agregó lentamente por goteo 1 mg/ml de lisozima (8 ml de la solución madre 10 mg/ml preparada en el momento). Después se añadieron 2 mM de EDTA pH 8.0 (1.76 ml de una solución 0.1 M fría) y se dejó agitando una hora a 4 °C (en cuarto frío). Las células se lisaron con 0.3% de LDAO (*lauryldimethylamine oxide*) (2.6 ml de una solución 10% preparada en solución de sacarosa), se añadieron 5 mM $MgSO_4$ (4.5

ml de una solución 0.1 M) y después 100 mM de NaCl (2 ml de una solución 5M). En este paso la solución se aclaró poco a poco hasta hacerse casi transparente y viscosa. La separación de desechos celulares se hizo por centrifugación (12,000 rpm por 20 minutos a 4°C en el rotor JA20) y los inyectisomas del sobrenadante se centrifugaron (1 hora a 30,000 rpm 4°C en el rotor 50 i Ti). La pastilla se resuspendió en 2 ml de amortiguador F (0.1% LDAO, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.3 M NaCl y 5 mM EDTA). Se usó una concentración final de 35% de CsCl (wt/vl, 5.84 g de CsCl para un volumen final de 16.7 ml en amortiguador F), los 2 ml de muestra se mezclan con la solución de CsCl y se centrifugó a 20,000 rpm (rotor Beckman SW32 i Ti) por 12-14 horas a 20°C. Del gradiente se colectaron fracciones de 500 µl (utilizando el aparato Biorad *Gradient Station*) y las fracciones se diluyeron en 1 ml de amortiguador F. Se centrifugaron a 50,000 rpm por 30 minutos a 4 °C (rotor Beckman TLA-100.4) y las pastillas se resuspendieron en 100 µl de amortiguador F y se guardaron a 4 °C.

Microscopía electrónica

Se colocaron 3 µl de las diferentes fracciones de las purificaciones de inyectisomas de EPEC WT y de la mutante $\Delta escP$ en rejillas recubiertas con carbón, previamente ionizadas y se seca con papel filtro para eliminar el exceso de muestra.

La rejilla se pasa por una gota de ácido fosfotúngstico (PTA) al 2% pH 4.5 y se seca inmediatamente con papel filtro. La gradilla de rejillas se coloca en su estuche y se seca de 2 horas a toda la noche en una cámara a baja humedad. El microscopio electrónico de transmisión JEM-1011 se operó a 100 kV y las fotos se tomaron a una amplificación calibrada de 20K. Las mediciones se hicieron utilizando el programa Image J (donde cada pixel corresponde a 5.22 Å).

Ensayo de hemólisis

El protocolo se adaptó de (Warawa, Finlay et al. 1999; Ide, Laarmann et al. 2001; Garcia-Gomez, Espinosa et al. 2011). Los eritrocitos se obtuvieron de una muestra de 5 ml de sangre extraída por punción venosa a voluntarios. La sangre se trató agregando 500 µl de EDTA 1% pH 7.5 (100µl por cada ml de sangre) para evitar coagulación y se centrifugó

a 3,500 x g por 15 min a temperatura ambiente (TA) para concentrar los eritrocitos. Se centrifugó 1,000 x g 10 minutos a TA y se lavaron 3 veces con un volumen de NaCl 0.9%.

Se pusieron precultivos de 3 ml de LB con los antibióticos adecuados de las cepas a analizar, y se crecieron ON a 37°C y agitación (250 rpm). Con 80 µl (1:50) de los precultivos se inocularon 4 ml de DMEM y se incubaron a 37°C en CO₂ 5% hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0.4. En tubos limpios de 1.5 ml se agregaron 0.5 ml de cultivo y 0.5 ml de solución de eritrocitos 4% (en DMEM) y se centrifugaron a 2,500 x g durante 1 min a TA para inducir el contacto de las bacterias con los eritrocitos. Se incubó a 37°C en CO₂ 5% durante 4 horas y la pastilla se resuspendió suavemente para homogeneizar la muestra. Las células se centrifugaron a 12,000 x g por 1 min y se analizó la liberación de hemoglobina en el sobrenadante a una DO₄₅₀. EPEC WT se utilizó como control (se consideró como 100% de hemólisis) y la cepa $\Delta escN$ como control negativo. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Rasurado de filamentos EspA

La purificación de filamentos EspA de la superficie de EPEC se llevó a cabo adaptando protocolos ya descritos (Daniell, Kocsis et al. 2003; Garcia-Gomez, Espinosa et al. 2011). Se pusieron precultivos de 5 ml de LB con los antibióticos adecuados de las cepas a analizar, y se crecieron ON a 37°C y agitación (250 rpm). Se inocularon con los precultivos (1:50) 150 ml de DMEM (precalentado a 37 °C ON) y se incubaron en agitación (200 rpm) a 37°C hasta una DO₆₀₀ 0.7-0.8. Los cultivos se centrifugaron a 7,000 rpm por 10 min a 4°C (rotor JA14). El sobrenadante se utilizó para ensayos de secreción y a las pastillas se les agregaron 20 ml de Tris-HCl pH 7.5 frío y se incubaron en hielo por 10 min. Las pastillas se resuspendieron suavemente (se agitaron a baja velocidad con vórtex) y en tubos 15 ml (Falcon) se fueron agregando de 4 en 4 ml de la solución y se fueron agitando a máxima velocidad con vórtex durante 4 minutos (dos periodos de 2 min con 1 min de descanso). Para separar las bacterias de los filamentos EspA rasurados, se centrifugó 2 veces (pasando a tubos limpios en cada una) a 18,000 rpm por 20 min a 4°C (rotor JA 25.50). Para concentrar la muestra con los filamentos, se centrifugó a 40,000 rpm durante 1 hora a 4°C (rotor 60 Ti). El sobrenadante se desechó con cuidado y en el tubo se marcó la

pequeña pastilla transparente y viscosa que se puede distinguir. Los tubos se dejaron secando 5 minutos boca abajo y se limpiaron bien las paredes del tubo (usando paño “Kimwipe”). La pastilla se resuspendió normalizando con 50 μ l de Tris-HCl pH 7.5 20 mM frío para el cultivo de mayor DO. Las muestras se analizaron por geles desnaturalizantes SDS-PAGE 15% y por inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-EspA. La cantidad de EspA en las radiografías se cuantificó por densitometría utilizando el programa Scion Image (Scion Corporation).

Copurificaciones

Las proteínas MBP (pMAL-c2x), MBP-EscP (pJLo16), His-EscU_C, His EscU_{CC}, His-EscF, His-EscI, His-CesT, Tir_His-CesT y His-SepL se sobreexpresaron en la cepa BDP durante 4 horas a 30°C en las condiciones indicadas en la Tabla 4. Los cultivos se centrifugaron a 8,000 rpm por 10 min a 4°C (rotor JA14) y las pastillas se congelaron hasta su uso. A las pastillas se les agregaron 10 ml de amortiguador C (CB) y 1 mM de PMSF, se dejaron 20 min en hielo y se resuspendieron. Las células se lisaron por sonicación durante 2 min. Los lisados se centrifugaron a 15,000 rpm por 30 min a 4°C (rotor JA 25.50), las fracciones solubles se mezclaron y se dejaron en agitación orbital a 4°C durante 2 h. Los lisados se pasaron por 250 μ l de resina de amilosa (NEB) pre-equilibrada con 3 volúmenes de CB. Se tomaron 100 μ l de la muestra de los lisados mezclados y de la fracción no unida. Se hizo un lavado con CB de 5 ml para His-EscF, de 10 ml para His-EscU_C, Tir_His-CesT y His-EscI y de 15 ml para His-EscU_{CC} y His-CesT. En todos los casos se hicieron 3 eluciones, cada una de 250 μ l de CB con 10 mM de maltosa. A todas las muestras se les agregó amortiguador de carga 4 X (Tris-HCl 200 mM, SDS 8%, azul de bromofenol 0.4% y glicerol 40%) se corrieron en geles SDS-PAGE 15% o al 16.5% para His-EscU_C o en geles largos 16.5% para His-EscU_{CC} y después se tiñeron con azul de Coomassie o se usaron para inmunodetección con anticuerpos. Cabe mencionar que MBP eluyó en muy altas concentraciones al comparar con la cantidad eluida de MBP-EscP, por lo que se cargó la mitad de las eluciones (7 μ l) de lo que se cargó para MBP-EscP (14 μ l).

Tabla 3. Volumen de cultivo y cantidad de IPTG de las diferentes proteínas utilizadas en las copurificaciones.

Proteína	Volumen de	IPTG [mM]
MBP	100	0.1
MBP-EscP	100	0.3
His-EscU_C	200	0.5
His-EscU_{CC}	200	0.5
His-EscF	200	0.1
His-EscI	200	0.3
His-CesT	200	0.1
Tir_His-CesT	200	0.5
His-SepL	200	0.1

Ensayo de doble híbrido en levadura

El ensayo se llevó a cabo utilizando el sistema “*Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3*” (Clontech) y siguiendo las recomendaciones de fabricación. Las construcciones en el vector pGBKT7 y en pGADT7 (ver Tabla 2) se cotransformaron en la cepa AH109 siguiendo el protocolo de transformación con acetato de litio, se sembró en cajas de medio SD de baja astringencia (sin leucina ni triptófano) y se crecieron a 30°C. Una colonia de la cotransformación se usó para inocular 2.5 ml de medio SD líquido de baja astringencia y se creció ON a 30 °C. Se tomaron 2 ml del cultivo, se centrifugaron, se lavaron 2 veces con 1 ml de agua y se ajustaron a una DO de 1.0 por dilución en agua; a excepción de los cultivos con pMGBKcT que se ajustaron a una DO de 2.0. Las muestras se diluyeron de manera serial y se sembraron 3 µl de cada dilución en cajas de medio SD de mediana astringencia (sin leucina, triptófano ni histidina). Las cajas se incubaron a 30°C de 3 a 5 días y 7-9 días para pMGBKcT. Se utilizaron los plásmidos control del estuche, usando como control positivo pGADT7-T cotransformado con PGBKT7-53 y como control negativo pGADT7-T cotransformado con PGBKT7-Lam.

Ensayos de nado de Salmonella

Para el análisis de efecto multicopia de EscP de EPEC sobre el nado de *S. enterica*, los plásmidos pJTo16 y pJATo16 se introdujeron por electroporación en la cepa SJW1103. Cajas de agar suave al 0.25% (13g de triptona, 7g de NaCl y 2.5g de agar por litro) con ampicilina o cloranfenicol y con 1 mM de IPTG se inocularon (picando con un palillo) con células frescas de las diferentes cepas analizadas y se incubaron a 30°C durante 4-6 horas.

RESULTADOS

1. Análisis bioinformático de EscP y EscU

Para comenzar con la caracterización funcional de EscP, decidimos hacer un análisis bioinformático para conocer algunas de las propiedades físicoquímicas de la proteína y ver si existían características compartidas con las proteínas de la familia YscP/FliK. En el análisis incluimos también a EscU de EPEC, que es la proteína homóloga a YscU/FliB (Anexo II). En la Tabla 4 se muestran algunas de las características predichas del análisis *in silico* utilizando diferentes bases de datos.

Tabla 4. Características físicoquímicas predichas para EscP y EscU

	<u>EscP</u>	<u>EscU</u>	Referencia o fuente
Número de aminoácidos	138	345	(Elliott, Wainwright et al. 1998)
Masa molecular (kDa)	16.57	39.17	http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam
Punto isoeléctrico	9.2	9.2	http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam
Cruces transmembranales	No	4	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
Secuencia señal	No	No	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/

EscU comparte $\approx 40\%$ de identidad con las proteínas de la familia YscU/FliB; es una proteína con alto contenido helicoidal (67% calculado con SOPMA [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl]) y al igual que todas las proteínas de esta familia posee 4 cruces transmembranales y un dominio carboxilo terminal citoplásmico que se autoproteoliza entre la asparagina 262 y la prolina 263 del motivo NPTH altamente conservado (Figura 17).

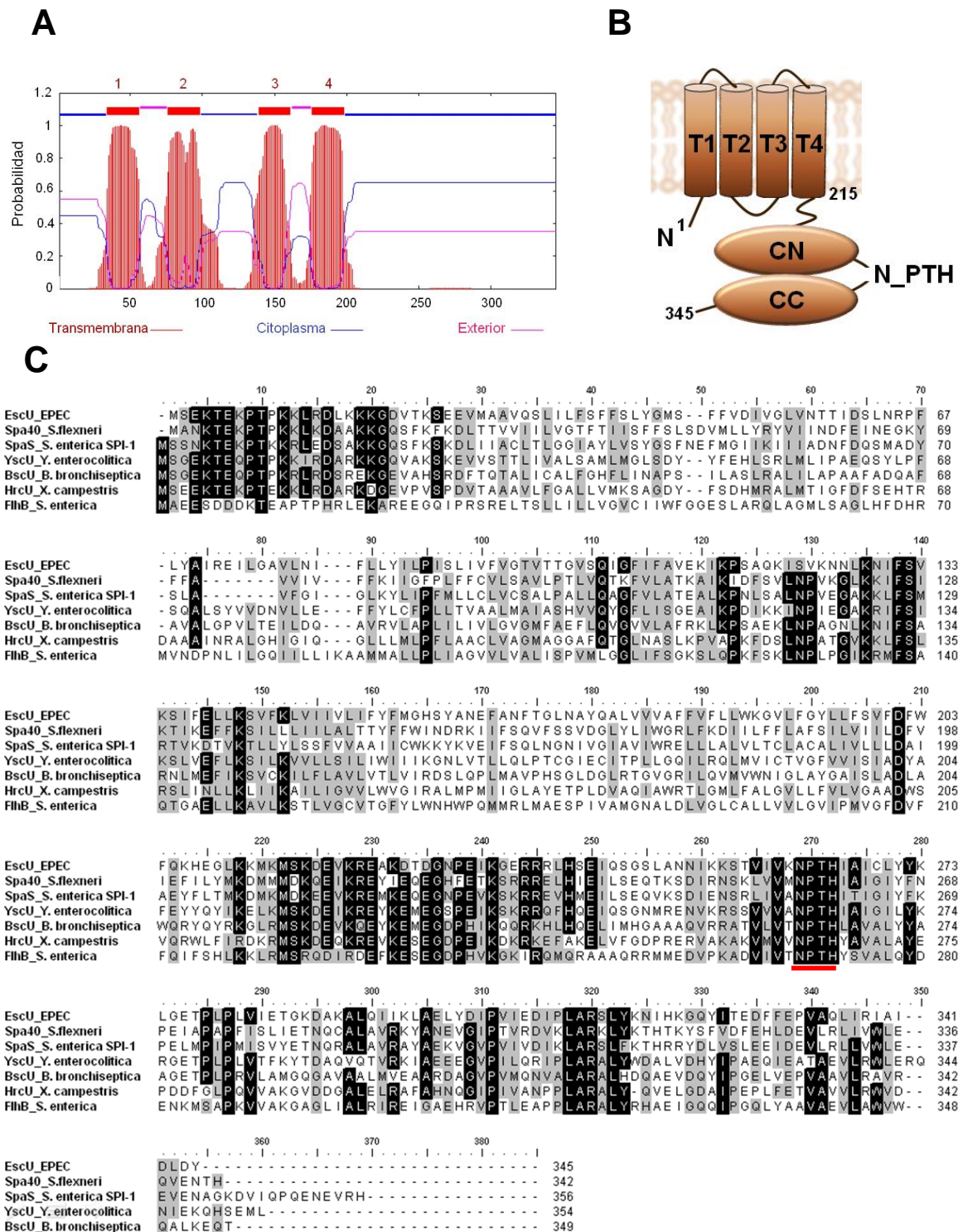


Fig. 17 (A) Cruces transmembranales en EscU. La predicción de hélices transmembranales se realizó en el servidor TMHMM V 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). **(B)** Representación esquemática de la topología de EscU de EPEC. EscU_N tiene cuatro cruces transmembranales (T1-T4), seguidos del dominio C-terminal que se corta en el motivo NPTH y da lugar a dos porciones (EscU_{CC} y EscU_{CN}) que permanecen unidas después del corte. **(C)** Alineamiento múltiple de EscU de EPEC (gi|215267063), Spa40 de *Shigella flexneri* (gi|12329100), SpaS de *Salmonella enterica* (gi|16766193), YscU de *Yersinia enterocolitica* (gi|10955567), BscU

de *Bordetella bronchiseptica* (gi|33600620), HrcU de *Xanthomonas campestris* (gi|78045982) y FlhB del sistema flagelar de *Salmonella enterica* (gi|16503160). El alineamiento se realizó en MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) y se editó con BioEdit (utilizando un umbral del 60%). En negro se marcan los aminoácidos idénticos, en gris los aminoácidos similares y se subraya con rojo el motivo NPTH conservado.

Por otro lado, para encontrar proteínas con similitud de secuencia a EscP, se realizó una búsqueda usando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y las únicas proteínas relacionadas con el SST3 que se mostraron fueron las proteínas homólogas a EscP de los patógenos A/E *Citrobacter rodentium* (CR) y *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). EscP de EPEC comparte 97% de identidad con la proteína Orf16 de EHEC y 78% con Orf16 de CR (Figura 18).

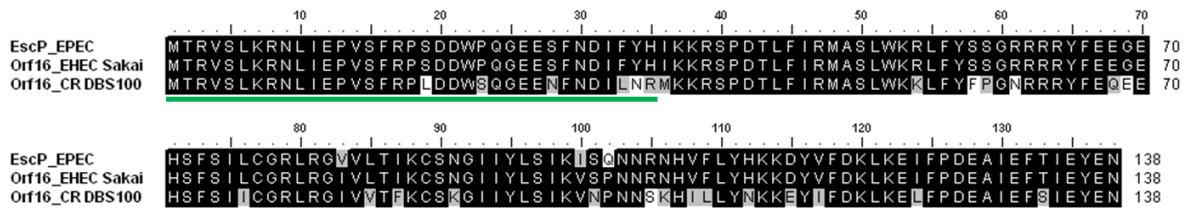


Fig. 18 EscP está conservada en los patógenos A/E. Alineamiento múltiple de EscP de EPEC (gi|2865292), Orf16 de EHEC (gi|15833820) y Orf16 de *C. rodentium* (gi|15723924). El alineamiento se realizó en MUSCLE y se editó con BioEdit (utilizando un umbral del 60%). En negro se marcan los aminoácidos idénticos, en gris los aminoácidos similares y se subraya con verde los primeros 35 aminoácidos de Orf16 de CR que no se reportaron cuando se secuenció el LEE de CR (Deng, Li et al. 2001).

En 2005 el grupo de Pallen (Pallen, Beatson et al. 2005) reportó que en EPEC no existe un claro homólogo de YscP o FliK, pero por contexto genómico sugirió a EscP (Orf16) como posible análogo funcional de las proteínas que regulan la longitud de la aguja (o gancho) del SST3.

En este trabajo, mediante un análisis comparativo, se identificó que el gen *escP* es sinténico a diversos genes de SST3 de patógenos tanto de plantas (*hrpP*) como de animales (*yscP*, *bscP*, *spa32*, *invJ* y *cpn0705*) y al gen flagelar *fliK*; todos (flechas rojas marcadas con asterisco en la Figura 19) se localizan dos genes río abajo del gen que codifica a la ATPasa del sistema (flechas azules en la Figura 19) (Andrade, Pardo et al. 2007), y entre un gen que codifica a una proteína esencial para la secreción (flechas verdes en la Figura 19) (Evans and Hughes 2009; Sal-Man, Biemans-Oldehinkel et al. 2012) y un componente

del aparato de exportación que forma el anillo C (flechas amarillas en la Figura 19) (Morita-Ishihara, Ogawa et al. 2006; Biemans-Oldehinkel, Sal-Man et al. 2011).

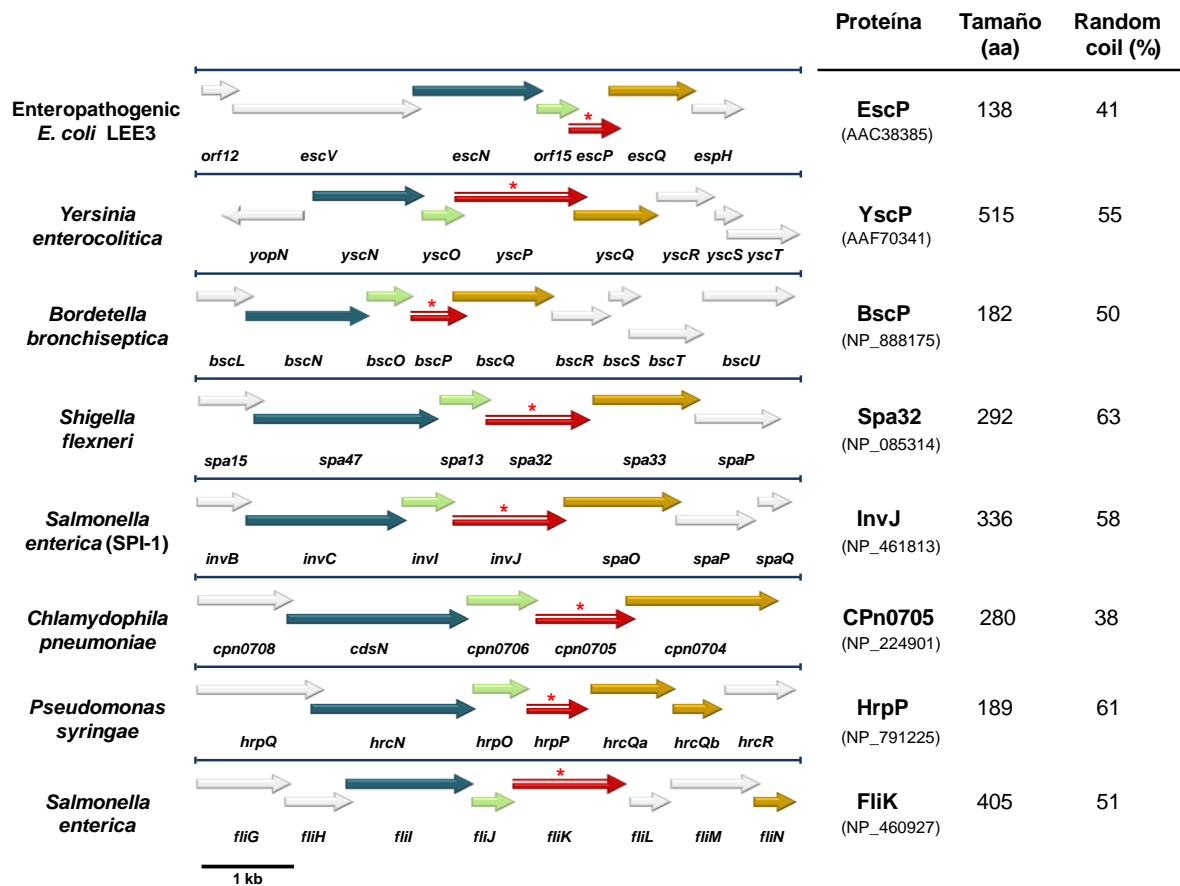


Fig. 19 El gen *escP* es sinténico con los genes de miembros de la familia de proteínas YscP/FliK. Representación esquemática de operones de diversos SST3 de patógenos tanto de animales como de plantas. Los mapas genómicos se obtuvieron de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) y se modificaron manualmente. Del lado derecho se muestran el número de residuos de las proteínas correspondientes (números de acceso entre paréntesis) y el porcentaje de estructura no repetitiva (“*random coil*”) (calculado con SIMPA96, <http://npsa-pbil.ibcp.fr/>).

Las proteínas codificadas por los genes sinténicos a *escP*, como se sugirió previamente (Pallen, Beatson et al. 2005), tienen un alto contenido en estructura no repetitiva (*random coil*) pero difieren en tamaño (Figura 19) y al hacer un alineamiento múltiple se observó que las proteínas no comparten una clara similitud; sin embargo, la porción carboxilo parece ser la región más conservada entre toda la familia (región subrayada con línea verde en la Figura 20A). Al hacer alineamientos pareados de EscP completa con la región

carboxilo de las proteínas de la familia YscP/FliK, se obtuvieron porcentajes de similitud moderada que van del 27 al 37% (Figura 20B).



Fig. 20 EscP es similar al carboxilo de la familia YscP/FliK. (A) Alineamiento múltiple de EscP de EPEC (gi2865292), BscP (NP_888175) de *Bordetella bronchiseptica*, Spa32 (NP_085314) de *Shigella flexneri*, InvJ (NP_461813) de *Salmonella enterica*, CPn0705 (NP_224901) de

Chlamydomophila pneumonia, HpaC (YP_362155) de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, HrpP (NP_791225) de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, YscP (NP_395176) de *Yersinia pestis*, YscP (AAF70341) de *Yersinia enterocolitica*, FliK (NP_460927) de *Salmonella enterica*, y FliK (YP_002329574) de EPEC. El alineamiento se realizó en MUSCLE y se editó con BioEdit. En negro se marcan los aminoácidos idénticos, en gris los aminoácidos similares, se subraya con azul la región más conservada y se enmarca en amarillo la firma P-x(1,2)-L-G. **(B) Porcentajes de identidad y similitud** obtenidos de alineamientos pareados (usando Stretcher, http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/) de EscP con el carboxilo (porción subrayada en azul de A) de diferentes proteínas de la familia YscP/FliK.

Está reportado que el carboxilo de YscP y FliK tiene características globulares, un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos, un plegamiento predicho α/β , una firma P-x-L-G; asimismo, se vio que esta región está involucrada en la secreción de sustratos y a este dominio se le denominó T3S4 (*Type III Secretion Substrate Specificity Switch*) (Agrain, Callebaut et al. 2005; Minamino, Ferris et al. 2006). En este estudio se realizó la predicción de la estructura secundaria (utilizando SIMPA96) para conocer si EscP comparte alguna de las características del dominio T3S4, y se encontró que para EscP se predice 36% de α hélices y 20% de hojas β , que difiere moderadamente en la cantidad de estructuras β cuando se compara con el contenido predicho para YscP (39% de α hélices y 5% de hojas β) y para FliK (39% de α hélices y 8% de hojas β). También se hizo una búsqueda (utilizando ScanProsite) de la firma P-x-L-G en EscP y aunque se confirmó la presencia de la firma en YscP, FliK y HrpP, encontramos que no es una característica compartida con todos los miembros de la familia, incluyendo a EscP (Figura 18 A, recuadro amarillo).

2. Purificación de proteínas y producción de anticuerpos

Con el objetivo de generar anticuerpos policlonales, se produjeron versiones recombinantes de EscP y del dominio carboxilo soluble de EscU (EscU_C: aminoácidos 215 al 345). *escP* y *escU_C* se clonaron en el vector de expresión pET19b que añade una etiqueta de 10 histidinas en el amino terminal de las proteínas. Las células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS (BDP) se transformaron con los plásmidos pJEo16 y pJEeU_C y los cultivos se indujeron como se describió anteriormente en materiales y métodos. Se estandarizaron las condiciones óptimas de expresión de las proteínas recombinantes y se determinó la solubilidad de las mismas.

En la Figura 21A se muestra el perfil de inducción de His-EscP que migra a la altura de su masa molecular predicha con la etiqueta (17.95 kDa) y se observó que la cantidad de proteína no se incrementa al aumentar el IPTG.

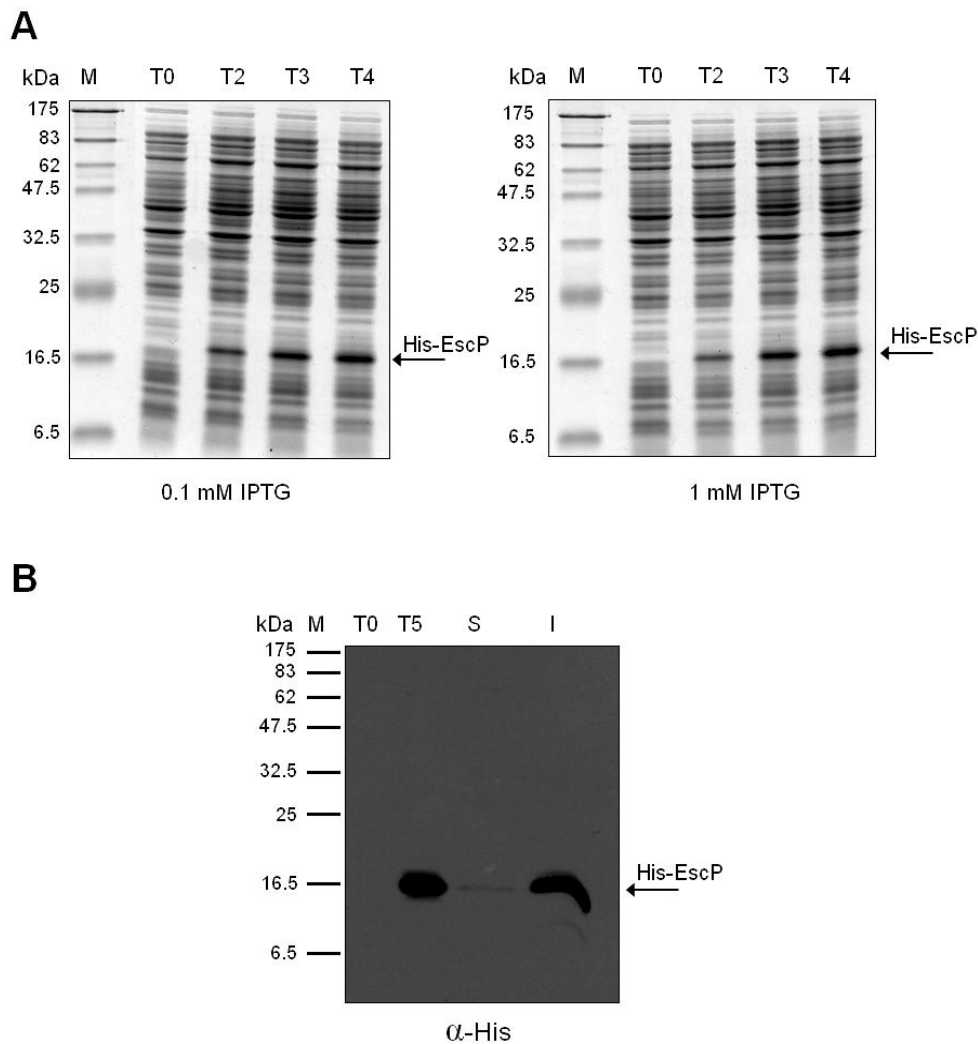


Fig. 21 (A) Perfil de inducción de la proteína His-EscP (17.95 kDa) a 30 °C. M: Marcador; T0-T5: horas después de la inducción con diferentes concentraciones de IPTG. SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie. **(B) Solubilidad de His-EscP.** Inmunodetección de His-EscP con anticuerpos anti-His en diferentes fracciones celulares. M: marcador; T0 y T5: horas después de la inducción con IPTG; S: fracción soluble y I: fracción insoluble.

La predicción de solubilidad al sobreexpresar His-EscP en *E. coli*, usando diferentes servidores (<http://www.biotech.ou.edu> y <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) sugirieron que la proteína recombinante tenía alta probabilidad de formar cuerpos de inclusión y permanecer en la fracción insoluble. La hipótesis anterior se corroboró experimentalmente y como se muestra en la Figura 21B, al hacer el fraccionamiento celular y detectar a la

proteína con anticuerpos anti-histidinas, se observó que casi en su totalidad His-EscP se encuentra en la fracción insoluble sin importar la cantidad de IPTG que se añada (mostrado sólo para 1 mM de IPTG).

La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina acoplada a níquel (Ni-NTA, Qiagen) y debido a la insolubilidad de His-EscP, se realizó utilizando 6 M de urea como agente desnaturizante. A pesar de que se hicieron diversas modificaciones en el protocolo de purificación (diferentes temperaturas, concentraciones de IPTG, diferente agente caotrópico, aumento en la concentración de urea, volumen de cultivo y de resina Ni-NTA), His-EscP no se une eficientemente a la resina y sólo se logró obtener poca proteína recombinante, que eluyó con algunas otras proteínas contaminantes (Figura 22).

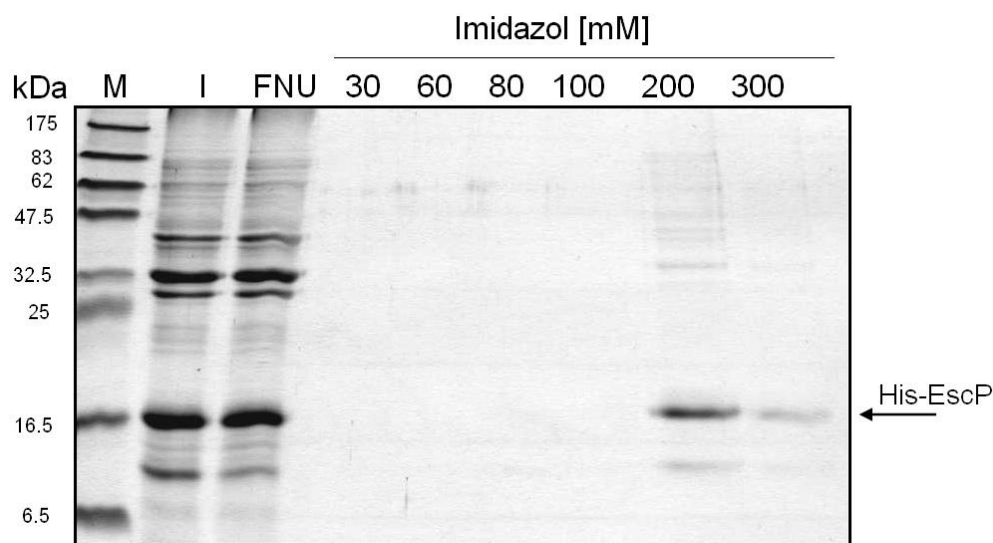


Fig. 22 Perfil de purificación de His-EscP en condiciones desnaturizantes utilizando 6 M de urea. SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie. M: marcador; I: fracción insoluble; FNU: fracción no unida a la resina. 30-300: lavados y eluciones con concentraciones crecientes de imidazol.

Ya que His-EscP no se logró purificar con un alto rendimiento, se consideró que probablemente la proteína no se pegaba a la columna porque la etiqueta de histidinas en el N-terminal estaba oculta o de alguna manera afectaba su conformación, así que se decidió clonar a *escP* en el vector pET23b, para expresar a EscP con una etiqueta de His₆ en el C-terminal (EscP-His). Para obtener los parámetros óptimos de expresión de EscP-His, la proteína se indujo a diferentes temperaturas y con diferentes concentraciones de IPTG. Se

encontró que induciendo a 20 °C se obtienen mejores resultados de expresión, mientras que el modificar la cantidad de IPTG (0.1, 0.5 y 1 mM) no mejoró la cantidad de proteína producida (Figura 23 y datos no mostrados). Al hacer la predicción teórica de la solubilidad de EscP-His usando diferentes servidores (<http://www.biotech.ou.edu> y <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) se predijo que la proteína se encontraba en la fracción insoluble y este resultado se comprobó mediante inmunodetección utilizando anticuerpos anti-histidinas (Figura 23B y datos no mostrados).

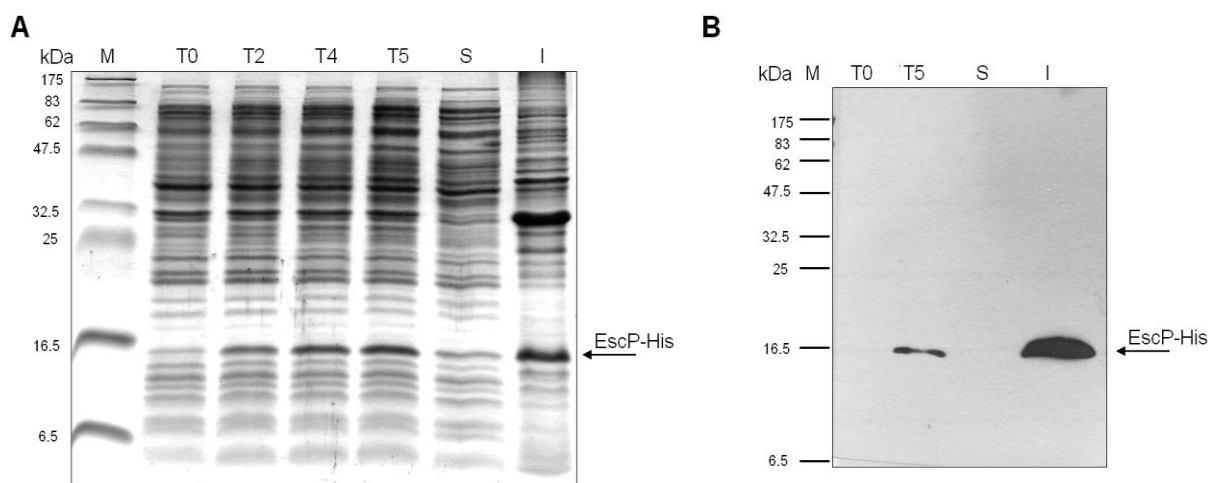


Fig. 23 (A) Perfil de inducción de la proteína EscP-His (17.9 kDa) a 20 °C y 0.1 mM IPTG. SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie. M: Marcador; T0-T5: horas después de la inducción con IPTG. (B) Solubilidad de EscP-His. Inmunodetección con anticuerpos anti-His en diferentes fracciones celulares. M: marcador; T0 y T5: horas después de la inducción con IPTG; S: fracción soluble e I: fracción insoluble.

La proteína EscP-His se purificó utilizando 6 M de urea. A pesar de que se hicieron diversas modificaciones en el protocolo de purificación sólo se logró obtener poca proteína pura, que eluyó con otras proteínas contaminantes (datos no mostrados).

Ya que el principal objetivo de purificar a EscP era la generación de anticuerpos policlonales, se decidió realizar un protocolo en el cual a partir de cantidades considerables de His-EscP (sin importar la presencia de proteínas contaminantes), la banda correspondiente a His-EscP se cortó del gel de poliacrilamida, se homogeneizó con un mortero y se utilizó para la inoculación de un conejo. Los anticuerpos obtenidos por esta técnica, aunque reconocen a la proteína His-EscP, no fueron capaces de reconocer a EscP en un lisado total de EPEC (datos no mostrados).

Como otra alternativa para purificar a EscP, se clonó a *escP* en el vector pMal-c2x que añade una etiqueta de MBP (proteína de unión a maltosa) en el amino terminal; se ha reportado que este vector aumenta la solubilidad de la proteína de interés y permite la purificación en condiciones nativas. Al analizar el perfil de expresión de la proteína con 0.3 mM de IPTG a 37°C (Figura 24A), se observó que se induce una proteína de la masa molecular esperada para MBP-Orf16 (56 kDa), el resultado se corroboró haciendo inmunodetección utilizando anticuerpos anti-MBP (Figura 24B). La proteína MBP-EscP se purificó utilizando una resina de amilosa en condiciones nativas a partir de la fracción celular soluble (Figura 24C) y se utilizó para inmunizar un conejo. Sin embargo, los anticuerpos obtenidos, aunque sí fueron capaces de reconocer a MBP-EscP y a MBP sola, no fueron capaces de reconocer a EscP nativa ni a diferentes versiones recombinantes de EscP (His-EscP y EscP-HA) (datos no mostrados). Con respecto a la generación de anticuerpos policlonales anti-EscP, con los resultados mostrados se concluye que EscP es una proteína poco inmunogénica o que las cantidades silvestres de EscP en los extractos totales son indetectables por Western blot.

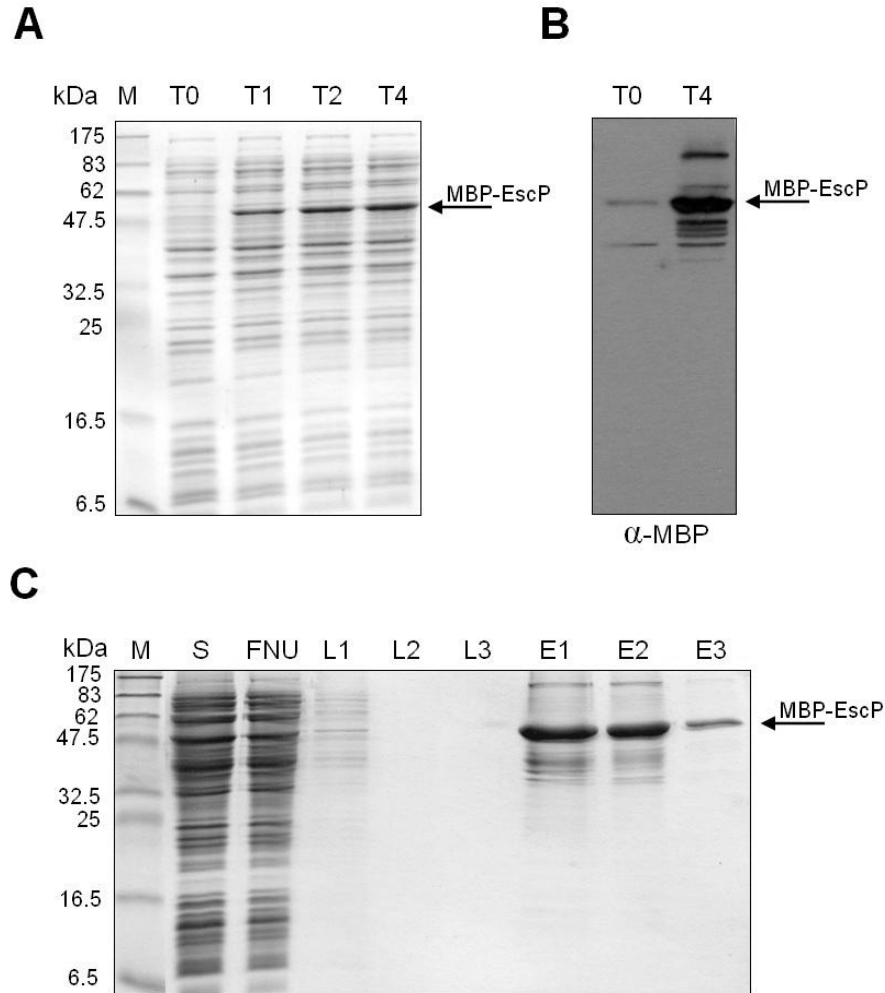


Fig. 24 (A) Perfil de inducción de la proteína MBP-EscP (56 kDa) a 37 °C y con 0.3 mM de IPTG. M: Marcador; T0-T4: horas después de la inducción con IPTG. (B) Inmunodetección de MBP-EscP. Inmunodetección con anticuerpos anti-MBP a las 0 (T0) y 4 horas (T4) después de la inducción con IPTG. **(C) Perfil de purificación de MBP-EscP en condiciones nativas.** M: marcador; S: fracción soluble; FNU: fracción no unida a la resina. L1-L3: lavados y E1-E3 eluciones con 10 mM de maltosa. A y C SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie.

Como se mencionó al inicio de la sección, para generar una versión recombinante de EscU, se clonó la porción carboxilo soluble de la proteína (EscU_C aminoácidos 215 al 345) en el vector pET19b y la proteína recombinante se expresó en la cepa de *E. coli* BDP. En la Figura 25A se muestra el perfil de inducción de His-EscU_C y se observó que no es clara la expresión de la proteína completa His-EscU_C (17.2 kDa), sin embargo, se observaron dos bandas inducidas en la masa molecular aproximada esperada para las porciones EscU_{CC} (9.4 kDa) y His-EscU_{CN} (7.8) después del corte autoproteolítico de la proteína; ambas versiones de EscU_C permanecen en la fracción soluble. Para corroborar las predicciones anteriores, se hizo una inmunodetección de diferentes fracciones utilizando un anticuerpo anti-His y se

observó que la versión que reconocen las histidinas corresponde a His-EscU_{CN} la cual migra con una masa molecular aproximada a lo predicho (7.8 kDa) y también se encontró que efectivamente la proteína permanecía en la fracción soluble (Figura 25B).

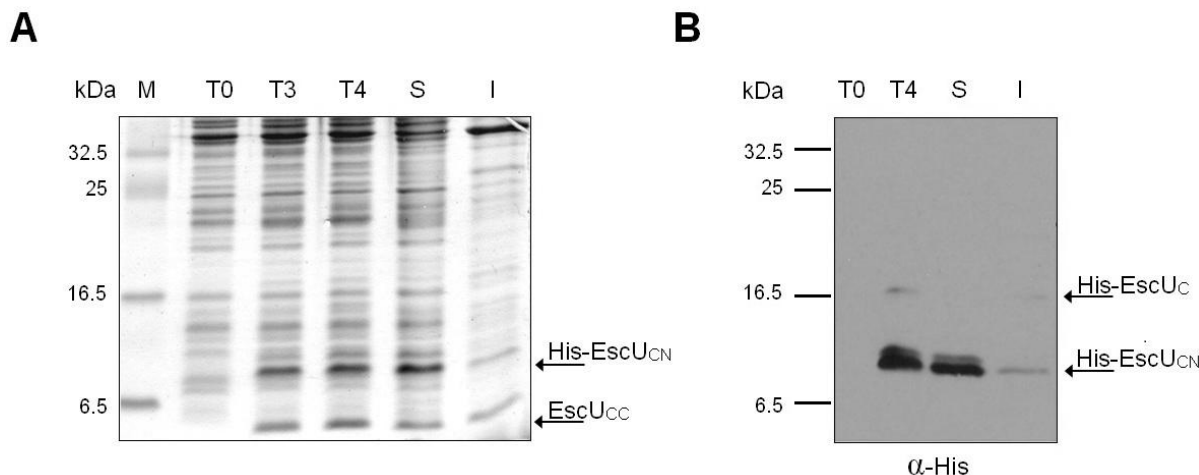


Fig. 25 (A) Perfil de inducción de la proteína His-EscU_C a 30 °C y con 0.5 mM de IPTG. SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie. M: Marcador; T0-T5: horas después de la inducción con IPTG. (B) Solubilidad de His-EscU_C. Inmunodetección con anticuerpos anti-His en diferentes fracciones celulares. M: marcador; T0-T4: horas después de la inducción con IPTG; S: fracción soluble e I: fracción insoluble.

Sabiendo que la proteína His-EscU_C permanecía en la fracción soluble, se purificó mediante cromatografía de afinidad. En la Figura 26A se presenta el perfil de purificación de His-EscU_C en donde se observaron las diferentes formas de la proteína autoproteolizada (flechas). Con este resultado se confirmó la casi total autoproteólisis de EscU_C, resultando en dos porciones (EscU_{CN} y EscU_{CC}) que permanecen estrechamente unidas al ser copurificadas. His-EscU_{CN} migró a la masa esperada (7.8 kDa), mientras que EscU_{CC} migró por debajo de la masa esperada (9.4 kDa). Creemos que la migración anómala pudo deberse a su bajo punto isoelectrico (4.9), como se ha reportado para otras proteínas ácidas (Armstrong and Roman 1993; Gonzalez-Pedrajo, Fraser et al. 2002), incluyendo a la proteína de la aguja MxiH (Cordes, Komoriya et al. 2003) y EscF (Tesis licenciatura J. Monjarás Feria, 2007). La proteína His-EscU_C purificada, se dializó, cuantificó y se utilizó para inmunizar un conejo (4 inmunizaciones en total) y obtener anticuerpos policlonales (Figura 26B).

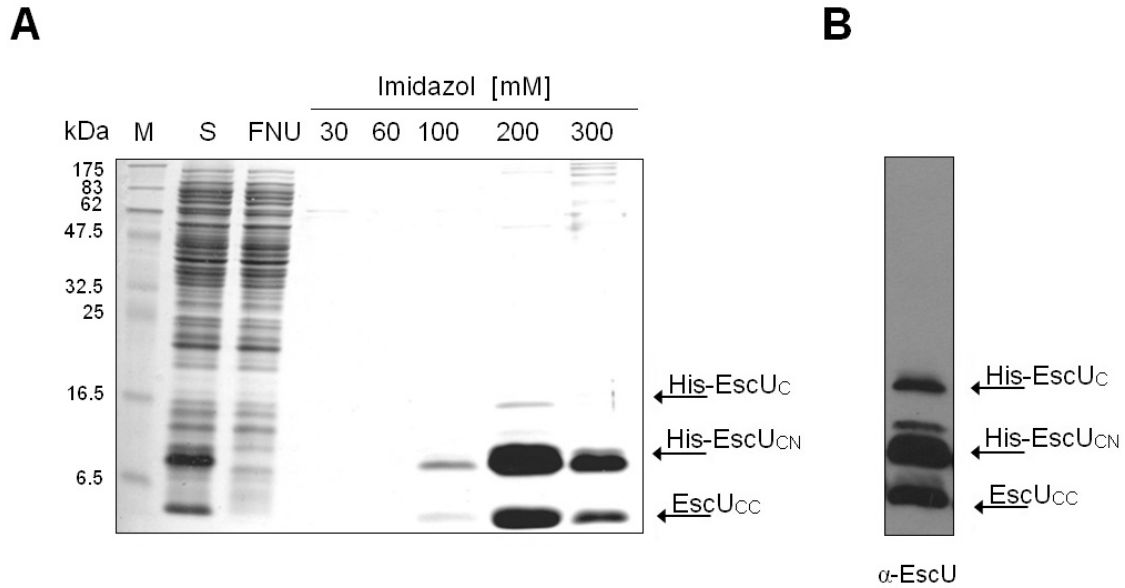


Fig. 26 (A) Perfil de purificación de His-EscU_C. SDS-PAGE 16.5% teñido con azul de Coomassie. M: marcador; S: fracción soluble; FNU: fracción no unida a la resina. 30-300: lavados y eluciones con concentraciones crecientes de Imidazol. **(B) Anticuerpos anti-EscU_C.** Inmunodetección de His-EscU_C purificada utilizando los anticuerpos anti-EscU_C policlonales obtenidos a partir de la inmunización de conejo.

3. EscP regula la secreción de translocadores y efectores

Para conocer el papel de EscP en la secreción de proteínas a través del SST3, se construyó una cepa de EPEC mutante nula en el gen *escP* insertando un casete de resistencia a kanamicina (kan), mediante la técnica de recombinación homóloga utilizando el sistema Red del fago λ (Datsenko and Wanner 2000).

La inserción del casete en el lugar esperado se analizó mediante PCR utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos tanto internos al casete de kan como externos al mismo que se alinean a los genes *orf15* o *escQ* (Figura 27A). En la Figura 27B se observó que en todas las reacciones se obtuvieron productos con tamaños iguales a los esperados con la inserción del casete de kan en lugar de *escP*.

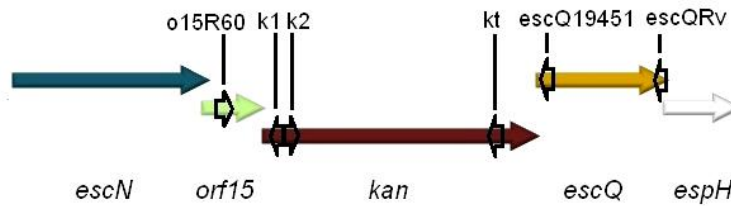
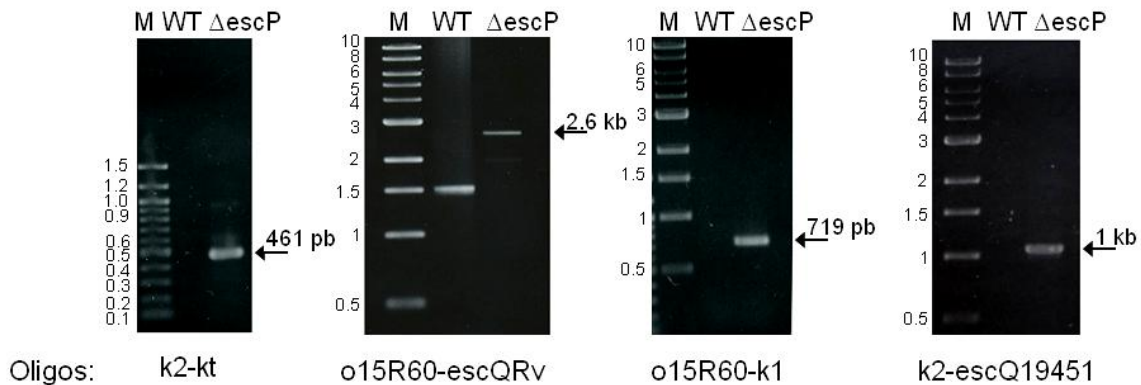
A**B**

Fig. 27 (A) Esquema de localización de oligonucleótidos (flechas negras sobre los genes) utilizados para confirmar la inserción del casete de kanamicina en lugar de *escP*. **(B) Productos de PCR** obtenidos con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos para confirmar la inserción del casete de kanamicina. Con las flechas se señalan los productos esperados en una cepa EPEC $\Delta escP::kan$. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Ya que dentro de la región de recombinación se encuentra el codón de paro de *orf15* y el codón de inicio de *escQ*, los productos obtenidos en las PCR utilizando los oligonucleótidos *o15R60-k1* y *k2-escQ19451* se secuenciaron para asegurarnos de que no se hubiera generado alguna mutación que pudiera afectar la expresión de dichos genes. Los resultados mostraron que dentro de estas regiones no hubo ninguna alteración (datos no mostrados).

Se analizó la capacidad de secreción tipo 3 de la cepa mutante $\Delta escP$. En la Figura 28 se muestra el perfil de secreción típico de la cepa EPEC silvestre (WT), tanto teñido con azul de Coomassie como por inmunodetección, en el que se observó a: (i) las proteínas translocadoras EspD, EspB y EspA, (ii) los efectores Tir y EspF (identificados por Western blot) y (iii) al autotransportador EspC; el perfil de secreción de una cepa mutante nula en el gen que codifica a la ATPasa del sistema ($\Delta escN$) y en la que no hay secreción de proteínas a través del SST3. En contraste con los niveles de secreción de la cepa WT, la mutante

ΔescP secreta niveles reducidos de translocadores pero muestra un claro aumento de Tir (observado incluso en el gel teñido con azul de Coomassie) y un ligero aumento en la secreción de EspF. Para tener los datos cuantitativos sobre la secreción reducida de translocadores y aumentada de efectores, se llevó a cabo un análisis densitométrico (datos en la Figura 28, panel S) de los Western blots, revelando que en la mutante *ΔescP* la secreción de EspB disminuye un 40% comparado con los niveles secretados en la cepa WT, mientras que Tir aumenta al doble y EspF en un 25%.

Adicionalmente se llevó a cabo la complementación de la cepa *ΔescP* con el plásmido pJTo16 que expresa la versión silvestre de EscP y como se observó en la Figura 28, se recuperaron los niveles silvestres de todas las proteínas. Este resultado confirma que el fenotipo observado en la cepa *ΔescP* se debió sólo a la ausencia de EscP y que la mutante no es polar.

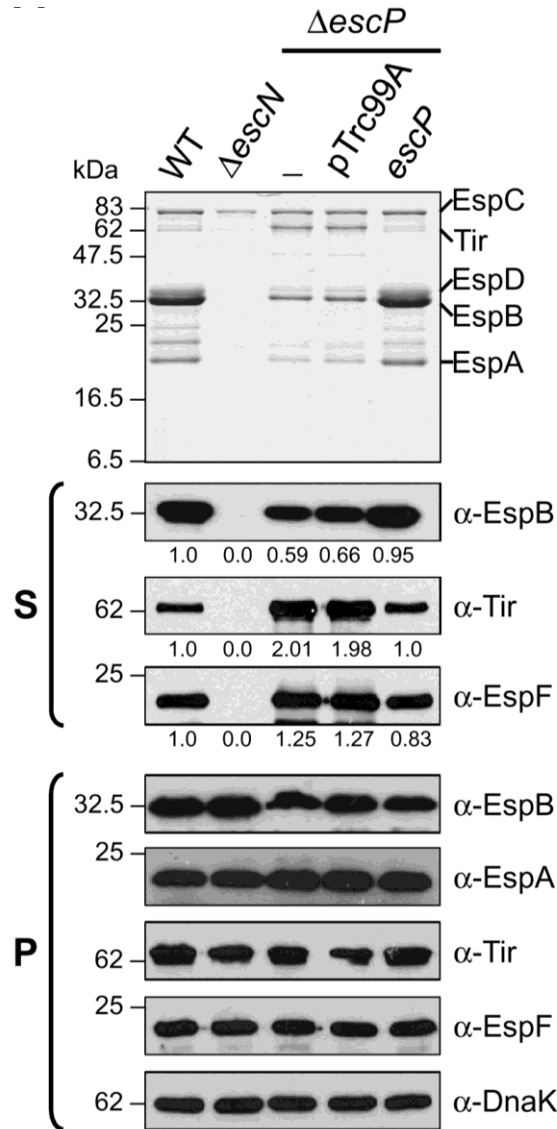


Fig. 28 Perfil de secreción de la cepa EPEC mutante $\Delta escP::kan$. Proteínas secretadas en medio DMEM de las cepas EPEC silvestre (WT), $\Delta escN$ (deficiente en la ATPasa del SST3), $\Delta escP$ (-), $\Delta escP$ con el vector vacío (pTrc99A) y $\Delta escP$ expresando el vector pTrc99A-escP (escP). Se muestran tanto el gel SDS 15% teñido con azul de Coomassie (panel superior) como la inmunodetección de las proteínas secretadas (panel S) y de pastillas celulares totales (panel P) utilizando anticuerpos policlonales anti-EspB, anti-EspA, anti-Tir, anti-EspF y anti-DnaK. El análisis densitométrico de los Western blots de las proteínas secretadas se realizó con el programa Scion Image (Scion Corporation).

Para conocer si el fenotipo se debía a cambios en la expresión de alguna de las proteínas secretadas por el inyectisoma, se analizaron por inmunodetección a los translocadores EspA y EspB y a las proteínas efectoras Tir y EspF en los lisados celulares totales obtenidos en los ensayos de secreción. En la Figura 28 (panel P) se muestra que en todas las cepas todas

las proteínas son estables y se sintetizan a niveles similares. La chaperona DnaK se usó como control de carga.

Ya que encontramos una secreción diferencial de los efectores Tir y EspF en la cepa $\Delta escP$, quisimos examinar la secreción de otros efectores tanto codificados dentro de la isla LEE como fuera de ella (Nle's). Los genes de EPEC *espH*, *map*, *tir*, *nleC*, *nleD*, *nleH* y *nleI* se clonaron en el vector pTOPO-2HA que incorpora un doble epítotope de hemaglutinina (HA) en el C-terminal. Todos los plásmidos se introdujeron por electroporación en las cepas WT, $\Delta escN$ y $\Delta escP$ y se analizó por Western blot la producción y secreción de las diferentes proteínas etiquetadas utilizando anticuerpos anti-HA. Al comparar con la secreción en la cepa silvestre, los efectores NleC, NleH, NleI, EspH, Map y Tir se secretaron más en ausencia de *escP*, mientras que NleD se secretó a niveles silvestres (Figura 29, panel S). Cabe mencionar que la hipersecreción de Tir en la mutante $\Delta escP$ se observó tanto con la proteína silvestre expresada de cromosoma y detectada con anticuerpos específicos anti-Tir (Figura 28 y 29), como con la proteína etiquetada y sobre-expresada en plásmido, indicando que la hipersecreción de la versión Tir-HA no se debe a un efecto multicopia. Ninguno de los efectores se secretó en la cepa $\Delta escN$, indicando una secreción dependiente del SST3. Además, se hizo inmunodetección de los lisados celulares totales y se vio que todas las proteínas se expresaron de manera similar en las cepas WT, $\Delta escN$ y $\Delta escP$ (Figura 29, panel P). DnaK se usó como control de carga para pastillas celulares y lisis en sobrenadantes, mientras que EspC se usó como control de carga en sobrenadantes (se muestra sólo para Tir).

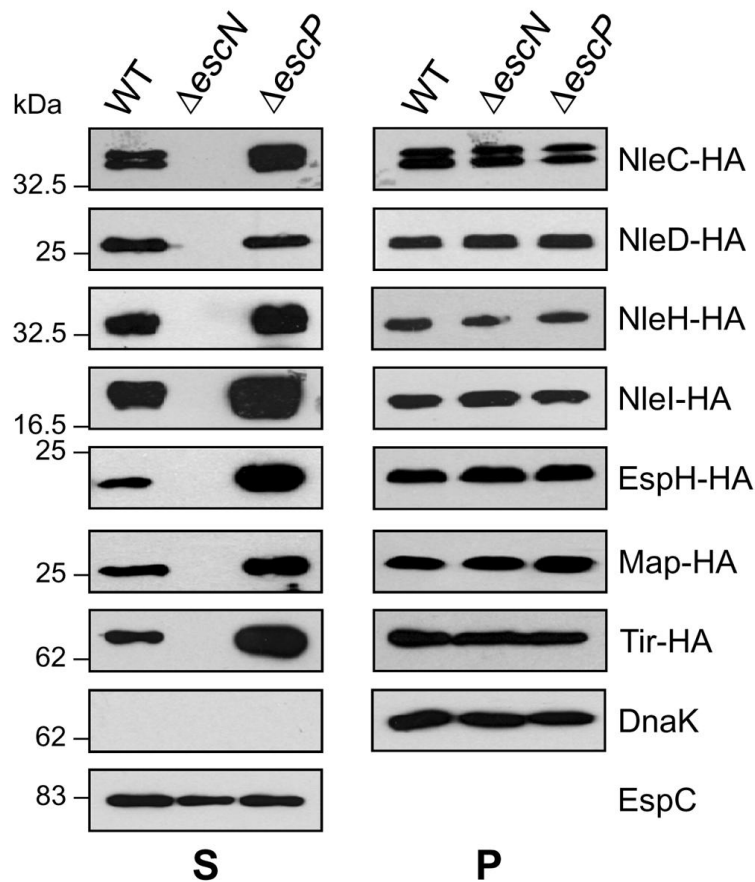


Fig. 29 Secreción de efectores etiquetados con HA en la cepa EPEC mutante $\Delta escP::kan$. Perfil de secreción de las cepas EPEC silvestre (WT), $\Delta escN$ (deficiente en la ATPasa del SST3) y $\Delta escP$ transformadas con el vector pTOPO-2HA conteniendo los efectores NleC-HA (39.6 kDa), NleD-HA (28.3 kDa), NleH1-HA (36.3 kDa), NleI-HA (22.7 kDa), EspH-HA (22.4 kDa), Map-HA (24.9 kDa) y Tir-HA (72 kDa) clonados. Se muestran la inmunodetección de las proteínas secretadas (panel S) y de pastillas celulares totales (panel P) utilizando anticuerpo anti-HA.

Con los resultados de este apartado demostramos que EscP se requiere para la eficiente secreción de translocadores (en la mutante $\Delta escP$ su secreción se redujo un $\approx 45\%$) y para el control en la secreción de varios efectores (en la mutante $\Delta escP$ su secreción se mantiene en niveles silvestres o se aumenta).

Como vimos en la Figura 28, la mutante $\Delta escP$ se complementó con una versión silvestre de EscP. Para conocer la funcionalidad de diferentes versiones recombinantes de EscP, probamos complementaciones de la mutante $\Delta escP$ con EscP etiquetada tanto con histidinas en la región amino como carboxilo terminal y también como con una versión de EscP en un plásmido de un menor número de copia. En la Figura 30 se muestra que todas las versiones recombinantes His-EscP, His-FLAG-EscP, EscP-His, así como la versión de

EscP en el vector pACTrc (de bajo número de copia) complementaron la secreción de la cepa $\Delta escP$ incluso sin añadir IPTG, indicando que todas las versiones son funcionales y que las etiquetas en cualquier extremo de la proteína no afectan su función en cuanto a la regulación de la secreción. Asimismo se demuestra que se requieren bajos niveles de EscP para llevar a cabo su función.

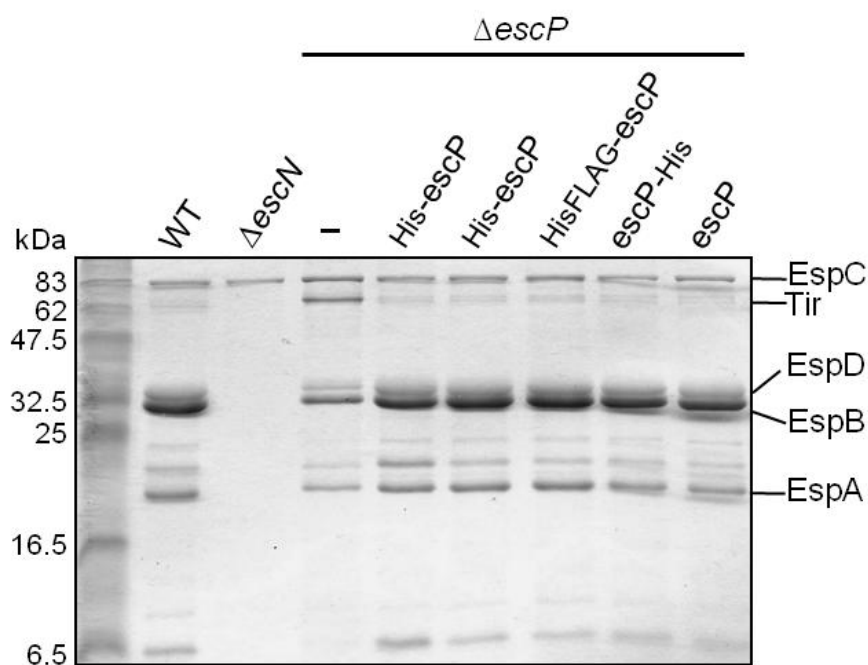


Fig. 30 Complementaciones de la cepa EPEC mutante $\Delta escP::kan$. Proteínas secretadas en medio DMEM de las cepas EPEC silvestre (WT), $\Delta escN$ (deficiente en la ATPasa del SST3), $\Delta escP$ (-) y $\Delta escP$ expresando diferentes versiones de EscP: His-EscP (pJTncHo16), His-EscP (pJEo16), His-FLAG-EscP (pJEFo16), EscP-His (pJE23bo16) y EscP (pJATo16). Se muestra el gel SDS 15% teñido con azul de Coomassie.

Se ha reportado que la sobreproducción de algunas proteínas del SST3 en la cepa silvestre, ocasiona una disminución en la secreción de proteínas o en el nado (en el caso de SST3 flagelar), sugiriendo que la proteína en cuestión interacciona con componentes esenciales para la secreción. Para saber si EscP tiene un efecto multicopia negativo sobre la secreción de proteínas en EPEC WT, se sobreprodujo a EscP con diferentes etiquetas y sin etiqueta y se hicieron ensayos de secreción con y sin IPTG. Encontramos que aunque EscP se sobreproduzca *in trans*, no se afecta la secreción silvestre de proteínas vía el SST3 (Figura 31).

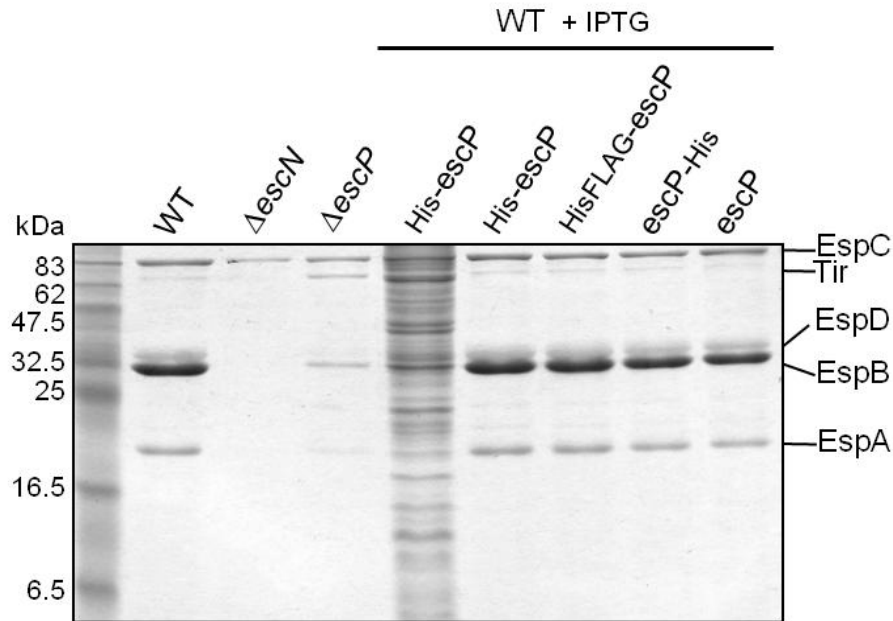


Fig. 31 Efecto multicopia de *escP* en EPEC WT. Proteínas secretadas en medio DMEM de las cepas EPEC silvestre (WT), $\Delta escN$ (deficiente en la ATPasa del SST3), $\Delta escP$ y $\Delta escP$ expresando diferentes versiones de *escP*: His-*escP* (pJTncHo16), His-*EscP* (pJEo16), His-FLAG-*escP* (pJEFo16), *escP*-His (pJE23bo16) y *escP* (pJATo16). Se muestra el gel SDS 15% teñido con azul de Coomassie.

4. *EscP* regula la longitud de la aguja del inyectisoma de EPEC

La capacidad de la mutante $\Delta escP$ de secretar cierta cantidad de proteínas translocadoras sugiere que existen, al menos parcialmente, inyectisomas funcionales. Como se mencionó en el análisis bioinformático, se sugirió a *EscP* como posible análogo de proteínas que regulan la longitud del gancho o aguja en diversos SST3 incluyendo al flagelo. Para determinar el papel de *EscP* en la biogénesis del SST3 de EPEC, se diseñó y estandarizó un protocolo para purificar los inyectisomas y poder observarlos al microscopio electrónico de transmisión (ver materiales y métodos).

En la Figura 32 se muestra una serie de inyectisomas purificados de la cepa EPEC WT, se observó que presentaron longitudes variables desde 180 hasta 500 nm e incluso se llegaron a ver algunos de más de 800 nm.

Se ha reportado que el diámetro de la aguja (9 nm) es menor que el del filamento (12 nm) (Sekiya, Ohishi et al. 2001; Ogino, Ohno et al. 2006), por lo que, tomando como referencia estos datos, se pudo distinguir el límite entre las dos estructuras poliméricas (aunque esto no es muy claro en algunas de las imágenes). Se seleccionaron los inyectisomas en los que se observó bien el final de la aguja y se hicieron mediciones (utilizando en programa Image J) de las longitudes tanto de la aguja como del filamento.

Para los filamentos EspA de la cepa EPEC WT, encontramos longitudes desde 157 hasta 827 nm con un promedio de 333 nm. No se conoce el mecanismo de regulación de la longitud del filamento, se ha propuesto que la longitud depende de la cantidad de subunidades de EspA disponibles en el citoplasma y que en la cepa EPEC WT puede llegar a medir hasta 700 nm, mientras que en una cepa que sobreexpresa EspA pueden llegar a medir hasta 1,300 nm (Sekiya, Ohishi et al. 2001).

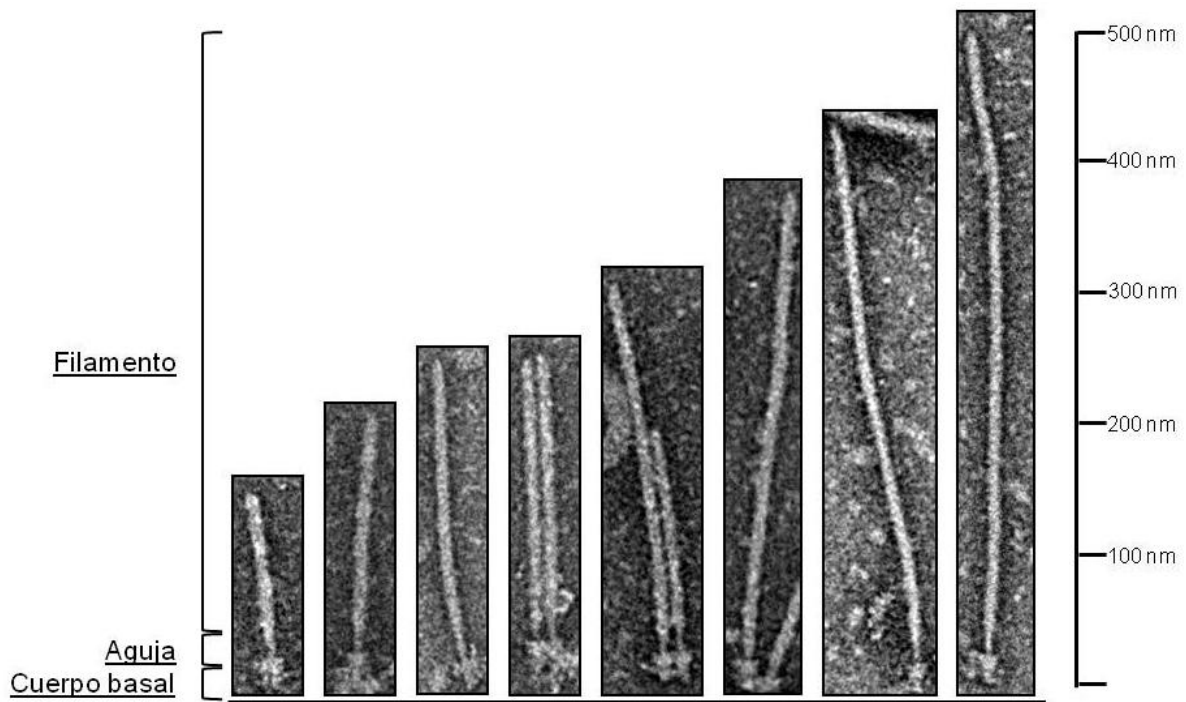


Fig. 32 Inyectisomas purificados de la cepa EPEC WT. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de inyectisomas teñidos con PTA 2%. Las fotografías se tomaron a 20,000X de magnificación y las medidas se calcularon con el programa Image J.

En el caso de la aguja ensamblada en la cepa EPEC silvestre, encontramos que las longitudes oscilaron entre 15 y 37 nm con un promedio de 23 nm (Figura 33). Este resultado difiere de lo encontrado en otros estudios en donde se reportó que la longitud de

la aguja es de 40-50 nm (Daniell, Takahashi et al. 2001; Shaw, Daniell et al. 2001; Wilson, Shaw et al. 2001). Creemos que la diferencia podría deberse a las diferentes metodologías utilizadas tanto en el crecimiento de EPEC (ya que algunos experimentos fueron hechos con bacterias completas infectando células HeLa) como al programa utilizado para medir las longitudes.

Para el caso de los inyectisomas purificados de la cepa $\Delta escP$, encontramos que las agujas ensambladas por la mutante llegaban a ser hasta 5 veces más largas (127 nm) que las de la cepa WT (Figura 33).

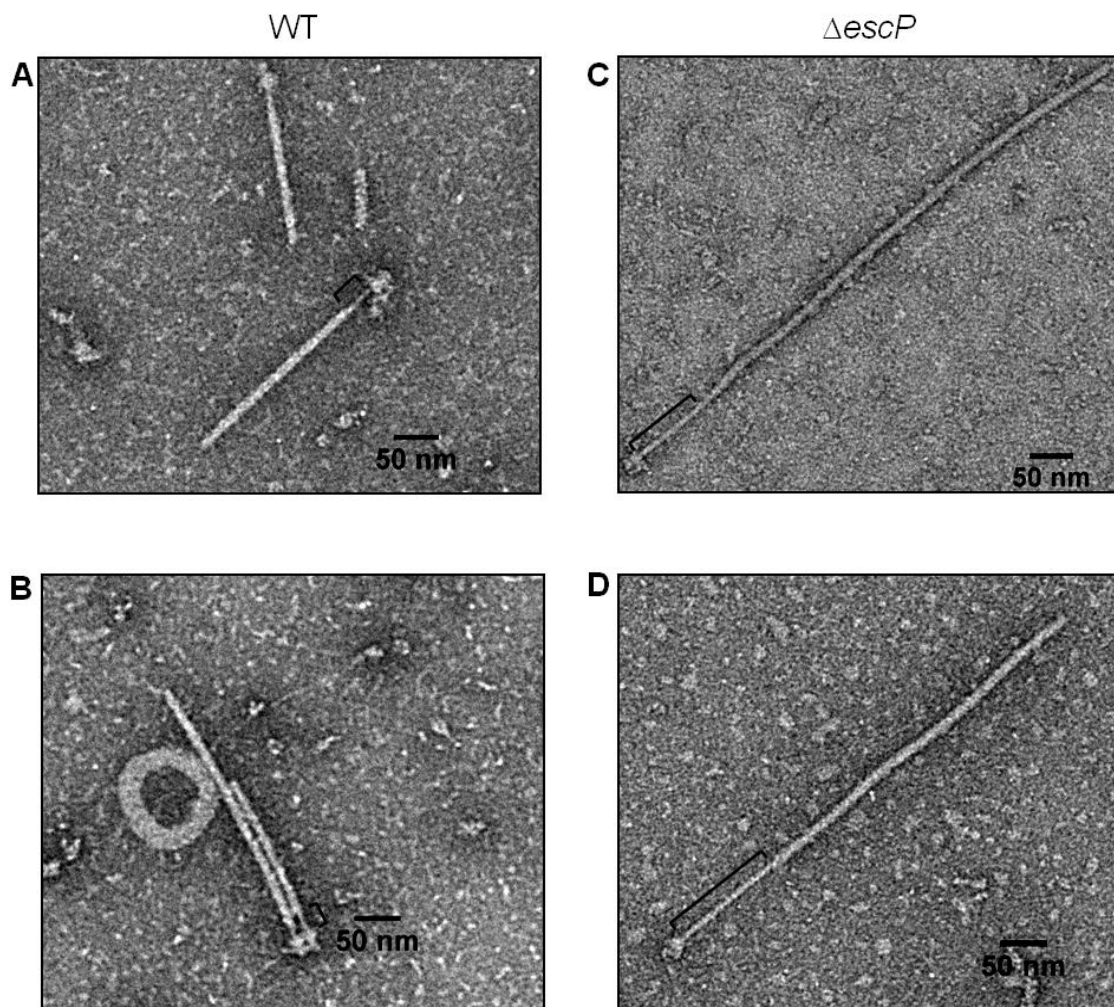


Fig. 33 Inyectisomas purificados de la cepa EPEC WT (A y B) y $\Delta escP$ (C y D). Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de inyectisomas teñidos con PTA 2%. Los corchetes indican la región correspondiente a la aguja del inyectisoma. Las fotografías se tomaron a 20,000X de magnificación y las medidas se calcularon con el programa Image J.

Sorpresivamente, los inyectisomas de la mutante ensamblan filamento EspA aún sobre agujas de longitud desregulada (Figura 33). Es importante mencionar que en la mutante $\Delta escP$ también se encontraron inyectisomas con aguja de longitud silvestre (21 nm) (dato no mostrado).

Las longitudes de los filamentos ensamblados por la mutante $\Delta escP$ fueron de entre 330 hasta más de 1,000 nm, lo cual, es ligeramente mayor a los observados en la cepa silvestre. En la Figura 34 se muestran dos inyectisomas purificados de la mutante $\Delta escP$ y en los que se observaron filamentos de más de 1,000 nm. De manera interesante la longitud de las agujas (≈ 34 nm) de estos inyectisomas fueron sólo ligeramente más largas que las encontradas en la cepa silvestre.

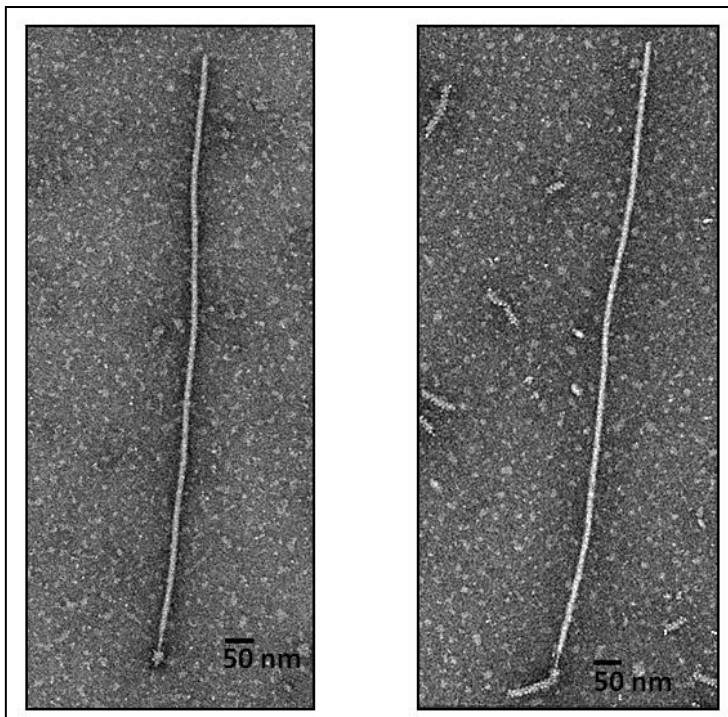


Fig. 34 Inyectisomas purificados de la cepa $\Delta escP$. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de inyectisomas teñidos con PTA 2%. Las fotografías se tomaron a 20,000X de magnificación y las medidas se calcularon con el programa Image J.

Otra observación importante fue que en las purificaciones de inyectisomas de la cepa $\Delta escP$ existe una notable reducción en el número de inyectisomas al comparar con la cantidad de muestra que se logró observar en las diferentes fracciones de las purificaciones de la cepa WT. La presencia y cantidad de EspA (y por lo tanto de inyectisomas) en las fracciones colectadas de los gradientes de CsCl se corroboró mediante Western blot

utilizando anticuerpos anti-EspA. Se encontró que la cantidad de EspA disminuye significativamente en las purificaciones de la mutante $\Delta escP$ comparada con la encontrada en la cepa WT (Figura 35).

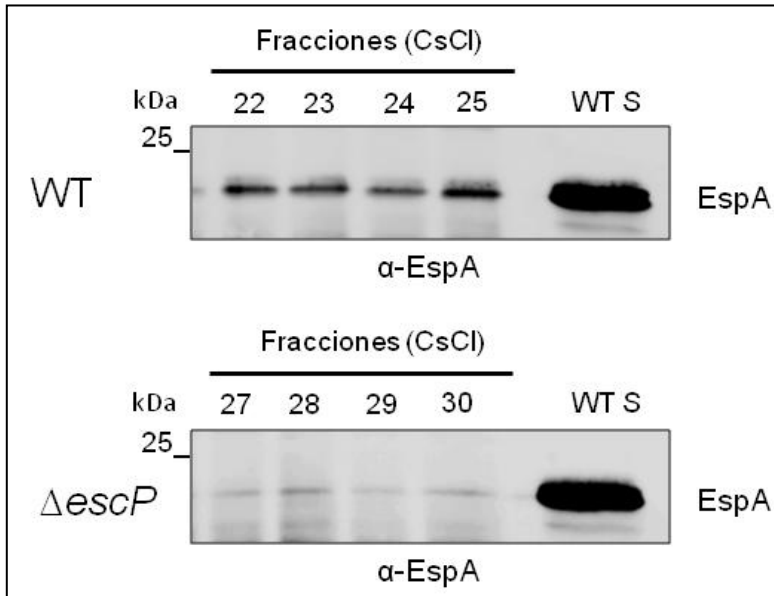


Fig. 35 Identificación de EspA en las purificaciones de inyectisomas. Inmunodetección de fracciones del gradiente de CsCl de las cepas EPEC silvestre (WT) y $\Delta escP$ utilizando anticuerpo anti-EspA. WT S: proteínas secretadas en la cepa silvestre.

Los resultados de esta sección señalan que EscP regula la longitud de la aguja en EPEC y sugieren que en su ausencia la bacteria ensambla un menor número de inyectisomas.

5. EscP contribuye en el proceso de ensamblaje del inyectisoma

Los datos anteriores sugieren que la mutante $\Delta escP$ ensambla un menor número de inyectisomas que la cepa WT. Para tener evidencia funcional de dicha hipótesis, hicimos experimentos de hemólisis de eritrocitos. La liberación de hemoglobina mediada por la infección de EPEC se debe a la lisis de la membrana de los eritrocitos y se ha utilizado como evidencia de formación de inyectisomas funcionales, en específico la formación de filamentos y poros (ya que mutantes en los translocadores EspA y EspD no presentan actividad hemolítica y una mutante en EspB sólo el 25% de esta actividad (Warawa, Finlay et al. 1999; Shaw, Daniell et al. 2001).

Las cepas EPEC silvestre (WT), $\Delta escN$ y $\Delta escP$ se incubaron con eritrocitos y se observó que en ausencia de EscP la actividad hemolítica se redujo aproximadamente en un 50% (la actividad de la cepa WT se consideró como el 100%). Los niveles de hemólisis se recuperaron cuando la cepa se complementó con un plásmido que contiene una versión silvestre de EscP (pJT016) (Figura 36). Este resultado demuestra la existencia de inyectisomas funcionales en la mutante $\Delta escP$, capaces de formar poro de translocación en la célula eucarionte, sin embargo la reducción en la actividad hemolítica es una evidencia más de una reducción en el número de inyectisomas completamente ensamblados y funcionales en la cepa $\Delta escP$.

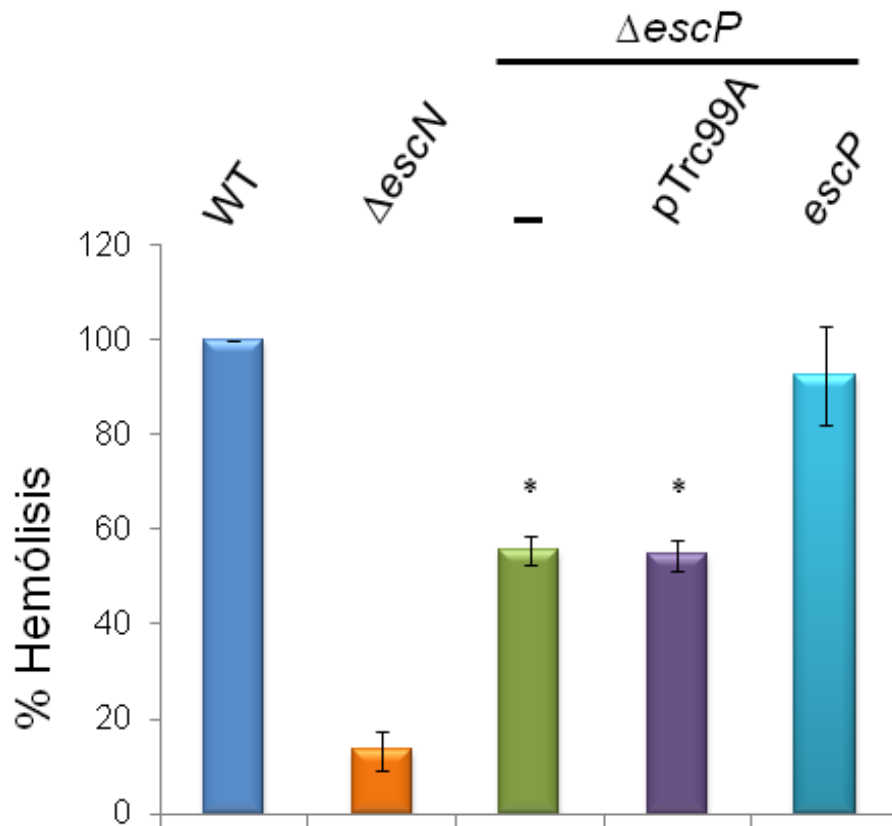


Fig. 36 Actividad hemolítica. Capacidad hemolítica de las cepas EPEC silvestre (WT), $\Delta escN$, $\Delta escP$ (-), $\Delta escP$ con el vector vacío (pTrc99A) y $\Delta escP$ expresando el vector pTrc99A-escP (escP). Se analizó la hemoglobina liberada al medio a una DO de 450 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado y se presentan con la desviación estándar. *: $p < 0.0001$ en la prueba estadística t de Student, al comparar con la cepa WT. Nota: un resultado similar de hemólisis lo obtuvo Onasis Vicente en el laboratorio y se modificó en el presente trabajo.

Para tener una evidencia más directa de la cantidad de filamentos EspA ensamblados en la mutante $\Delta escP$ con relación a la cepa silvestre, realizamos purificaciones mecánicas utilizando vórtex (rasurados) de estructuras extracelulares de las cepas EPEC WT, $\Delta escN$ y $\Delta escP$; los resultados mostraron que en ausencia de EscP hay una menor cantidad de EspA ($\approx 50\%$), sugiriendo que en la cepa $\Delta escP$ se ensambla un menor número de inyectisomas maduros (con filamento) (Figura 35A). El resultado no se debe a que los inyectisomas fueran más cortos en la $\Delta escP$ (ver Figura 31), de hecho como se ve en la Figura 32, la mutante $\Delta escP$ ensambla filamentos muy largos que pudieran estar contribuyendo significativamente en la cantidad de EspA. El ensamblaje silvestre de inyectisomas se restauró al complementar la mutante $\Delta escP$ con el plásmido pJT016 (Figura 37A).

Para conocer si el menor número de filamentos observado en la mutante se debe a algún defecto en la formación del cuerpo basal, en específico del anillo de membrana interna formado por la proteína EscJ; después de hacer el rasurado se realizó la separación de la fracción membranal y se identificó a la proteína EscJ por inmunodetección. La Figura 37B muestra que en todas la cepas hay cantidades similares de EscJ, sugiriendo que en la mutante $\Delta escP$ no se afecta el número de complejos basales.

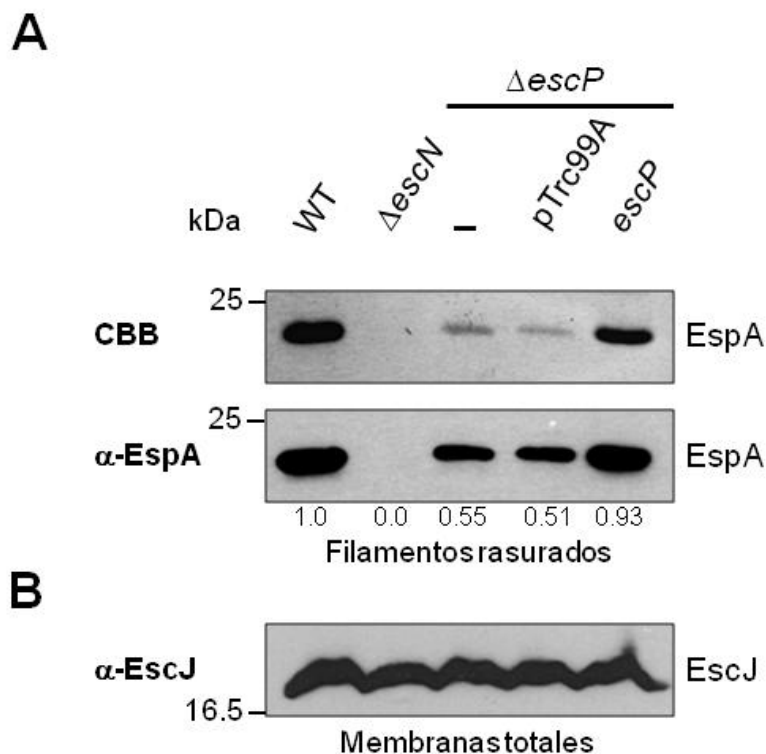


Fig. 37 Rasurado de filamentos EspA. (A) Purificación mecánica de filamentos EspA de las cepas EPEC silvestre (WT), $\Delta escN$, $\Delta escP$ (-), $\Delta escP$ con el vector vacío (pTrc99A) y $\Delta escP$ expresando el vector pTrc99A-escP (escP). Se analizó la cantidad de EspA tanto en el gel SDS 15% teñido con azul de Coomassie (CBB panel de arriba) como la inmunodetección de los filamentos utilizando anticuerpo anti-EspA (panel de abajo). El análisis densitométrico del Western blot se realizó con el programa Scion Image (Scion Corporation). **(B) Inmunodetección de la fracción membranal total** después de rasurar las células, se utilizó el anticuerpo anti-EscJ.

Los resultados de esta sección demostraron que EscP contribuye en la biogénesis del inyectisoma de EPEC.

6. EscP es un sustrato que se secreta por el SST3 y regula la secreción de la proteína que forma el eje interno

Se ha demostrado que las proteínas que regulan la longitud de la aguja o gancho, YscP, Spa32, InvJ y FliK, son sustratos que se secretan vía SST3 (Minamino, Gonzalez-Pedrajo et al. 1999; Payne and Straley 1999; Stainier, Bleves et al. 2000; Russmann, Kubori et al. 2002; Tamano, Katayama et al. 2002). Ya que no se cuenta con anticuerpos específicos anti-EscP, *escP* se clonó en el plásmido pTOPO-2HA (pJHo16) para detectar a EscP-HA y poder examinar si la proteína se secreta. El plásmido pJHo16 se introdujo por electroporación en las cepas WT, $\Delta escN$ y $\Delta escP$ y se analizó por Western blot la producción y secreción de EscP-HA. Se encontró que la proteína se secreta a niveles muy bajos; sin embargo, modificando el protocolo de secreción (concentrando la muestra y usando el sistema “*Super Signal Western Blot enhancer*”) se encontró a EscP en los sobrenadantes de la cepa WT y en los mismos niveles en la mutante $\Delta escP$, ya que el plásmido pJHo16 complementó a la mutante (se recuperaron los niveles de secreción de EspB en la mutante $\Delta escP$ con EscP-HA en la Figura 38A). De manera sorpresiva y consistente encontramos que EscP se secretó en la mutante $\Delta escN$, aunque en menor cantidad que en la cepa silvestre, sugiriendo una secreción independiente del SST3 (Figura 38A). Para corroborar esta hipótesis, y ya que se ha reportado que la ATPasa no es esencial para la secreción de sustratos flagelares (Minamino and Namba 2008), analizamos la secreción de EscP-HA en las mutantes Δler (donde no hay expresión de ningún gen de la isla LEE) y $\Delta escV$ (que es un componente esencial del aparato de exportación y cuyos homólogos son esenciales para la secreción en ausencia de la ATPasa) y encontramos que EscP-HA se seguía encontrando en los sobrenadantes de estas cepas, indicando que EscP puede secretarse por otro sistema. Cabe mencionar que se probaron otros sustratos (EscI y efectores) expresados en el mismo plásmido y haciendo el ensayo en las mismas condiciones, y su secreción fue siempre dependiente del SST3 (no se secretaron en una cepa $\Delta escN$) (datos no mostrados).

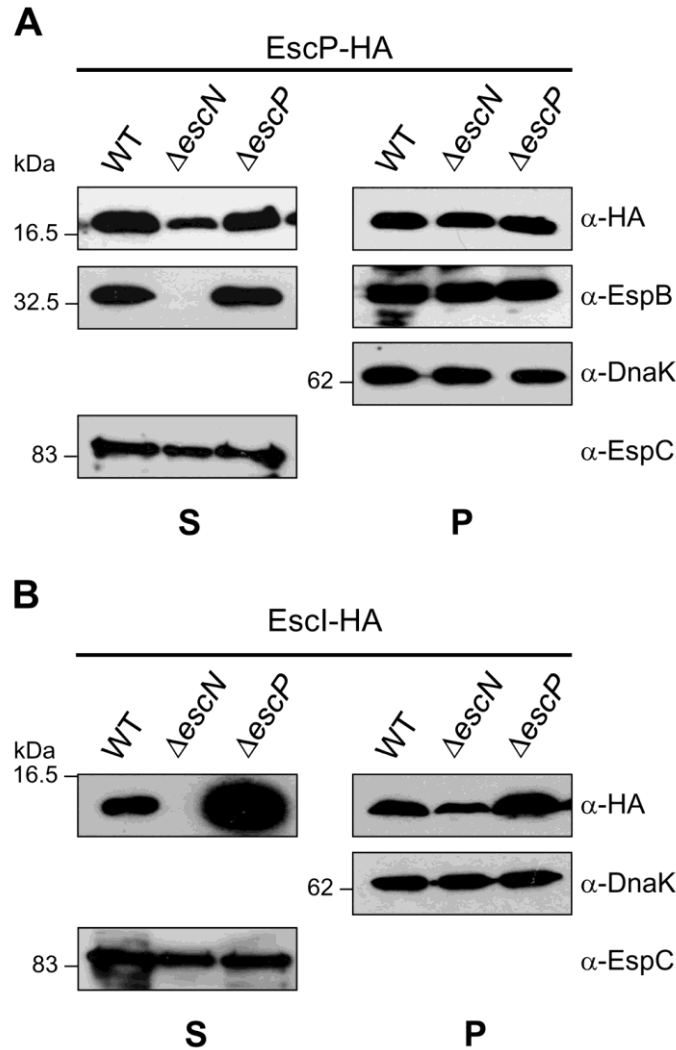


Fig. 38 Secreción de sustratos tempranos etiquetados con HA. Perfil de secreción de las cepas EPEC silvestre (WT), Δ escN (deficiente en la ATPasa del SST3) y Δ escP transformadas con el vector pTOPO-2HA conteniendo las proteínas (A) EscP-HA (18.9 kDa) y (B) EscI-HA (17.6 kDa). Se muestra la inmunodetección de las proteínas secretadas (panel S) y de pastillas celulares totales (panel P) utilizando anti-HA. El anti-EspC y anti-DnaK se usaron como controles de carga.

Para analizar la secreción de un sustrato temprano en ausencia de EscP, evaluamos la secreción de EscI (componente del eje interno) etiquetado con un doble epítoto de HA. En la Figura 38B se observó que en la mutante Δ escP hay una clara hipersecreción de EscI-HA al comparar con la secreción silvestre, sugiriendo que EscP regula la secreción de EscI. En cuanto a la producción de la proteína recombinante, encontramos que hay un ligero aumento en la expresión de EscI-HA en la mutante Δ escP y una ligera disminución en la Δ escN al comparar con la cepa silvestre (Figura 38B, panel P). Estos resultados sugieren que EscI es un sustrato inestable en ausencia de secreción y que EscP regula de alguna

manera desconocida los niveles de esta proteína. En *S. flexneri* se reportó que una mutante de Spa40 (homólogo de EscU) que no se corta (Δ NPTH) acumula intracelularmente a la proteína del eje MxiI, sugiriendo que el procesamiento de Spa40 está relacionado en la regulación de la secreción de la proteína del eje (Botteaux, Kayath et al. 2010). En el caso de la mutante Δ escP postulamos que el procesamiento de EscU está afectado.

7. EscP interacciona con múltiples componentes del SST3

7.1. EscP interacciona con la región carboxilo de EscU

Está reportado que la familia de proteínas YscP/FliK participa en el control de la jerarquía de secreción junto con miembros de la familia YscU/FlhB (Minamino and Macnab 2000; Edqvist, Olsson et al. 2003; Fraser, Hirano et al. 2003; Minamino, Saijo-Hamano et al. 2004; Minamino, Ferris et al. 2006; Botteaux, Sani et al. 2008; Lorenz, Schulz et al. 2008; Lorenz and Buttner 2011). Aunque la interacción directa sólo se ha probado para FliK-FlhB (Minamino, Saijo-Hamano et al. 2004), Spa32-Spa40 (Botteaux, Sani et al. 2008) y para HpaC-HrcU (Lorenz, Schulz et al. 2008).

En este estudio demostramos que EscP se requiere para la secreción de sustratos intermedios (translocadores), lo que sugiere que la proteína pudiera participar en el mecanismo conservado de control de la secreción junto con la proteína de membrana interna EscU. Para evaluar la posible interacción entre EscP y EscU se realizaron ensayos de copurificación por cromatografía de afinidad tipo “Pull-down” utilizando las versiones recombinantes solubles His-EscU_C (pJEeU_C) y MBP-EscP (pJLo16). Los lisados conteniendo a las proteínas expresadas, se mezclaron por 2 horas en frío y con agitación orbital, se cargaron a una columna con resina de amilosa y se probó la capacidad de MBP-EscP de retener a His-EscU_C y eluir en conjunto. Como control se expresó a la proteína MBP sola (pMAL-c2x), se incubó con His-EscU_C y se siguió el mismo protocolo. En la Figura 39 se observa que His-EscU_C copurificó con MBP-EscP (panel derecho) pero no con MBP sola (panel izquierdo); la identidad de EscU se confirmó por inmunodetección con anticuerpos específicos anti-EscU_C. Junto con MBP-EscP eluyen las dos versiones de EscU (EscU_{CN} y EscU_{CC}), sugiriendo dos posibilidades: (i) que EscP interacciona con ambos

fragmentos (EscU_{CN} y EscU_{CC}) o (ii) que EscP interacciona sólo con alguno de los dos fragmentos y que el otro esté coeluyendo de manera inespecífica a la interacción con EscP.

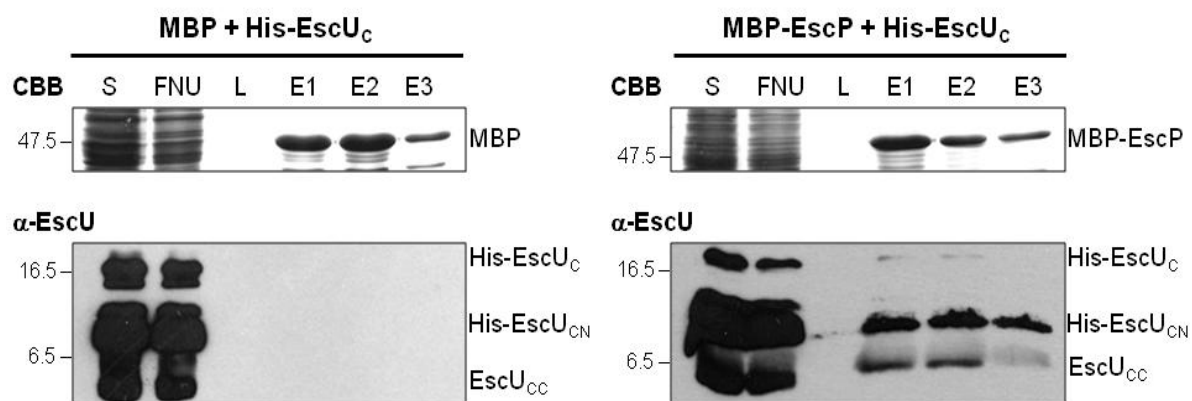


Fig. 39 EscP interacciona con EscU_C. Ensayo de copurificación por cromatografía de afinidad tipo *pull-down*. S: fracción soluble con lisados de MBP o MBP-EscP y His-EscU_C; FNU: fracción no unida a la resina. L: último lavado y E1-E3 eluciones con 10 mM de maltosa. SDS-PAGE 16.5% teñido con azul de Coomassie (CBB) o inmunodetección de las fracciones utilizando el anticuerpo anti-EscU_C.

Para delimitar la región de interacción entre EscP y EscU_C clonamos en el vector pET19b a *escU_{CC}* (EscU_{CC}, aminoácidos 263-345). Realizamos ensayos de copurificación como los descritos anteriormente. Encontramos que His-EscU_{CC} copurificó con MBP-EscP (Figura 33A, panel derecho) pero no con MBP sola (Figura 38A, panel izquierdo); la identidad de EscU se confirmó por inmunodetección con anticuerpos específicos anti-EscU_C. Este resultado demuestra que en los últimos 83 aminoácidos (después de la asparagina del motivo NPTH) de EscU_C se encuentra el sitio de interacción con EscP.

Para confirmar esta interacción *in vivo*, realizamos ensayos de doble híbrido en levadura utilizando el sistema “*Match-maker GAL4 Two-Hybrid System 3*” (Clontech), el cual funciona expresando por separado un gen anzuelo fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4 (DNA-BD) en el vector pGBKT7 y otro gen fusionado al dominio de activación de GAL4 (AD) en el vector pGADT7. Cuando las proteínas expresadas interaccionan, el DNA-BD y el AD se ponen en proximidad, se reconstituye la proteína GAL4 que activa la transcripción de los genes reporteros ADE2, HIS3 y MEL1. Los genes *escP* y *escU_C* se subclonaron en los vectores pGADT7 y pGBKT7, respectivamente. La cotransformación de los plásmidos en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AH109 se determinó por diluciones

seriadas en placas de medio SD sin triptófano (-Trp) ni leucina (-Leu). La interacción entre EscP y EscU_{CC} se determinó por diluciones seriadas en placas de medio SD sin triptófano (-Trp), leucina (-Leu) ni histidina (-His), siendo este último el reportero que se expresa al ser reconstituido el activador transcripcional GAL4. En la Figura 40B (panel derecho) se observó que la interacción entre las proteínas EscP y EscU_{CC}, permite que la levadura sea capaz de crecer en ausencia de histidina en el medio

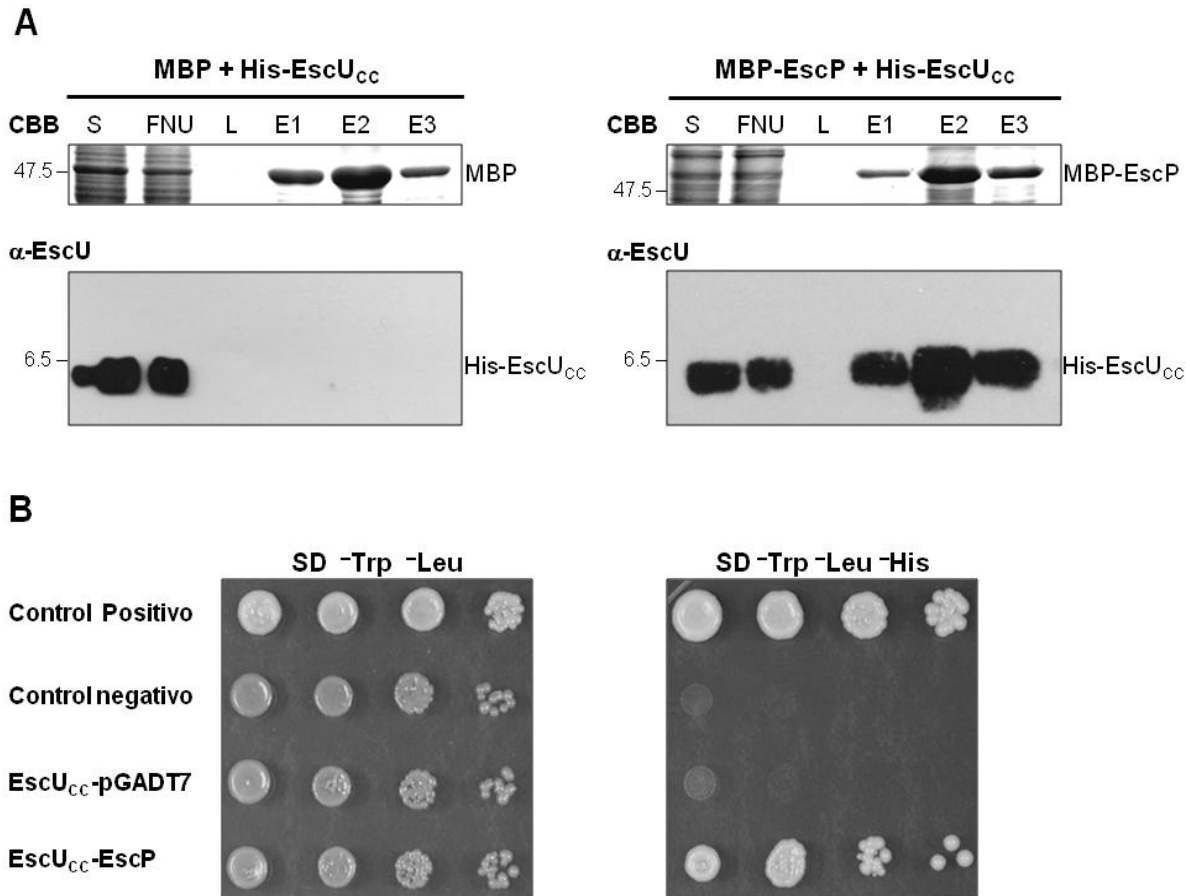


Fig. 40 EscP interacciona con los últimos 83 aminoácidos de EscU (EscU_{CC}). (A) **Ensayo de copurificación** por cromatografía de afinidad S: fracción soluble con lisados de MBP o MBP-EscP y His-EscU_C; FNU: fracción no unida a la resina. L: último lavado y E1-E3 eluciones con 10 mM de maltosa. SDS-PAGE 16.5% teñido con azul de Coomassie (CBB) o inmunodetección de las fracciones utilizando el anticuerpo anti-EscU_C. (B) **Interacciones por doble híbrido** en levadura. Los cultivos se gotearon en diluciones seriadas de 10 veces en medio SD sin triptófano (-Trp) ni leucina (-Leu) y en medio SD sin triptófano (-Trp), leucina (-Leu) ni histidina (-His). Se utilizaron los controles positivos y negativos del sistema. Nota: el resultado preliminar de la interacción por doble híbrido lo obtuvo Onasis Vicente en el laboratorio y se corroboró en el presente trabajo.

. Como control positivo se usaron los plásmidos del sistema pGBKT7-53 y pGADT7-T y como negativo pGBKT7-Lam y pGADT7-T. También se muestra el ensayo de EscU_{CC}

fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4 (pOGBKeU_{CC}) cotransformado con el vector pGADT-7 vacío, que demuestra que EscU_{CC} por sí mismo no activa la expresión del gen reportero.

7.2. EscP interacciona con los sustratos tempranos EscF y EscI

Como mostramos previamente, encontramos que EscP se secreta y regula la longitud de la aguja del inyectisoma de EPEC. El mecanismo exacto de cómo la familia de proteínas YscP/FliK regulan la longitud de la aguja/gancho en los SST3 es una tema de controversia y no se ha podido establecer un solo modelo. Para el sistema flagelar está reportado que la proteína FliK interacciona con la proteína que forma el gancho (FlgE) y que la interacción contribuye al anclaje del N-terminal de FliK dentro del gancho en polimerización y que esto a su vez es necesario para la función de regla molecular de FliK (Minamino, Moriya et al. 2009). Sin embargo, no se ha reportado una interacción similar para inyectisomas de patógenos. Para determinar si EscP es capaz de interactuar con la proteína de la aguja, llevamos a cabo ensayos de *pull-down* utilizando las versiones recombinantes solubles His-EscF (pJEeF) y MBP-EscP (pJLo16). En la Figura 39A se muestra que His-EscF coeluye con MBP-EscP y no con MBP, indicando que EscP interacciona con la subunidad que forma la aguja. La interacción se confirmó *in vivo* mediante ensayos de doble híbrido en levadura tal y como se describió para EscU_{CC}. Encontramos que aunque EscF (fusionada a la región de unión a ADN de GAL4) es capaz de autoactivar al gen reportero, los niveles de crecimiento en la interacción EscF-EscP fueron mayores (Figura 39B).

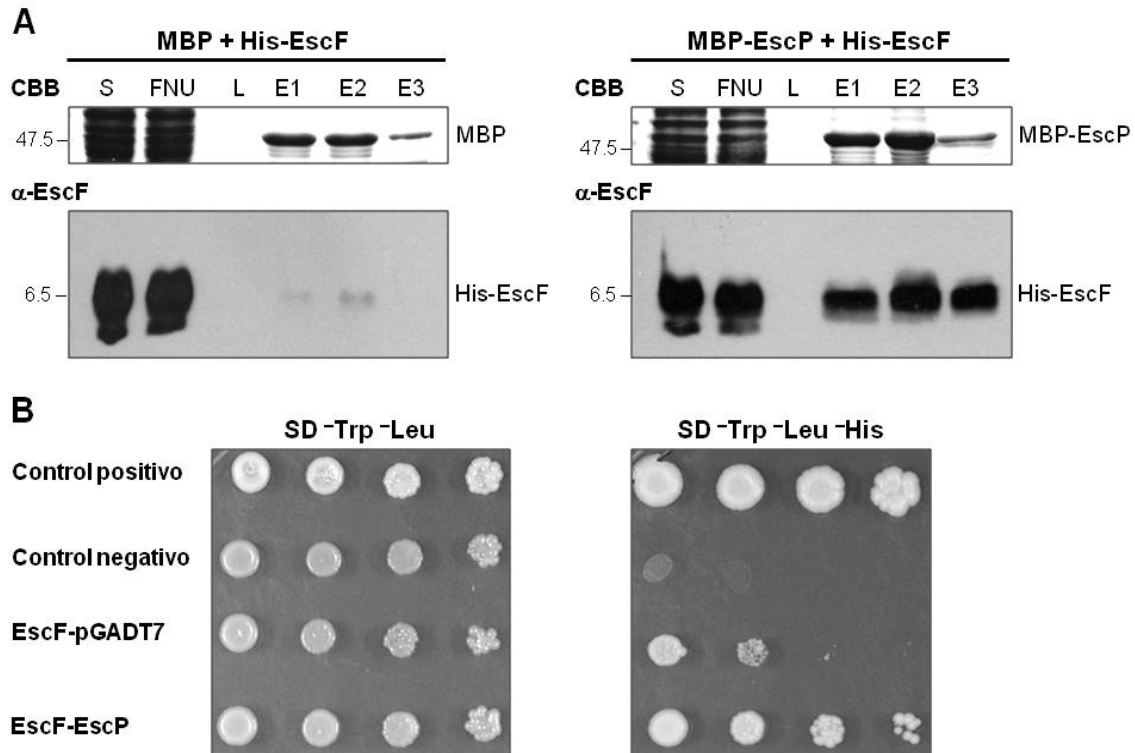


Fig. 41 EscP interacta con la proteína que forma la aguja, EscF (A) Ensayo de copurificación por cromatografía de afinidad S: fracción soluble con lisados de MBP o MBP-EscP y His-EscF; FNU: fracción no unida a la resina. L: último lavado y E1-E3 eluciones con 10 mM de maltosa. SDS-PAGE 16.5% teñido con Azul de Coomassie (CBB) o inmunodetección de las fracciones utilizando el anticuerpo anti-EscF. **(B) Interacciones por doble híbrido** en levadura. Los cultivos se gotearon en diluciones seriadas de 10 veces en medio SD sin triptófano ($\bar{\text{Trp}}$) ni leucina ($\bar{\text{Leu}}$) para confirmar la cotransformación de los plásmidos y en medio SD sin triptófano ($\bar{\text{Trp}}$), leucina ($\bar{\text{Leu}}$) ni histidina ($\bar{\text{His}}$) para las interacciones. Como control positivo se usan los plásmidos del sistema pGBKT7-53 y pGADT7-T y como negativo pGBKT7-Lam y pGADT7-T. También se muestra el ensayo de EscF en el dominio de unión a ADN de GAL4 cotransformado con el vector pGADT-7 vacío. Nota: el resultado preliminar de la interacción por doble híbrido lo obtuvo Onasis Vicente en el laboratorio y se corroboró en el presente trabajo.

En una sección anterior demostramos que EscP regula la secreción de la proteína que forma el eje interno del inyectisoma (EscI), y el cual, al igual que EscF es un sustrato temprano esencial para la secreción de proteínas. Quisimos investigar la interacción de EscP y EscI, para lo cual realizamos ensayos de copurificación como los anteriormente descritos, utilizando las proteínas recombinantes His-EscI y MBP-EscP. Encontramos que MBP-EscP retuvo en la columna de amilosa a His-EscI, demostrando la interacción entre las dos proteínas (Figura 42A). La interacción EscP-EscI se confirmó *in vivo* mediante ensayos de doble híbrido en levadura (Figura 42B).

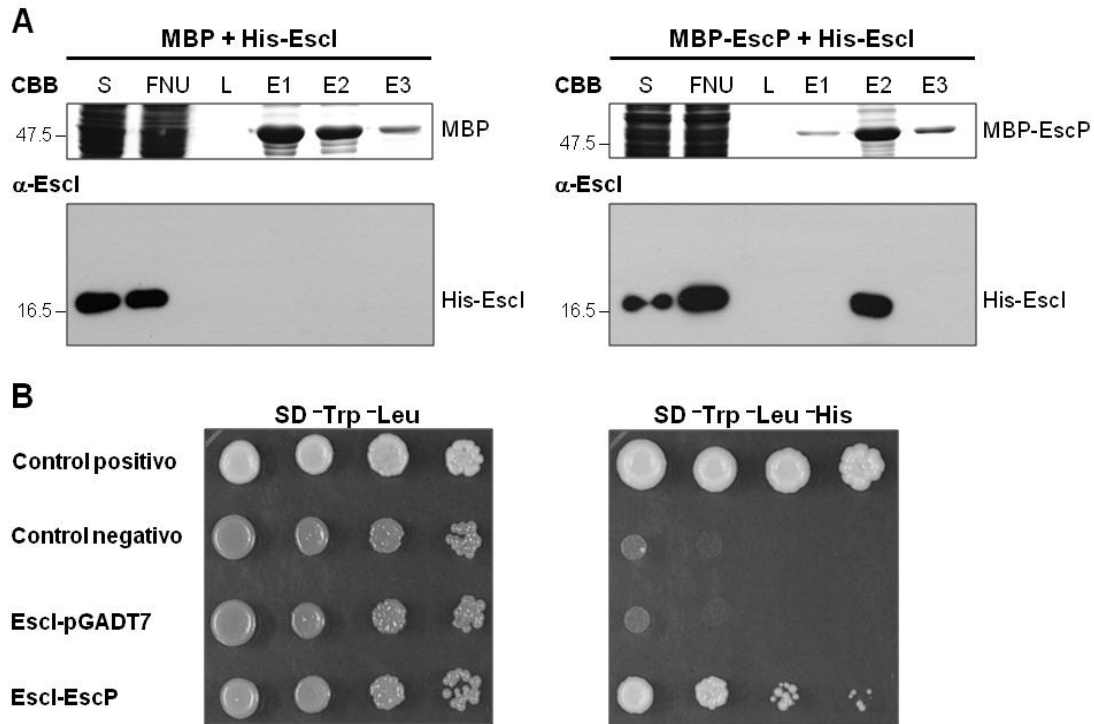


Fig. 42 EscP interacciona con la proteína que forma el eje interno, EscI (A) Ensayo de *pull-down* S: fracción soluble con lisados de MBP o MBP-EscP y His-EscI; FNU: fracción no unida a la resina. L: último lavado y E1-E3 eluciones con 10 mM de maltosa. SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie (CBB) o inmunodetección de las fracciones utilizando el anticuerpo anti-EscI. (B) **Interacciones por doble híbrido** en levadura. Los cultivos se gotearon en diluciones seriadas de 10 veces en medio SD sin triptófano ($\bar{\text{Trp}}$) ni leucina ($\bar{\text{Leu}}$) para confirmar la cotransformación de los plásmidos y en medio SD sin triptófano ($\bar{\text{Trp}}$), leucina ($\bar{\text{Leu}}$) ni histidina ($\bar{\text{His}}$) para las interacciones. Como control positivo se usan los plásmidos del sistema pGBKT7-53 y pGADT7-T y como negativo pGBKT7-Lam y pGADT7-T. También se muestra el ensayo de EscI en el dominio de unión a ADN de GAL4 cotransformado con el vector pGADT-7 vacío

7.3. EscP interacciona con la chaperona de multi-efectores CesT

Previamente se mostró que en la cepa ΔescP había una clara hipersecreción de Tir detectable en un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (Figura 28). Para analizar la interacción entre EscP y el efector Tir, utilizamos un plásmido bicistrónico (pMTBitirHcT) que expresa a Tir junto con su chaperona CesT (etiquetada con His₁₀), ya que Tir no es estable en ausencia de la chaperona. Encontramos que MBP-EscP interacciona con el complejo Tir-His-CesT, (dato no mostrado). Sin embargo, con este resultado no se puede definir si EscP interacciona con Tir, CesT o con ambas proteínas.

Otro dato interesante de nuestros resultados anteriores es que en la mutante ΔescP la secreción aumentada de Tir se extiende a otros efectores (Figura 26), y la mayoría de ellos

interaccionan también con la chaperona CesT, incluyendo a Map, EspF, EspH y NleH (Thomas, Ma et al. 2012). Este dato nos sugería que pudiera existir una relación directa entre EscP y CesT, así que decidimos probar la interacción directa entre estas proteínas. Realizamos ensayos de copurificación como los descritos anteriormente y encontramos que His-CesT copurificó con MBP-EscP (Figura 43A, panel derecho) pero no con MBP sola (Figura 43A, panel izquierdo); la identidad de CesT se confirmó por inmunodetección con anticuerpos específicos anti-CesT. Este resultado demuestra que sí existe una interacción entre EscP y CesT.

Para confirmar esta interacción *in vivo*, realizamos ensayos de doble híbrido en levadura. La cotransformación de los plásmidos se midió por diluciones seriadas en placas de medio SD sin triptófano ($\bar{\text{Trp}}$) ni leucina ($\bar{\text{Leu}}$). La interacción entre EscP y EscU_{CC} se determinó por diluciones seriadas en placas de medio SD sin triptófano ($\bar{\text{Trp}}$), leucina ($\bar{\text{Leu}}$) ni histidina ($\bar{\text{His}}$), y en la Figura 43B se observó la interacción directa entre EscP y CesT. Es importante mencionar que esta interacción es más débil que las anteriores, ya que el ensayo se dejó un mayor número de días (ver metodología).

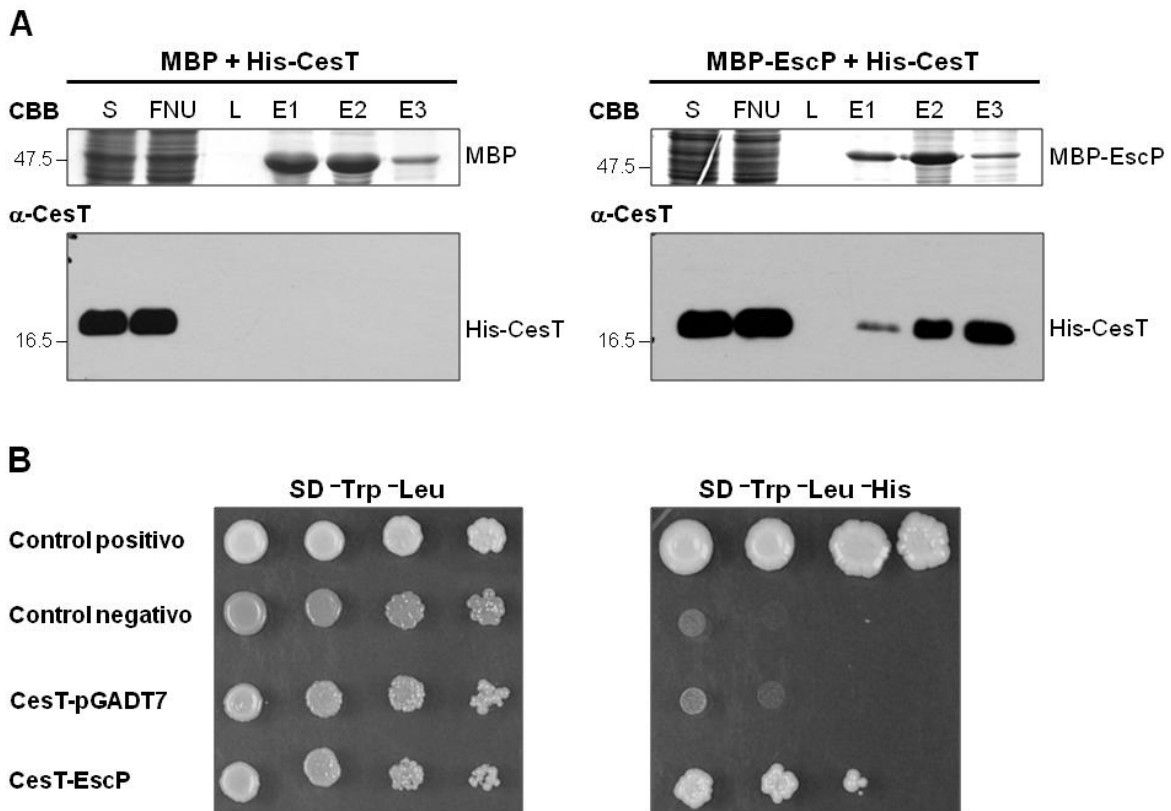


Fig. 43 EscP interacciona con la chaperona CesT (A) Ensayo de copurificación por cromatografía de afinidad S: fracción soluble con lisados de MBP o MBP-EscP y His-CesT; FNU: fracción no unida a la resina. L: último lavado y E1-E3 eluciones con 10 mM de maltosa. SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie (CBB) o inmunodetección de las fracciones utilizando el anticuerpo anti-CesT. **(B) Interacciones por doble híbrido** en levadura. Los cultivos se gotearon en diluciones seriadas de 10 veces en medio SD sin triptófano (\neg Trp) ni leucina (\neg Leu) para confirmar la cotransformación de los plásmidos y en medio SD sin triptófano (\neg Trp), leucina (\neg Leu) ni histidina (\neg His) para las interacciones. Como control positivo se usan los plásmidos del sistema pGBKT7-53 y pGADT7-T y como negativo pGBKT7-Lam y pGADT7-T. También se muestra el ensayo de CesT en el dominio de unión a ADN de GAL4 cotransformado con el vector pGADT-7 vacío. Nota: el resultado preliminar de la interacción por doble híbrido lo obtuvo Onasis Vicente en el laboratorio y se corroboró en el presente trabajo.

8. EscP tiene efecto multicopia sobre el nado de Salmonella enterica

Ya que encontramos que EscP pertenece a la familia de proteínas bifuncionales FliK/YscP que regulan la longitud del gancho/aguja y que están involucradas en la regulación de la secreción de sustratos, quisimos probar la complementación heteróloga de la mutante $\Delta escP$ con FliK. La cepa $\Delta escP$ se transformó con el plásmido pMMIK100 y se probó la capacidad de FliK de restaurar la secreción de proteínas en la mutante. Encontramos que aunque las proteínas son análogos funcionales, FliK no fue capaz de complementar la función de control de secreción de proteínas de EscP (dato no mostrado).

De manera opuesta, quisimos probar la complementación heteróloga de la mutante $\Delta fliK$ con EscP así como el efecto al sobreexpresar a EscP en la cepa silvestre. Las cepas SJW1103 (WT) y SJW880 ($\Delta fliK$) se transformaron con pJTo16 y se probó la capacidad de EscP de alterar el nado. Encontramos que EscP no complementó el nado de la cepa $\Delta fliK$ (dato no mostrado), pero observamos que EscP tuvo un claro efecto multicopia sobre el nado de *S. enterica* (Figura 42), sugiriendo que EscP pudiera ser reconocido por componentes del aparato de exportación flagelar.

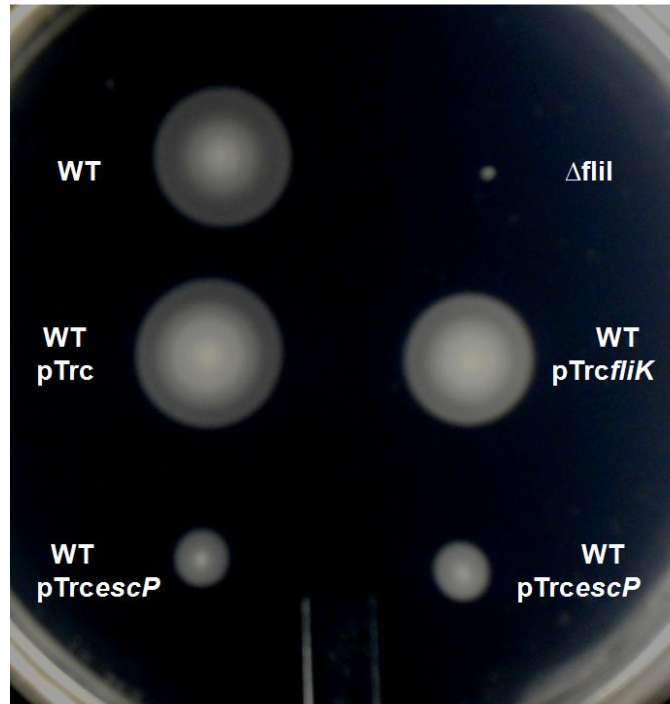


Fig. 42 EscP tiene efecto multicopia en el nado de *Salmonella*. Ensayo de nado de las cepas SJW1103 (WT), ($\Delta fliI$), SJW1103 con el vector vacío (WT pTrc), SJW1103 con FliK (WT pTrcfliK) y SJW1103 con EscP (WT pTrcescP). El ensayo representativo que se muestra se realizó en cajas de agar de tripton suave al 0.25% con ampicilina y 1 mM IPTG.

9. *Orf16 de Citrobacter rodentium cumple la misma función que EscP*

Como se describió en la sección de bioinformática, al hacer una búsqueda de homólogos de EscP, las únicas proteínas relacionadas con el SST3 que se encontraron fueron las proteínas homólogas a EscP de los patógenos A/E CR y EHEC (Figura 16).

Para saber si la proteína Orf16 de CR cumple la misma función que EscP, hicimos la complementación heteróloga de la mutante $\Delta escP$ con Orf16 de CR. Diseñamos oligonucleótidos basándonos en la secuencia reportada con la secuenciación del LEE de CR (Deng, Li et al. 2001) (AF311901), en donde se reportó a Orf16 como una proteína de 103 aminoácidos. Transformamos la cepa $\Delta escP$ con el plásmido pJH Δ 35o16CR y se probó la capacidad de Orf16 de restaurar la secreción de proteínas en la mutante. Encontramos que la proteína de CR no fue capaz de complementar la función de EscP y no se recuperan los niveles de secreción de proteínas (Figura 43 carril 4). Debido a la alta similitud entre estas

proteínas el resultado nos llamó la atención por lo que se analizó detenidamente la secuencia nucleotídica de *orf16* de CR y encontramos que al igual que *escP*, esta tiene un codón alternativo de inicio que coincide con el de *escP* (ver Figura 16) y que muy probablemente Orf16 de CR es una proteína de 138 aa. Transformamos el plásmido pJH016CR en la cepa $\Delta escP$ y probamos la capacidad de Orf16 de restaurar la secreción de proteínas. Encontramos que esta versión de Orf16 de CR complementó a niveles silvestres la secreción de proteínas translocadoras y efectoras (Figura 42, carril 5). Estos resultados demostraron que estas proteínas cumplen la misma función en estos dos patógenos A/E y que los primeros 35 aminoácidos son indispensable para su función.

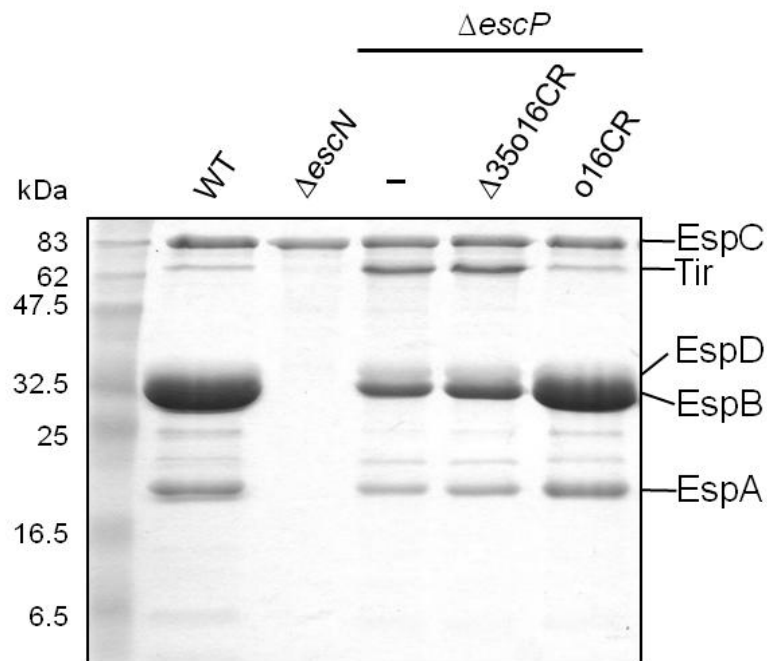


Fig. 42 Complementaciones heterólogas de la cepa EPEC mutante $\Delta escP::kan$. Proteínas secretadas en medio DMEM de las cepas EPEC silvestre (WT), $\Delta escN$ (deficiente en la ATPasa del SST3), $\Delta escP$ (-) y $\Delta escP$ expresando diferentes versiones de Orf16 de *Citrobacter rodentium* (CR); $\Delta 35o16CR$ (pJH $\Delta 35o16CR$) y o16CR (pJH016CR). Se muestra el gel SDS 15% teñido con azul de Coomassie.

Con el resultado de que una versión de Orf16 de CR sin una parte importante del extremo amino de la proteína no es funcional, quisimos saber qué ocurría con la secreción de los diferentes sustratos si se hacía una ablación menor en la proteína, aparte de que serviría también para mapear la señal de secreción de EscP. Hicimos una construcción de EscP sin los primeros 11 aminoácidos (pJH $\Delta 11o16$), la transformamos en la cepa $\Delta escP$ y

encontramos que esta versión no complementó la secreción silvestre de Tir, pero que sí pudo recuperar parcialmente la secreción de translocadores (Figura 43, carril 4), indicando que los primeros aminoácidos de EscP son necesarios sólo para regular la secreción de Tir (y probablemente otros efectores). Encontramos a su vez que esta versión de EscP es muy inestable, ya que sólo detectamos muy pocas cantidades de la misma en las pastillas celulares, y como se esperaba, esta versión no se secreta (datos no mostrados).

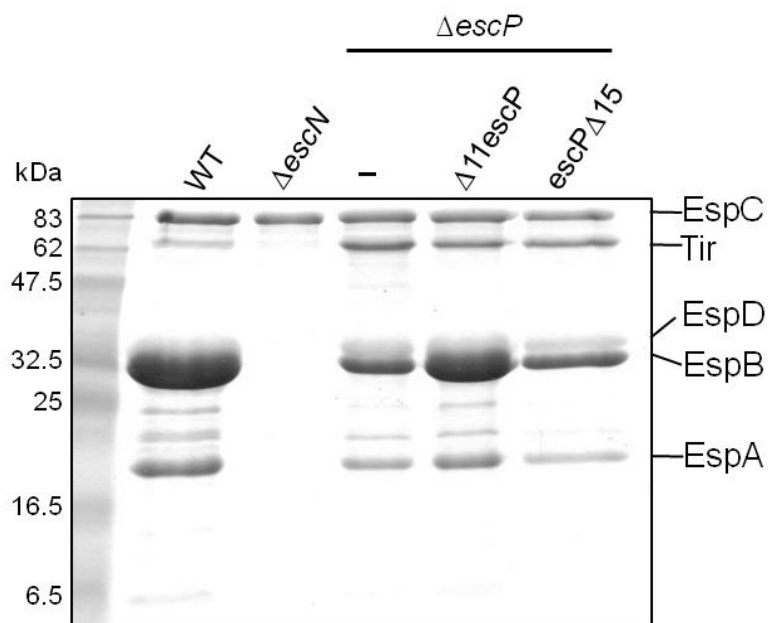


Fig. 43 Complementaciones de la cepa EPEC mutante $\Delta escP::kan$. Proteínas secretadas en medio DMEM de las cepas EPEC silvestre (WT), $\Delta escN$ (deficiente en la ATPasa del SST3), $\Delta escP$ (-) y $\Delta escP$ expresando diferentes versiones de EscP $\Delta 11 escP$ (pJH $\Delta 11 o16$) y $escP\Delta 15$ (pJH $o16\Delta 15$). Se muestra el gel SDS 15% teñido con azul de Coomassie.

Se ha propuesto que la región C-terminal de las proteínas T3S4 es la región de interacción con las proteínas de la familia de YscU/FlhB y por lo tanto importante para cambiar la especificidad de secreción de sustratos. Así que quisimos probar la contribución de la región C-terminal de EscP en la secreción de proteínas. Hicimos una construcción de EscP sin los últimos 15 aminoácidos (pJH $o16\Delta 15$), la transformamos en la cepa $\Delta escP$ y encontramos que esta versión no complementó la secreción silvestre de ningún sustrato (Figura 43, carril 5). Ya que esta versión fue estable (dato no mostrado) y contiene el extremo amino de la proteína, concluimos que el carboxilo terminal es indispensable para su función de regulación de la secreción de translocadores y efectores.

DISCUSIÓN

Diversas bacterias patógenas utilizan el sistema de secreción tipo III (SST3) para inyectar proteínas de virulencia directamente a la célula que infectan (Kosarewicz, Konigsmaier et al. 2012). El ensamblaje del SST3 es un proceso estrictamente regulado que requiere la coordinación de muchas proteínas citosólicas y membranales que permiten la secreción de sustratos tempranos seguida de la de sustratos intermedios y que sólo cuando el translocón esté completamente ensamblado, finalmente se secreten los efectores que serán inyectados directamente al citoplasma de la célula hospedera (Deane, Abrusci et al. 2010; Osborne and Coombes 2011).

En el presente trabajo investigamos el papel de la proteína Orf16 codificada en el LEE de EPEC en la biogénesis y funcionamiento del SST3 y con base en lo encontrado, y siguiendo la nomenclatura asignada para EPEC (basada en la de *Yersinia*), decidimos renombrarla como EscP.

Mediante un análisis bioinformático, complementado con la evidencia experimental, proponemos que EscP pertenece a la familia de proteínas YscP/FliK, y a pesar de que comparten algunas características como el porcentaje de estructura no repetitiva (*random coil*), este grupo de proteínas parece haber divergido más que otras proteínas del SST3, ya que varían drásticamente en tamaño y tienen características fisicoquímicas muy diferentes. De hecho, en correlación con las observaciones anteriores, se ha demostrado que las proteínas FliK que desempeñan la misma función en diferentes especies bacterianas sólo comparten un 50% de identidad (Journet, Agrain et al. 2003; Waters, O'Toole et al. 2007).

En el presente trabajo se construyeron diferentes versiones recombinantes de EscP etiquetada con histidinas, fusionadas tanto en el amino como en el carboxilo terminal de la misma. Aunque las versiones recombinantes lograron sobreexpresarse en la cepa de *E. coli* BDP, estas fueron muy insolubles y nunca se lograron purificar con alto rendimiento y pureza. Al contrario, la versión His-recombinante de la porción C-terminal de EscU (His-EscU_C) fue soluble y se logró purificar con alto rendimiento y pureza. La proteína pura

sirvió para la generación de anticuerpos policlonales que reconocen a las diferentes versiones de EscU.

Para comenzar la caracterización de la función de EscP del LEE de EPEC, quisimos conocer el efecto en la secreción a través del SST3 al eliminar esta proteína; encontramos que en ausencia de EscP (cepa EPEC mutante $\Delta escP$) se disminuye drásticamente la secreción de proteínas translocadoras (EspA, EspB y EspD) y que hay un aumento considerable en la secreción de algunos efectores, siendo este un fenotipo novedoso en EPEC en el que hay una secreción diferencial de sustratos intermedios (translocadores) y tardíos (efectores). De manera cuantitativa encontramos que la secreción de EspB se redujo un 40%, mientras que la de Tir aumentó 2 veces al comparar con la cepa WT. Demostramos así, que aunque EscP no es una proteína esencial para la secreción de proteínas vía SST3, se requiere para hacer eficiente la secreción de sustratos intermedios así como para regular la secreción silvestre de efectores, asignándole un rol directo en la regulación de la secreción. Encontramos también, que el fenotipo de secreción silvestre se restaura al complementar a la mutante $\Delta escP$ tanto con EscP silvestre (en los vectores pTrc y pACTrc) como con diferentes versiones de la proteína etiquetada en el extremo amino o carboxilo con histidinas (en los vectores pET19b y pET23b) o con un doble epítipo de hemaglutinina en el carboxilo (en el vector pTOPO-2HA), concluyendo que el efecto observado en la $\Delta escP$ se debe sólo a la ausencia de la proteína EscP, y que diferentes versiones recombinantes de EscP con etiquetas en cualquier extremo de la proteína son funcionales. Demostramos que en la mutante $\Delta escP$, las diferentes clases de sustratos (translocadores y efectores) se expresan en las mismas cantidades que en la cepa WT, concluyendo que EscP no regula la expresión de ninguna proteína del SST3, que no se requiere para la estabilidad de ningún sustrato y que el fenotipo observado en la mutante $\Delta escP$ se debe sólo a la ausencia de la proteína. También es importante mencionar que el fenotipo de la mutante $\Delta escP$ con respecto a la secreción de proteínas, se conserva aún al sobreexpresar (en un vector de alto número de copia) a efectores o a un sustrato temprano (Figura 26 y 27).

Un fenotipo de secreción similar al observado en la $\Delta escP$ se reportó para una mutante en el gen homólogo *orf16* de la isla LEE del patógeno A/E *Citrobacter rodentium* (CR), se

reportó que la mutante $\Delta orf16$ secreta una menor cantidad de translocadores, pero a diferencia de la cepa $\Delta escP$ de EPEC, secreta niveles silvestres del efector Tir (Deng, Puente et al. 2004). La proteína EscP de EPEC comparte un 78% de identidad (89% de similitud) con la proteína Orf16 de CR y un 97% de identidad con Orf16 de EHEC (otro patógeno A/E que posee la isla LEE), sugiriendo que en la familia A/E estas proteínas pudieran estar funcionando de manera similar, tal y como ocurre con las proteínas más conservadas del aparato de exportación y las proteínas reguladoras de la secreción entre translocadores y efectores (SepD y SepL, *Switch 2* en EPEC) (Deng, Li et al. 2005). Buscando razones que pudieran explicar la diferencia en los fenotipos de secreción de las mutantes $\Delta escP$ de EPEC con la $\Delta orf16$ de CR, primero descartamos que esta se debiera a las condiciones del ensayo, ya que nosotros observamos el mismo fenotipo haciendo el ensayo de secreción en cultivos estáticos en una incubadora con 5% de CO₂ (condición en la que se realizaron los ensayos para la $\Delta orf16$ de CR). Cuando se secuenció la isla LEE de CR (Deng, Li et al. 2001) (AF311901), se reportó a Orf16 como una proteína de 103 aminoácidos, dato con el que el grupo del Dr. Deng construyó una mutante a la que se le eliminaron los aminoácidos 6 al 86 de Orf16. Sin embargo, al hacer un alineamiento de EscP de EPEC, Orf16 de CR y Orf16 de EHEC (Figura 16), encontramos que Orf16 de CR tiene un codón de inicio alternativo (TTG) en la misma posición del codón de inicio reportado para EscP y Orf16 de EHEC, y el cual recientemente, con la secuenciación del genoma de CR fue anotado como el codón de inicio (Petty, Bulgin et al. 2010) (NC_013716). Por lo tanto, la mutante $\Delta orf16$ de CR expresa un tercio (40 aminoácidos del amino terminal) de la proteína Orf16, lo que sugiere que esta región podría contribuir en la regulación de la secreción de efectores, ya que en presencia de estos 40 aminoácidos Tir se secreta de manera normal. Probablemente estos 40 aminoácidos pudieran ser importantes en la interacción de EscP con CesT.

Para corroborar si Orf16 de CR y EscP de EPEC cumplen la misma función, realizamos ensayos de complementación heteróloga de la mutante $\Delta escP$ de EPEC con dos versiones de Orf16 de CR; la primera es Orf16 de 103 aminoácidos (correspondientes a la proteína Orf16 reportada por Deng y col.) que denominamos $\Delta 35O16CR$ y la segunda es Orf16 de 138 aminoácidos (que correspondería a la proteína completa con el codón de inicio alternativo igual a EscP) que denominamos $O16CR$. Al complementar a la mutante $\Delta escP$

de EPEC con la versión $\Delta 35\text{O16CR}$, observamos que no se recuperan los niveles de secreción de ningún sustrato, indicando que los primeros 35 aminoácidos de Orf16 son necesarios para hacer eficiente la secreción de translocadores y regular la secreción de Tir. Para el caso de la complementación heteróloga con la versión O16CR, observamos una recuperación total de los niveles de secreción de todas las proteínas, demostrando así, que Orf16 de CR y EscP de EPEC son reconocidas por el SST3 heterólogo, interaccionan con los mismos componentes y pueden así cumplir la misma función al ayudar a la eficiente secreción de las proteínas translocadoras y al regular la secreción de efectores. Demostramos también que los primeros 35 aminoácidos de las proteínas son esenciales para su función.

La proteína flagelar FliK de *S. enterica* comparte una similitud moderada (15%) con EscP, y se sabe que llevan a cabo funciones similares en su respectivo SST3. Quisimos probar si la proteína FliK era capaz de complementar a la mutante ΔescP de EPEC y viceversa. Encontramos que FliK no es capaz de restaurar la secreción de la ΔescP , y de manera similar, EscP no es capaz de rescatar el nado de la ΔfliK ; indicando que las proteínas no son intercambiables y que aunque tienen algunas funciones equivalentes en cada sistema, las características fisicoquímicas o estructurales de cada una pudieran estar relacionadas con una función particular. Un resultado similar se reportó en 2002 (Tamano, Katayama et al. 2002), donde encontraron que la proteína FliK no es capaz de restaurar el ensamblaje de inyectisomas de la mutante Δspa32 de *S. flexneri*. No creemos que los resultados anteriores se deban a la incapacidad de ser reconocidas por proteínas del aparato de exportación en las diferentes especies, ya que demostramos que EscP sí tiene un efecto multicopia sobre el nado de *S. enterica* WT (Figura 42). Por otro lado, existen proteínas para las que se ha demostrado que sí son intercambiables, está reportado que la mutante Δspa32 se complementa al introducir en trans a *invJ* y a *yscP*. Lo interesante de este resultado es que sólo se ha descrito transcomplementación entre proteínas de inyectisomas de patógenos de animales.

Para probar la contribución de la porción amino de EscP, hicimos una versión recombinante etiquetada con HA de la proteína sin sus primeros 11 aminoácidos (pJHA $\Delta 11\text{o16}$). Encontramos que esta versión es muy inestable (Botteaux, Sani et al. 2008).

El resultado coincide con lo reportado para otras proteínas de la familia YscP/FliK, en donde versiones truncas del N-terminal de FliK, InvJ y HrpP son menos estables que las versiones silvestres de dichas proteínas (Russmann, Kubori et al. 2002; Minamino, Saijo-Hamano et al. 2004; Hirano, Shibata et al. 2005; Morello and Collmer 2009). De manera inesperada, encontramos que $\Delta 11$ EscP fue capaz de restaurar parcialmente la secreción de las proteínas translocadoras pero no la de Tir, indicando que la región amino terminal es necesaria para la regulación de Tir pero dispensable para permitir la secreción de translocadores.

También construimos una versión de EscP-HA sin los últimos 15 aminoácidos (pJHo16 Δ 15) y aunque esta versión sí es estable, no es funcional, ya que no complementó la secreción de proteínas en la mutante $\Delta escP$, indicando que el C-terminal de EscP se requiere para su función (tanto en la regulación de la secreción de translocadores como de efectores). Este resultado coincide con lo reportado para Spa32, donde muestran que versiones con ablaciones en el C-terminal (últimos 29 residuos) de la proteína no restauran la secreción de efectores Ipas, las cepas no invaden células HeLa ni son capaces de controlar la longitud de la aguja (Botteaux, Sani et al. 2008).

Con base en los resultados de que: (i) en ausencia de EscP se secretan más efectores (Figura 26 y 27), (ii) que una mutante ($\Delta orf16$ de CR) que expresa el primer tercio de la proteína Orf16 es capaz de regular la correcta secreción de Tir y (iii) con la interacción de EscP con la chaperona de efectores CesT (Figura 41), proponemos que EscP pudiera cumplir una función reteniendo a los efectores de manera indirecta a través de la interacción con CesT secuestrándola mientras se ensambla el translocón. Una interacción similar se reportó en el patógeno de plantas *X. campestris pv. vesicatoria*, encontraron que la proteína HpaC, que controla la especificidad de secreción de sustratos, forma un complejo con la chaperona de efectores HpaB y que el complejo HpaC-HpaB es capaz de interactuar con el componente del aparato de exportación HrcV (Buttner, Lorenz et al. 2006). Al hacer una búsqueda de homólogos (utilizando BLAST) de HpaB los resultados incluyeron a CesT de *Burkholderia* y *Herbaspirillum*, sugiriendo que esta interacción está conservada tanto en patógenos de plantas como de animales, aunque hace falta dilucidar la función detallada que pudiera tener este complejo.

En los SST3 existen complejos proteicos encargados de regular la jerarquía de secreción entre translocadores y efectores (*Switch 2*), en EPEC mutantes en los genes que codifican a las proteínas SepD y SepL presentan un fenotipo de secreción nula de translocadores e hipersecreción de efectores (Deng, Li et al. 2005). Debido a la semejanza entre los fenotipos de secreción de las mutantes $\Delta escP$, $\Delta sepL$ y $\Delta sepD$, que indican que las proteínas están involucradas en permitir la secreción de translocadores y detener efectores hasta un punto adecuado para su secreción, creemos que pudiera existir un mecanismo en el que ambos *switches* cooperan y actúan conjuntamente deteniendo la salida de efectores mientras promueven la salida de translocadores. Para saber si la hipótesis anterior es por interacción directa de las proteínas, quisimos examinar la interacción de un componente del *switch 2* (SepL) con EscP; sin embargo, en un ensayo de copurificación el resultado fue negativo. Hacen falta más experimentos para saber si existe tal comunicación entre dichos complejos.

Se ha demostrado para la aguja de los inyectisomas y el gancho del flagelo, que aunque varían de tamaño en cada especie, poseen una longitud determinada regulada por el grupo de proteínas T3S4 (familia YscP/FliK) (Minamino and Pugsley 2005; Mota, Journet et al. 2005). Para caracterizar de manera más completa el fenotipo de la mutante $\Delta escP$, purificamos los inyectisomas y los analizamos por microscopía electrónica de transmisión. Al hacer las mediciones de la aguja ensamblada por los inyectisomas de la cepa EPEC WT, encontramos una longitud promedio de ≈ 23 nm, que es mucho menor a las reportadas previamente de 40 a 50 nm (Daniell, Takahashi et al. 2001; Shaw, Daniell et al. 2001; Wilson, Shaw et al. 2001). Nuestras mediciones se hicieron usando una magnificación calibrada y tomando en cuenta sólo la distancia entre los anillos y el inicio del filamento, que es el punto exacto donde el diámetro aumenta de 9 nm (diámetro de la aguja) a 12 nm (diámetro del filamento). La diferencia con lo reportado anteriormente podría deberse a la metodología utilizada para el ensayo, ya que las mediciones para las agujas de 40-50 nm fueron hechas en bacterias adheridas a eritrocitos y tomando en cuenta la porción del translocón que no se marcaba con anticuerpos anti-EspA acoplados a partículas de oro, haciéndola una metodología menos precisa, ya que pudiera haber cierto marcaje inespecífico. En sus imágenes (Daniell, Takahashi et al. 2001; Shaw, Daniell et al. 2001; Wilson, Shaw et al. 2001) no es clara la diferencia en los diámetros de la aguja y filamento.

Nuestro resultado de agujas pequeñas en EPEC concuerda con la idea de que la longitud de la aguja ha evolucionado de acuerdo a las estructuras de pared bacteriana (lipopolisacáridos, adhesinas, etc.) y al mecanismo de infección (Mota, Journet et al. 2005; West, Sansonetti et al. 2005; Cornelis 2006). Por ejemplo en *Y. pestis* se ha visto que alargando la adhesina de membrana externa YadA, se reduce la eficiencia de translocación de cepas con agujas de longitud WT; pero que esta se restaura con agujas más largas que la adhesina, demostrando que la aguja necesita ser de una longitud mínima para ser funcional (Mota, Journet et al. 2005). EPEC al ser un patógeno extracelular que después de la aguja ensambla un filamento, probablemente no requiera una aguja larga para infectar enterocitos de manera eficiente.

Al analizar los inyectisomas purificados de la mutante $\Delta escP$, nuestros resultados mostraron que esta cepa polimeriza agujas más largas que las ensambladas por la cepa silvestre (Figura 31), sugiriendo que en ausencia de EscP, no se detiene la secreción de EscF una vez que la aguja ha alcanzado su tamaño determinado genéticamente. Se han propuesto diferentes modelos para explicar cómo se lleva a cabo el control de la longitud de la aguja/gancho (Makishima, Komoriya et al. 2001; Journet, Agrain et al. 2003; Agrain, Sorg et al. 2005; Marlovits, Kubori et al. 2006; Moriya, Minamino et al. 2006; Shibata, Takahashi et al. 2007; Botteaux, Sani et al. 2008; Wood, Jin et al. 2008; Wagner, Sorg et al. 2009; Erhardt, Hirano et al. 2010; Wagner, Stenta et al. 2010; Erhardt, Singer et al. 2011) y el más aceptado sugiere que la proteína T3S4 funciona como una regla molecular o cinta métrica que va midiendo la longitud de la estructura mientras se secreta. EscP es la más pequeña de todas las proteínas de la familia YscP/FliK y encontramos que parece haber una correlación entre la longitud de la aguja/gancho con el tamaño de la proteína que la controla; EscP, 138aa/ \approx 23nm; Spa32, 292aa/ \approx 45nm (Tamano, Aizawa et al. 2000; Tamano, Katayama et al. 2002); InvJ, 336aa/ \approx 50nm (Kimbrough and Miller 2000); FliK, 409aa/ \approx 55nm (Hirano, Yamaguchi et al. 1994) y YscP, 515aa/ \approx 60nm (Hoiczyk and Blobel 2001; Journet, Agrain et al. 2003). También encontramos que los inyectisomas ensamblados en ausencia de EscP no sólo pueden tener aguja larga, sino que también se ensambla filamento sobre esta, indicando que los filamentos pueden comenzar a polimerizarse de agujas de diferentes tamaños y que el cambio de especificidad de sustratos ocurre de manera aleatoria en comparación a la cepa WT. Otra observación importante es

que en la mutante $\Delta escP$ no todos los inyectisomas poseen agujas largas, sino que hay algunos inyectisomas con agujas de tamaño silvestre y otros que poseen filamentos muy largos (Figura 32). Encontramos también, que la mutante $\Delta escP$ forma un menor número de inyectisomas totalmente ensamblados comparando con los encontrados en la cepa WT, mientras que la estructura basal (anillo de membrana interna) permanece constante en ambas cepas (Fig. 34 y 35). Sin embargo, con el número de muestras obtenidas no fue posible hacer un análisis estadístico de dichos resultados en los inyectisomas purificados de la mutante $\Delta escP$, por lo que se requieren más experimentos para poder realizar un análisis cuantitativo y comparativo de los diferentes fenotipos observados.

Encontramos en la literatura un reporte de que el inyectisoma que ensambla *B. bronchiseptica* posee también un filamento (Medhekar, Shrivastava et al. 2009). Al igual que EscP, BscP de *B. bronchiseptica* es una proteína pequeña, no se ha descrito el tamaño de la aguja del inyectisoma de esta especie, sin embargo, en correlación a lo encontrado con EscP, creemos que esta pudiera ensamblar también una aguja pequeña. Estudios futuros en esta proteína serán claves para la determinación de la función de reglas moleculares pequeñas de inyectisomas que poseen filamento.

Como se mencionó anteriormente, una característica relevante de las proteínas que controlan la longitud de la aguja/gancho, es que todas se secretan a través del SST3 (Collazo, Zierler et al. 1995; Minamino, Gonzalez-Pedrajo et al. 1999; Payne and Straley 1999; Stainier, Bleves et al. 2000; Magdalena, Hachani et al. 2002; Tamano, Katayama et al. 2002; Agrain, Sorg et al. 2005), y se ha propuesto que la secreción es importante para la función de regla molecular (Minamino, Gonzalez-Pedrajo et al. 1999; Magdalena, Hachani et al. 2002; Agrain, Sorg et al. 2005). Encontramos que EscP es una proteína que se secreta a bajos niveles (Figura 36A), encajando con la propuesta de que la proteína T3S4 es sólo ocasionalmente secretada durante la polimerización de la aguja, y que se requieren pocas moléculas de la misma para realizar su función (se han reportado sólo 5-10 moléculas de FliK secretadas por flagelo) (Muramoto, Makishima et al. 1998; Minamino, Gonzalez-Pedrajo et al. 1999; Botteaux, Sani et al. 2008; Erhardt, Singer et al. 2011). De manera inesperada, encontramos que la secreción de EscP ocurre también, aunque en menor medida, de manera independiente al SST3 (ya que se secreta en la mutante de la ATPasa,

$\Delta escN$). Esto no se observó para ningún efector ni para EscI bajo las mismas condiciones del ensayo, señalando un caso específico para la secreción de EscP. A la fecha no hemos podido determinar la vía de secreción independiente del SST3, por lo que se necesitan más experimentos para elucidar este mecanismo. Esta secreción independiente nos impidió determinar la secreción de EscP en diversos fondos genéticos ($\Delta escF$, $\Delta escI$, $\Delta escO$, $\Delta sepL$, $\Delta escU_{NPTH}$) lo que hubiera servido para conocer la jerarquía de secreción de sustratos tempranos y el papel de la proteólisis de EscU en la secreción de EscP. En cuanto a la secreción de los sustratos tempranos sólo se ha reportado (y nosotros lo verificamos) que en una mutante $\Delta escF$ no se secreta EscI (Sal-Man, Deng et al. 2012).

El grupo del Dr. Namba demostró que la proteína FliK interacciona con la proteína que forma el gancho flagelar (FlgE), y que dicha interacción es importante para hacer eficiente el cambio de especificidad de sustratos (Minamino, Moriya et al. 2009). Con este antecedente, y dado que no hay una interacción homóloga reportada en los sistemas de virulencia, analizamos la interacción de EscP con la proteína de la aguja (EscF) y encontramos que las proteínas fueron capaces de interactuar tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 39), sugiriendo varios escenarios que pudieran explicar la funcionalidad de dicha interacción (ver más adelante). Además, encontramos que (i) EscP es capaz de interactuar con otro sustrato temprano, la proteína que forma el eje interno del inyectisoma (EscI) (Figura 40) y (ii) que EscP se requiere para la correcta secreción de este sustrato (EscI se hipersecreta en la mutante $\Delta escP$) (Figura 36B), sugiriendo que EscP regula directamente la secreción de esta proteína y posiblemente su ensamblaje. Una interacción equivalente se reportó en el patógeno de plantas *X. campestris pv. vesicatoria*, en donde HpaC interacciona con HrpB2 (Lorenz, Schulz et al. 2008), indicando que existe un mecanismo común de regulación de la proteína del eje en los SST3 de patógenos de plantas y de animales.

El control de la jerarquía de secreción de sustratos tempranos a intermedios (*Switch 1*) requiere de dos proteínas: la de la familia YscP/FliK y la de la familia YscU/FlhB, que es un componente del aparato de exportación localizado en la membrana interna (Ferris and Minamino 2006; Deane, Abrusci et al. 2010). La proteína homóloga a YscU/FlhB en EPEC es EscU que contiene 4 cruces transmembranales seguidos de una porción citoplásmica

grande que se corta autoproteolíticamente en el motivo NPTH, resultando en dos subdominios: EscU_{CN} y EscU_{CC} (Zarivach, Deng et al. 2008). Como demostramos con la purificación de His-EscU_C, los subdominios permanecen unidos después del corte ya que son capaces de coeluir (Figura 24).

Demostramos que EscP interacciona con EscU (miembro de la familia YscU/FlhB) y específicamente para esta interacción, sólo se requieren los últimos 83 residuos de la porción C-terminal de la proteína (EscU_{CC}). Esta interacción indica que en EPEC las dos proteínas son parte de un mecanismo de control de secreción de proteínas conservado en los patógenos de animales, plantas y en el flagelo. Encontramos también que en EPEC, no se trata de un *switch* canónico (todo o nada), ya que en ausencia tanto de EscP como del corte en el sitio NPTH de EscU (necesario para el *switch*) aún se secretan sustratos (Thomassin, He et al. 2011; Monjaras Feria, Garcia-Gomez et al. 2012). Se ha reportado que en el sistema flagelar el control de la longitud del gancho está ligado al ensamblaje del filamento (la mutante $\Delta fliK$ que genera poliganchos no secreta ni ensambla filamento), y de la misma manera, mutantes en *yscP*, *spa32* e *invJ* ensamblan poliaguja pero no son capaces de secretar sustratos tardíos (Kubori, Sukhan et al. 2000; Magdalena, Hachani et al. 2002; Tamano, Katayama et al. 2002; Journet, Agrain et al. 2003). Nosotros encontramos que en la mutante $\Delta escP$ aparte de secretar sustratos, ensambla algunos filamentos y es capaz de formar poros de translocación en la célula eucarionte (ya que presenta actividad hemolítica), aunque todo en menor cantidad que la cepa EPEC silvestre. Estos resultados de formación de algunos inyectisomas funcionales coinciden con lo reportado para la mutante $\Delta orf16$ de CR, la cual es parcialmente competente en la formación de pedestales y posee virulencia atenuada en ratones (Deng, Puente et al. 2004). También, en concordancia con nuestros resultados, y a la par de la publicación de nuestros resultados, se reportó que en *S. flexneri*, la mutante $\Delta spa32$ puede formar poro de translocación y posee actividad hemolítica disminuida, demostrando que en ausencia de la regla molecular Spa32 ocurre un cambio de especificidad autónomo y que este no está finamente acoplado al control de la longitud de la aguja (Shen, Moriya et al. 2012).

Un modelo alternativo al de la regla molecular (que yo más que alternativo lo considero complementario) plantea que el ensamblaje del eje interno determina el tamaño de la aguja

y que también es necesario para que se dé el *switch 1*. En *S. enterica* se propone que la proteína InvJ estabiliza la conformación de una estructura localizada en el aparato de exportación (denominada “socket”), que permite que se complete el ensamblaje del eje y que este sirve de anclaje para la aguja (Marlovits, Kubori et al. 2006). En *Y. pseudotuberculosis* se reportó que una mutante $\Delta yscP$ hipersecreta a la proteína del eje interno (YscI) y que en una mutante supresora de este fenotipo (en YscU_C) se recupera la secreción a niveles silvestres, sugiriendo que la formación del eje y el *switch* están estrechamente relacionados (Wood, Jin et al. 2008). De acuerdo a estas propuestas y a lo encontrado para EscP, proponemos que el defecto en el ensamblaje de inyectisomas de la $\Delta escP$ pudiera deberse a la incorrecta formación del eje interno. En nuestras purificaciones no encontramos inyectisomas con agujas largas sin cuerpo basal, con lo que creemos que en EPEC la formación del eje interno es indispensable para el ensamblaje del inyectisoma. Dado que en la $\Delta escP$ tampoco observamos agujas largas sin filamento, proponemos la hipótesis de que en ausencia de EscP la reducción en el número de inyectisomas se debe a la falta de formación de eje interno, y que los pocos que logran ensamblarse es porque ocurre una leve formación espontánea de ejes, permitiendo el anclaje y ensamblaje de la aguja que a su vez promueve el cambio de especificidad autónomo, lo que posibilita la secreción de translocadores y efectores. En el trabajo donde se cristalizó la porción C-terminal de EscU (Zarivach, Deng et al. 2008), se propuso que en EPEC, EscU podría pasar por alto el proceso de regular la longitud de la aguja. Sin embargo, en este trabajo demostramos que sí existe tal mecanismo, pero que es posible que la conformación de EscU_C después del corte (que es diferente a la de SpaS y FlhB en que estas tienen un α -hélice más grande) pueda favorecer el cambio de especificidad independiente de EscP (Monjaras Feria, Garcia-Gomez et al. 2012).

En resumen, en la Figura 44 se muestra un modelo de lo que ocurre en ausencia de EscP con respecto a la biogénesis y funcionamiento del inyectisoma de EPEC. Una vez ensamblados los anillos en las membranas de la bacteria, se ensambla el aparato de exportación (Diepold, Amstutz et al. 2010; Wagner, Konigsmair et al. 2010; Diepold, Wiesand et al. 2011) que incluye a la proteína EscU, que contiene 4 cruces transmembranales y la región C-terminal (EscU_C) que permanece en el citoplasma. El sustrato temprano EscI es reconocido por el aparato de exportación al interactuar con

EscU sin cortar (Sal-Man, Deng et al. 2012). En ausencia de EscP, EscI se acumula en el citoplasma, se hipersecreta y se evita el ensamblaje del eje interno (Figura 44A). De manera aleatoria pocos ejes (probablemente ensamblados de forma incorrecta) logran formarse y sirven de anclaje para la formación de la aguja. EscF se secreta de manera descontrolada y se forman algunas agujas largas. EscU_C se corta en dos subdominios, EscU_{CC} y EscU_{CN}, que permanecen firmemente asociados (Figura 44B). Sin EscP, no se da la señal de que la aguja terminó de ensamblarse a una longitud silvestre y no se da un cambio conformacional en EscU_{CC} por la interacción de EscP, por lo que los translocadores no pueden ser reconocidos (Figura 44C). De manera autónoma, probablemente por la conformación particular de EscU_C después del corte (Zarivach, Deng et al. 2008), se da el cambio conformacional (cambio de especificidad) y se secretan los translocadores y se ensambla el filamento. El complejo SepD-SepL retiene a los efectores, aunque por posible comunicación con EscP, sumado al retraso en la salida de translocadores, esta función no es tan eficiente y permite la secreción de los efectores. Es importante mencionar que EPEC se crece *in vitro* en medio DMEM, el cual induce la salida de efectores, con lo que creemos que se debe encontrar una condición (medio) en el cual no esté forzada la salida de las proteínas efectoras y poder así determinar si la secreción de efectores en la mutante $\Delta escP$ es dependiente o no de una señal endógena. CesT (que no interacciona con EscP) está libre en el citoplasma y su función de llevar a los efectores a la base del aparato es mucho más eficiente (Figura 44D). Una vez que se logran formar algunos poros de translocación, el complejo SepD-SepL recibe la señal correcta y permite la salida de los efectores a tiempo (Figura 44E).

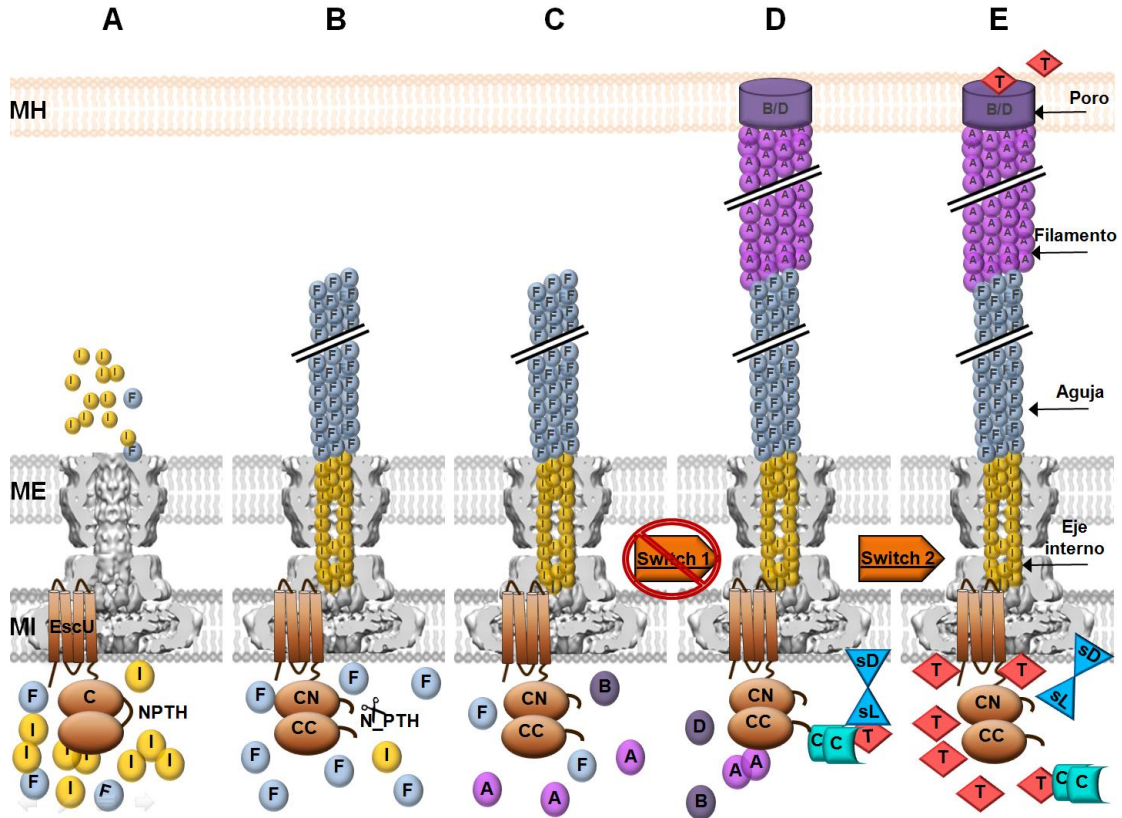


Fig. 44 Representación esquemática de los eventos que ocurren en ausencia de EscP. (A) Se secreta EscF (círculos azules, F) y EscI (círculos amarillos, I) se hipersecreta. Los cruces transmembranales del componente del aparato de exportación EscU (en café) se representan en la membrana interna (MI), mientras que la porción del carboxilo soluble, en el citoplasma (EscU_C: C). (B) EscU_C se autoproteoliza en el motivo NPTH y los dos dominios CC y CN permanecen firmemente asociados. Se logran ensamblar algunos ejes internos, permitiendo el anclaje y ensamblaje de la aguja. (C) En ausencia de EscP no se regula la longitud de la aguja y esta crece desproporcionadamente. Se da un cambio de especificidad de sustratos autónomo (D) Se secretan las proteínas translocadoras EspA (círculos púrpuras, A), EspB (círculos morados, B) y EspD (círculos morados, D). El complejo CesT-Tir, (diagramas azul claro, C) Tir (rombos rojos, T) no previene de manera silvestre, junto con el complejo SepD (triángulos azules, sD)-SepL (triángulos azules, sL), la secreción temprana de efectores. Se ensamblan algunos poros de translocación (B/D) en la membrana de la célula hospedera (MH). (E) El complejo SepD-SepL desregulado detecta la señal de contacto y continúa la secreción de efectores. ME: membrana externa. El cuerpo basal se tomó y adaptó de (Schraidt and Marlovits 2011).

Tomando en conjunto nuestros resultados y los publicados en estudios previos, sugerimos un modelo para explicar la función de EscP en condiciones silvestres (Figura 45). Una vez que se ensamblan los anillos membranales y el aparato de exportación (Diepold, Amstutz et al. 2010; Wagner, Konigsmair et al. 2010; Diepold, Wiesand et al. 2011), se reconocen y secretan los sustratos tempranos EscI (eje interno), EscF (aguja) y EscP. EscP interacciona tanto con EscI como con EscF para regular su secreción. EscI

también interacciona con EscU y se ha descrito que esta interacción es independiente del corte de EscU (una mutante EscU_{N262A} sigue interactuando con EscI) y se cree que esta interacción puede retrasar el corte de EscU_C (Sal-Man, Deng et al. 2012) (Figura 45A). Conforme procede la secreción de los sustratos tempranos, la concentración local de estos en el aparato de exportación disminuye y EscI libera a EscU y la proteína se autoproteoliza (Sal-Man, Deng et al. 2012). Con el corte proteolítico se crea una conformación apropiada para la interacción con otros sustratos (Zarivach, Deng et al. 2008). Además como se ha sugerido para el sistema flagelar, el corte proteolítico pudiera frenar la tasa de secreción de los sustratos tempranos (Minamino, Imada et al. 2008). El eje se ensambla y esto permite el firme anclaje de la aguja, al mismo tiempo EscP es ocasionalmente secretada para ir midiendo la longitud de la aguja (Figura 45B). Cuando la aguja llega a los ≈ 23 nm de longitud, EscP dentro de esta interacciona con mayor afinidad con EscF, provocando una pausa temporal que bloquea el canal de secreción, permitiendo la interacción de EscU_{CC} con EscP en el citoplasma. Esta interacción promueve un cambio conformacional en EscU_{CC} que cambia la especificidad de secreción de sustratos, permitiendo la secreción de los translocadores (Figura 45C). Mientras se ensambla el translocón, el complejo EscP-CesT-Tir, junto con el *switch 2* SepL-SepD, previene la salida de los efectores hasta que se forma el poro de translocación en la membrana del enterocito. Está reportado que la interacción SepL-Tir es importante para retener la secreción de los demás efectores (Thomas, Deng et al. 2007; Wang, Roe et al. 2008) (Figura 45D). Finalmente, se transmite una señal (de origen desconocido) hacia el complejo SepD-SepL de que el translocón está completamente ensamblado y se permite la salida de los efectores directamente al citoplasma de la célula hospedera (Figura 45E).

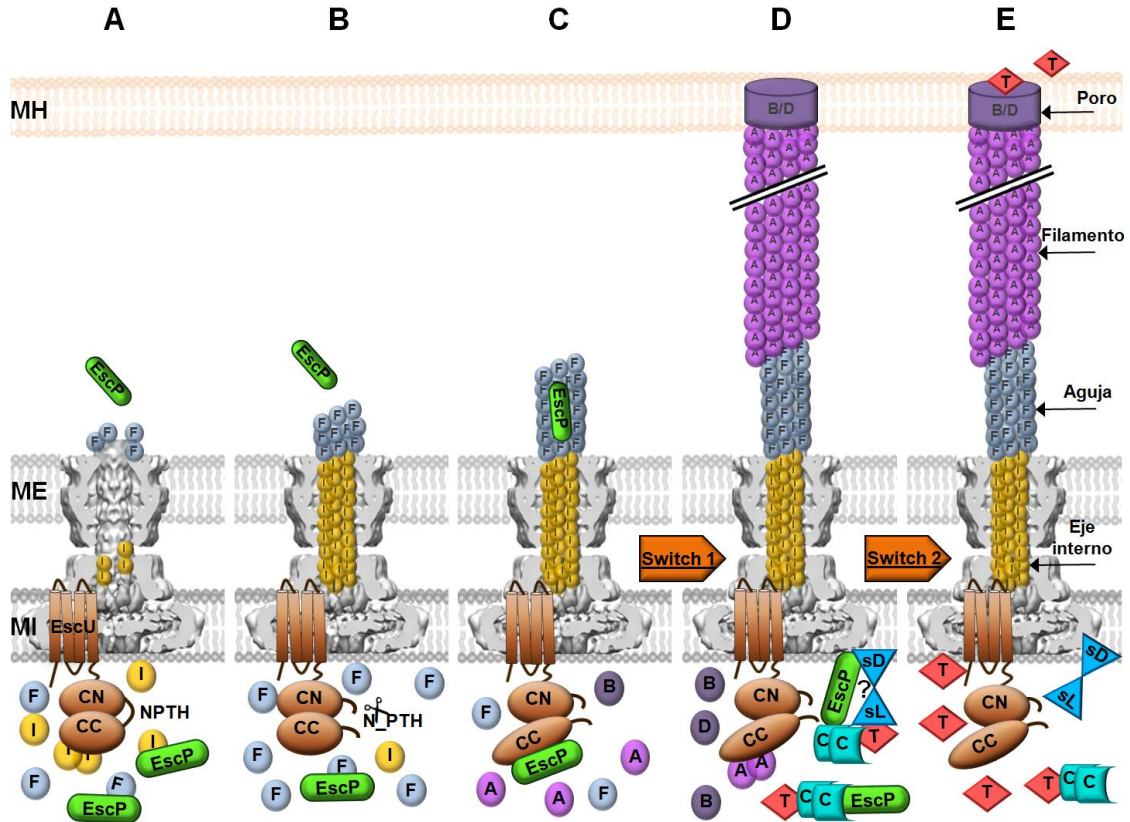


Fig. 45 Representación esquemática del mecanismo de control de la longitud de la aguja y el cambio de especificidad de sustratos mediados por EscP del LEE de EPEC. (A) Se secretan los sustratos tempranos, EscP interacciona con ambos, EscF (círculos azules, F) y EscI (círculos amarillos, I) para regular su secreción. Los cruces transmembranales del componente del aparato de exportación EscU (en café) se representan en la membrana interna (MI), mientras que la porción carboxilo soluble, en el citoplasma (EscU_C: CN y CC). (B) EscU_C se autoproteoliza en el motivo NPTH y los dos dominios CC y CN permanecen firmemente asociados. Se ensambla el eje interno, permitiendo el firme anclaje y ensamblaje de la aguja. EscP se secreta intermitentemente durante la polimerización de la aguja. (C) EscP determina la longitud de la aguja desde dentro del canal. EscP interacciona con CC promoviendo un cambio conformacional que cambia la especificidad de secreción de sustratos (*Switch 1*). (D) Se secretan las proteínas translocadoras EspA (círculos púrpuras, A), EspB (círculos morados, B) y EspD (círculos morados, D). EscP en complejo con CesT (diagramas cian, C)- Tir (rombos rojos, T) previene, junto con SepD (triángulos azules, sD)-SepL (triángulos azules, sL), la secreción temprana de efectores hasta que el poro de translocación (B/D) se ha formado en la membrana de la célula hospedera (MH). (E) El complejo SepD-SepL detecta la señal de contacto y se activa el segundo cambio de especificidad de sustratos (*Switch 2*) de translocadores a efectores. ME: membrana externa. El cuerpo basal se tomó y adaptó de (Schraidt and Marlovits 2011).

Basándose en nuestros resultados e incorporando datos de otros SST3, Hughes K (Hughes 2012) propuso un modelo de cómo podría EscP regular la longitud de la aguja y participar en el cambio de especificidad de sustratos (Figura 46 en el Anexo III).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo dilucidamos el papel de la proteína EscP (antes Orf16) en el ensamblaje y funcionamiento del SST3 de EPEC.

Reportamos que EscP es necesaria para regular la secreción de los sustratos tempranos EscI (eje interno) y EscF (aguja) y detiene su secreción una vez que se ha ensamblado correctamente el eje y la aguja ha alcanzado su longitud silvestre de 23 nm. Encontramos también, que la proteína EscP es indispensable para ensamblar el número silvestre de inyectisomas.

La proteína EscP se requiere para la eficiente secreción de translocadores (EspA, EspB y EspD) y para regular la salida de las proteínas efectoras codificadas en el LEE y fuera de él (Nle's).

Encontramos que EscP interacciona con el extremo carboxilo de la proteína EscU (EscU_{CC}), sugiriendo que estas dos proteínas forman parte de un “switch” presente en diversos SST3 que se encarga de cambiar la especificidad de secreción de sustratos tempranos a intermedios y tardíos. EscP es capaz de interactuar además, con múltiples proteínas del SST3: con la proteína del eje, EscI; con la proteína que forma la aguja, EscF y con la chaperona de efectores CesT.

En este trabajo mostramos que los extremos amino y carboxilo de la proteína son necesarios para su función en la regulación de la secreción.

Demostramos que EscP pertenece a la familia YscP/FliK y que Orf16 de *Citrobacter rodentium* es intercambiable con EscP, sugiriendo que en los patógenos A/E estas proteínas cumplen la misma función. Al contrario, FliK de *Salmonella*, que cumple una función análoga a EscP en el sistema flagelar, no puede suplir la función de EscP.

P E R S P E C T I V A S

Este fascinante proyecto ha dado las bases de una línea novedosa en el campo del SST3 y quedan muchas preguntas por contestar. A continuación enlisto algunas de las cosas por hacer:

- Conocer si existe una conexión directa entre el *Swicth 1*(EscP-EscU) y el *Swicth 2* (SepL-SepD) de EPEC, ya que los fenotipos de las mutantes $\Delta escP$, $\Delta sepL$ y $\Delta sepD$, son similares en cuanto a la hipersecreción de efectores.
- Analizar si EscU_{CC} se está dissociando de EscU_{CN} y secretando en la cepa EPEC WT y comparar el resultado en la $\Delta escP$, verlo también en presencia de calcio ya que en esta condición no se debería dissociar. Este punto surge a partir de un trabajo muy reciente donde se reportó que YscU_{CC} se disocia de la porción YscU_{CN} y que con el cambio de calcio, pH y temperatura se favorece su secreción (Frost, Ho et al. 2012).
- Aún se desconoce la naturaleza de la señal que induce la secreción de proteínas a través del SST3 una vez que se hace contacto con la célula eucarionte. El Ca²⁺ es un candidato y sería interesante conocer el papel de este ion bivalente en la secreción de proteínas en la mutante $\Delta escP$.
- Definir la señal de secreción de EscP y conocer si la secreción de EscP es necesaria para alguna de sus funciones.
- Conocer el papel de las regiones amino y carboxilo de EscP silvestre o con etiquetas en esas mismas regiones en cuanto a la regulación de la longitud de la aguja, a la cantidad de inyectisomas ensamblados o para la interacción con otros sustratos del SST3.
- Dilucidar si existe una relación entre el ensamblaje del filamento EspA y la regulación de la longitud de la aguja.
- Conocer la jerarquía de secreción de los sustratos tempranos EscI, EscF y EscP.
- Conocer en detalle el mecanismo de regulación de la longitud de la aguja por EscP.

- Demostrar que la formación del eje interno se requiere para la secreción de proteínas y que en ausencia de EscP no se ensamblan suficientes ejes internos.
- Mapear los dominios de interacción de EscP con los diferentes sustratos para saber si son sitios únicos o redundantes. Se propone que el C-terminal de EscP interacciona con el C-terminal de EscU y que el N-terminal de EscP interacciona con EscF y con CesT.
- Encontrar otros sustratos con los que EscP podría interactuar (Tir, Orf15, EscN, SepD, EspA, EspD, EscQ o EscV) y estudiar la funcionalidad de dichas interacciones.
- Saber si el corte proteolítico de EscU modifica su capacidad de interacción con otros sustratos del SST3 (incluido EscP).
- Demostrar que CesT no es chaperona de EscP y conocer la funcionalidad de la interacción.

ANEXO I

Función de los genes codificados dentro de la isla LEE, así como de algunos factores de virulencia codificados fuera de ella.

Nº	Genes del LEE	Función del producto
1	<i>rorf1</i>	
2	<i>espG</i>	<p>Equivalente de la proteína VirA de <i>S. flexneri</i>, EspG es necesaria para la colonización (Elliott, Krejany et al. 2001).</p> <p>Altera la función de las uniones estrechas (Glotfelty and Hecht 2012).</p> <p>Ocasiona la formación de fibras de actina y la destrucción de la red de microtúbulos debajo de la bacteria adherida. Tiene la capacidad de interactuar con la tubulina y estimular la desestabilización de microtúbulos provocando la activación de la vía RhoA-ROCK por medio del activador GEF-H1 (Matsuzawa, Kuwae et al. 2004; Shaw, Smollett et al. 2005).</p> <p>Contribuye a la inhibición del transporte de iones Cl⁻/OH⁻ en la membrana apical, mediante la modulación de la expresión de los intercambiadores de iones (DRA y PAT-1) (Gill, Borthakur et al. 2007).</p> <p>Activa a la cisteín-proteasa calpaína y media la destrucción de la monocapa epitelial, lo que lleva al desprendimiento de las células hospederas durante la infección (Dean, Muhlen et al. 2010).</p> <p>Ya se determinó su estructura cristalográfica (PDB 3Q1C) (Germane and Spiller 2011).</p> <p>Se une directamente al dominio inhibitorio de la Ser/Thr cinasa humana p21 (PAK), actúa como GTPasa, activándola y reclutándola en los sitios de adherencia de EPEC (Germane and Spiller 2011).</p> <p>Altera la estructura y función del aparato de Golgi (Clements, Smollett et al. 2011).</p>
3	<i>ler</i>	<p>Regulador positivo tanto de la isla LEE como de otros factores de virulencia fuera del LEE (<i>espC</i>) y (Mellies, Elliott et al. 1999; Elliott, Sperandio et al. 2000; Sperandio, Mellies et al. 2000; Mellies, Barron et al. 2007; Yang, Tauschek et al. 2010).</p> <p>Activa la transcripción quitando el silenciamiento dado por H-NS, y al igual que H-NS se une a secuencias ricas en AT (Bustamante, Santana et al. 2001; Barba, Bustamante et al. 2005; Yang, Tauschek et al. 2010).</p> <p>Es capaz de oligomerizar y formar estructuras toroidales con el DNA involucradas en la estimulación de la expresión génica (Mellies, Benison et al. 2011).</p>
4	<i>orf2</i>	
5	<i>cesAB</i>	Chaperona de los translocadores EspA y EspB (Creasey, Friedberg et al. 2003).
6	<i>orf4</i>	
7	<i>escL</i>	Proteína citoplásmica, es un regulador de la ATPasa. Interacciona y forma un complejo junto con EscQ y EscN (Biemans-Oldehinkel, Sal-Man et al. 2011)
8	<i>escR</i>	Componente de la membrana interna del aparato de exportación del SST3. Interacciona con las proteínas EscS, EscU y EspD (Creasey, Delahay et al. 2003;

		Vidal, Canizalez-Roman et al. 2007).
9	<i>escS</i>	Componente de la membrana interna del aparato de exportación del SST3. Interacciona con las proteínas EscR y EspD (Creasey, Delahay et al. 2003; Vidal, Canizalez-Roman et al. 2007).
10	<i>escT</i>	Componente de la membrana interna del aparato de exportación del SST3 (Vidal, Canizalez-Roman et al. 2007).
11	<i>escU</i>	Componente de la membrana interna del aparato de exportación del SST3. Sufre corte autocatalítico en la región C-terminal ubicada en el citoplasma (Zarivach, Deng et al. 2008). Es esencial para la translocación de efectores a la célula hospedera (Thomassin, He et al. 2011). Interacciona con la proteína EscP para favorecer la secreción de proteínas translocadoras (Monjaras Feria, Garcia-Gomez et al. 2012). Interacciona también con las proteínas EscR, EspD y EscI (Creasey, Delahay et al. 2003).
12	<i>etgA</i>	Transglicosilasa lítica necesaria para la eficiente secreción de proteínas del SST3 (Garcia-Gomez, Espinosa et al. 2011).
13	<i>grlR</i>	Regulador negativo del LEE, interacciona con GrlA suprimiendo su unión al LEE1 (Huang and Syu 2008).
14	<i>grlA</i>	Regulador positivo del LEE, activa el inicio de la transcripción del operón LEE1 uniéndose a su región promotora P1, lo que a su vez incrementa los niveles de Ler (Barba, Bustamante et al. 2005; Huang and Syu 2008; Islam, Bingle et al. 2011). Actúa como regulador negativo de la expresión de genes flagelares (Iyoda, Koizumi et al. 2006). Actúa como un antagonista de H-NS en el promotor de <i>ler</i> . Contiene dos dominios funcionales, uno involucrado en la activación transcripcional y de unión al ADN y el otro, para heterodimerización con GrlR (Jimenez, Cruz-Migoni et al. 2010).
15	<i>cesD</i>	Chaperona del translocador EspD (Wainwright and Kaper 1998).
16	<i>escC</i>	Componente de la membrana externa del SST3. Pertenecce a la familia de las secretinas, forma un anillo en la membrana externa que funciona como canal (Spreter, Yip et al. 2009).
17	<i>sepD</i>	Regula positivamente la salida de translocadores y negativamente la salida de efectores. Forma un complejo con SepL, formando un “switch” o interruptor molecular que regula de manera jerárquica la secreción de proteínas (Deng, Li et al. 2005)
18	<i>escJ</i>	Componente de la membrana interna del SST3. Pertenecce a la familia de las lipoproteínas. Forma un anillo de 24 subunidades (Spreter, Yip et al. 2009).
19	<i>escI</i>	Forma el eje interno del SST3, funcionando como conector en la base de la aguja (Sal-Man, Deng et al. 2012). Interacciona con EscU (Creasey, Delahay et al. 2003).
20	<i>espZ</i>	Interacciona con la proteína CD98 del hospedero, lo que contribuye a la protección contra la citotoxicidad mediada por EPEC, siendo un antagonista de la muerte celular (Shames, Deng et al. 2010). Se localiza en la mitocondria e interacciona con la translocasa de membrana interna mitocondrial TIM17b manteniendo el potencial de membrana, lo que contribuye a la protección en contra de la rápida muerte celular durante la infección (Shames, Croxen et al. 2011). Protege a las células epiteliales infectadas mediante la inhibición de la vía apoptótica intrínseca (Roxas, Wilbur et al. 2012). Regula la inhibición de la translocación de otros efectores, papel clave para la colonización exitosa evitando la muerte celular manteniendo la viabilidad de la célula infectada (Berger, Crepin et al. 2012).

21	<i>orf12</i>	Posible chaperona de SepL (Younis, Bingle et al. 2010).
22	<i>escV</i>	Componente de la membrana interna del aparato de exportación del SST3. Se propone que su dominio citoplásmico está involucrado en el posicionamiento de los sustratos que se secretan vía SST3 (Gauthier, Puente et al. 2003). Citas
23	<i>escN</i>	ATPasa homohexamérica (Andrade, Pardo et al. 2007; Zarivach, Vuckovic et al. 2007). Se propone que es importante para el direccionamiento de los sustratos que son secretados, que la energía de ATP es utilizada para la disociación de complejos sustrato-chaperona y contribuye al desplegamiento de las proteínas a ser secretadas (Akeda and Galan 2005). Interacciona con las proteínas EscL, EscQ, EscO, Tir y CesT (Gauthier and Finlay 2003; Biemans-Oldehinkel, Sal-Man et al. 2011).
24	<i>orf15 (escO)</i>	Componente esencial para la secreción de proteínas, interacciona con EscC (Sal-Man, Biemans-Oldehinkel et al. 2012).
25	<i>orf16 (escP)</i>	Regula el ensamblaje del eje y controla la longitud de la aguja. Regula la eficiente secreción de translocadores y efectores junto con EscU. (Este estudio) (Monjaras Feria, Garcia-Gomez et al. 2012).
26	<i>escQ</i>	Componente que forma un anillo citosólico asociado a la membrana interna. Interacciona y forma un complejo junto con EscL y EscN Se propone que actúa como una plataforma de reclutamiento para las proteínas secretadas vía SST3 (Biemans-Oldehinkel, Sal-Man et al. 2011).
27	<i>espH</i>	Es un modulador de la actina del citoesqueleto de la célula hospedera. Reprime la formación de filipodios y favorece la formación de los pedestales de actina (Tu, Nisan et al. 2003). Es un antagonista de la fagocitosis por macrófagos, mediante la inactivación de la vía de señalización de las Rho GTPasas (Dong, Liu et al. 2010). Induce el desensamblaje de las adhesiones focales, provoca desprendimiento celular, activa a la Caspasa 3 e induce citotoxicidad (Wong, Clements et al. 2012).
28	<i>cesF</i>	Chaperona del efector EspF (Elliott, O'Connell et al. 2002).
29	<i>map</i>	Se localiza en la mitocondria (posee una secuencia N terminal de direccionamiento mitocondrial) y promueve la formación de filipodios (Kenny, Ellis et al. 2002). Es esencial para interrumpir la función de la barrera intestinal y altera las uniones estrechas (Dean and Kenny 2004). Provoca la disfunción del organelo y disminuye el potencial de membrana mitocondrial, lo que lleva a la muerte celular. Su importación involucra a las translocasas de la membrana externa mitocondrial (Tom22 y Tom40) (Papatheodorou, Domanska et al. 2006). Interacciona con el factor regulador del intercambiador de Na ⁺ /H ⁺ (NHERF1), promoviendo la diarrea por la afectación en la absorción de sal y agua a través del epitelio intestinal (Simpson, Shaw et al. 2006). Es el principal inhibidor de la actividad del co-transportador de sodio-D-glucosa (SGLT-1) y participa en la eliminación de las microvellosidades (Dean, Maresca et al. 2006). Pertenece al grupo de efectores WxxxE, que contienen un motivo Trp-xxx-Glu. Promueve la formación de filipodios mediante la activación de la Rho GTPasa, Cdc42 (Berger, Crepin et al. 2009; Bulgin, Raymond et al. 2010).
30	<i>tir</i>	Receptor de la adhesina de membrana externa intimina. Activa la vía de señalización que lleva a la formación de pedestales, inactiva el intercambiador de sodio y glucosa (SGL-1) (ver texto).
31	<i>cesT</i>	Multi-chaperona de los efectores Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ, NleA, NleG, NleH1 y NleH2 (Delahay, Shaw et al. 2002; Thomas, Deng et al. 2005; Thomas, Deng et al. 2007; Thomas, Ma et al. 2012).

32	<i>eae</i>	Adhesina de la membrana externa, denominada intimina. Interacciona con Tir para desencadenar una cascada de señalización en el citoplasma de la célula hospedera (Jerse and Kaper 1991; Kenny, DeVinney et al. 1997; Hayward, Leong et al. 2006).
33	<i>escD</i>	Componente de la membrana interna del cuerpo basal del SST3 (Spreter, Yip et al. 2009).
34	<i>sepL</i>	Regula positivamente la salida de translocadores y negativamente la salida de efectores. Forma un complejo con SepD, formando un “switch” o interruptor molecular que regula de manera jerárquica la secreción de proteínas (Deng, Li et al. 2005).
35	<i>espA</i>	Proteína translocadora que se secreta a través del SST3. Polimeriza (miles de subunidades) hasta 700 nm para formar el filamento extracelular del SST3. El filamento es esencial para la translocación de proteínas efectoras (Knutton, Rosenshine et al. 1998; Sekiya, Ohishi et al. 2001; Shaw, Daniell et al. 2001).
36	<i>espD</i>	Proteína translocadora que se secreta a través del SST3. Forma junto con EspB el poro en la membrana de la célula hospedera, necesario para la translocación de proteínas efectoras (Lai, Wainwright et al. 1997; Kresse, Rohde et al. 1999; Daniell, Delahay et al. 2001). Contiene dos motivos <i>coiled-coil</i> y dos dominios transmembranales (Wachter, Beinke et al. 1999).
37	<i>espB</i>	Proteína translocadora que se secreta a través del SST3. Forma junto con EspD el poro en la membrana de la célula hospedera, necesario para la translocación de proteínas efectoras secretadas por el SST3 (Wolff, Nisan et al. 1998). Requiere a EspA y a EspD para su secreción, pero sólo interacciona con EspD (Taylor, O'Connell et al. 1998; Luo and Donnenberg 2011). Se transloca a la célula hospedera y funciona también como efector promoviendo la reorganización de actina mediante la unión a la α -catenina (Hamaguchi, Hamada et al. 2008).
38	<i>cesD2</i>	Segunda chaperona del translocador EspD (Neves, Mundy et al. 2003).
39	<i>escF</i>	Oligomeriza (cientos de subunidades) para formar la aguja del SST3 (Wilson, Shaw et al. 2001).
40	<i>cesA2</i>	Segunda chaperona del translocador EspA (Su, Kao et al. 2008).
41	<i>espF</i>	Incrementa la apoptosis de las células epiteliales infectadas. No se requiere para la formación de la lesión A/E, involucrado en la alteración de la resistencia transepitelial, en incrementar la permeabilidad y en la redistribución de la proteína ocludina de las uniones estrechas (McNamara, Koutsouris et al. 2001). Se localiza en la mitocondria, importante para la permeabilización de la membrana mitocondrial durante la infección, se asocia a la liberación de citocromo c de la mitocondria (Nougayrede and Donnenberg 2004). Se une y activa a la proteína SNX9 (Sorting nexin 9), involucrada en la regulación del tráfico vesicular y endocitosis. Esta interacción induce el remodelamiento en la membrana del hospedero y la invasión (Marches, Batchelor et al. 2006; Alto, Weflen et al. 2007; Weflen, Alto et al. 2010). Inhibe la vía de la cinasa PI-3, contribuyendo a la actividad anti-fagocítica (Quitard, Dean et al. 2006). Facilita la muerte celular, interactuando e interfiriendo con la función protectora de la proteína Abcf2 del hospedero, que pertenece a la super-familia de

		<p>transportadores ABC (Nougayrede, Foster et al. 2007).</p> <p>Es responsable de la disminución de la actividad del intercambiador de sodio-hidrógeno, NHE3⁶ (Hodges, Alto et al. 2008).</p> <p>Se localiza dentro del núcleo de la célula hospedera y causa alteraciones en él (Holmes, Muhlen et al. 2010).</p> <p>Contribuye a la longitud de los pedestales de actina inducidos por la infección (Holmes, Muhlen et al. 2010).</p> <p>Causa la liberación del citocromo c y provoca el agotamiento de proteínas antiapoptóticas, lo que inicia la cascada apoptótica (Holmes, Muhlen et al. 2010).</p>
N°	Genes fuera del LEE	Función
42	<i>nleA/espI</i>	<p>Se localiza en el aparato de Golgi (Gruenheid, Sekirov et al. 2004).</p> <p>Contribuye a la disminución de la resistencia transepitelial, se requiere para la destrucción de las uniones estrechas, lo cual es independiente de su dominio de unión PDZ (Thanabalasuriar, Koutsouris et al. 2010).</p> <p>Se une e inhibe al complejo COPII, el cual juega un papel importante en el empaquetamiento y tráfico de proteínas en los sitios de salida del retículo endoplásmico (Kim, Thanabalasuriar et al. 2007).</p>
43	<i>nleB</i>	<p>Suprime la activación de NF-κB (nuclear factor κB), lo que reduce la producción de IL-8 (Newton, Pearson et al. 2010).</p>
43	<i>nleC</i>	<p>No juega ningún papel en la formación de la lesión A/E o adherencia (Marches, Wiles et al. 2005).</p> <p>Es una zinc metaloproteasa que degrada componentes del factor NF-κB, contribuyendo a la inhibición de la activación de la respuesta inmune innata (secreción de IL-8) (Yen, Ooka et al. 2010; Pearson, Riedmaier et al. 2011).</p> <p>Degrada a la proteína nuclear del hospedero acetiltransferasa p300, que es un co-activador de la transcripción de muchos genes, incluyendo IL-8 (Shames, Bhavsar et al. 2011).</p> <p>Inhibe la activación de la cinasa MAPK p38 (Sham, Shames et al. 2011).</p>
44	<i>nleD</i>	<p>Comparte similitud con el efector HoptoH de <i>Pseudomonas syringae</i>, no juega ningún papel en la formación de la lesión A/E o adherencia (Marches, Wiles et al. 2005).</p> <p>Es una zinc metaloproteasa que inhibe la señalización pro-apoptótica mediante el corte e inactivación de la cinasa JNK (JUN-NH₂-terminal kinase) y la subunidad p65 de NF-κB, inhibiendo la actividad pro-apoptótica de JNK (Baruch, Gur-Arie et al. 2011).</p>
45	<i>nleE</i>	<p>Bloquea la translocación nuclear de la subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB, lo que provoca el bloqueo de la respuesta inflamatoria (Newton, Pearson et al. 2010).</p>
46	<i>nleF</i>	<p>Contribuye a la colonización, pero no a la adherencia o formación del pedestal (Echtenkamp, Deng et al. 2008).</p>
47	<i>nleG</i>	<p>Identificado con la secuenciación del genoma de EPEC, pero de función</p>

⁶ NHE3 es la ruta primaria de absorción de Na⁺ que entra al epitelio intestinal desde lumen y es un blanco común de los patógenos que causan diarrea Hodges, K., N. M. Alto, et al. (2008). "The enteropathogenic *Escherichia coli* effector protein EspF decreases sodium hydrogen exchanger 3 activity." *Cell Microbiol* **10**(8): 1735-1745.

		desconocida (Iguchi, Thomson et al. 2009).
48	<i>nleH1-2</i>	Se unen a la proteína ribosomal S3 (RPS3), que es una subunidad del complejo NF- κ B, reduciendo su actividad nuclear e interrumpiendo la respuesta inmune innata (Gao, Wan et al. 2009). Inhiben apoptosis por la interacción con el inhibidor Bax 1 (BI-1) (Hemrajani, Berger et al. 2010). Atenúan la activación de NF- κ B, mediante la inhibición de la ubiquitinación de I κ B modulando así la respuesta inflamatoria en el hospedero y facilitando la colonización durante la patogénesis. En su sitio catalítico, tienen lisinas esenciales para su función (Royan, Jones et al. 2010). NleH1 se une al factor 2 regulador del intercambiador de Na ⁺ /H ⁺ (NHERF2), promoviendo anti-apoptosis (Martinez, Schroeder et al. 2010). Pueden interactuar entre ellas y recientemente se demostró que tienen algunas diferencias funcionales, ya que NleH1, pero no NleH2 previene la asociación de RPS3 con NK- κ B (Pham, Gao et al. 2012).
49	<i>nleI</i>	Se encontró que es regulado a nivel transcripcional por SepD pero no por Ler ni por SepL. Es chaperoneado por CesT (Li, Rosenshine et al. 2006).
50	<i>cif</i>	Facilita la liberación de citocromo c e induce apoptosis en las células epiteliales (Samba-Louaka, Nougayrede et al. 2009). Inhibe la respuesta inflamatoria, arresta el ciclo celular y bloquea la mitosis (Sun 2009; Taieb, Nougayrede et al. 2011).
51	<i>espG2</i>	Homólogo de la proteína EspG (43% identidad y 63% similitud) (Tomson, Viswanathan et al. 2005). Codificado en la misma isla de patogenicidad que espC. Altera la red de microtúbulos (Matsuzawa, Kuwae et al. 2004; Tomson, Viswanathan et al. 2005).
52	<i>espJ</i>	Media la actividad anti-fagocítica, a través de la inhibición de los receptores fagocíticos Fc γ R- y CR3 (Marches, Covarelli et al. 2008).
53	<i>espL2</i>	Modula la morfología de la membrana y la organización de la F-actina. Interactuando y aumentando la actividad de la anexina A2, contribuye a la formación de microcolonias condensadas (Tobe 2010).
54	<i>espO</i>	Identificado con la secuenciación del genoma de EPEC, pero aún sin función conocida (Iguchi, Thomson et al. 2009).
55	<i>espC</i>	Autotransportador (sistema de secreción tipo V). Su translocación depende del SST3 y se ha visto que interactúa con EspA (Mellies, Navarro-Garcia et al. 2001; Vidal and Navarro-Garcia 2008).

Código de colores de acuerdo a la función
Desconocida
Efectores
Reguladores transcripcionales
Chaperonas
Componentes del SST3
Reguladores de la secreción
Intimina
Otros

ANEXO II

Proteínas equivalentes de diferentes SST3

<u>Función</u>	SST3 de patógenos de animales				SST3 de patógeno de plantas	SST3 Flagelar
	<u>EPEC</u>	<u>Yersinia pestis</u>	<u>Shigella flexneri</u>	<u>Salmonella enterica serovar Typhimurium SPI-1</u>	<u>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</u>	<u>Salmonella enterica serovar Typhimurium</u>
Regulador de la ATPasa	EscL	YscL	MxiN	OrgB	HrcL	FliH
Aparato de exportación	EscR	YscR	Spa24	SpaP	HrcR	FliP
Aparato de exportación	EscS	YscS	Spa9	SpaQ	HrcS	FliQ
Aparato de exportación	EscT	YscT	Spa29	SpaR	HrcT	FliR
Aparato de exportación y <i>Switch 1</i>	EscU	YscU	Spa40	SpaS	HrcU	FlhB
Transglicosilasa lítica	EtgA		IpgF	IagB	Hpa2	FlgJ
Chaperona de EspA y EspB	CesD	SycD/ LcrH	IpgC			SicA
Anillo de membrana externa	EscC	YscC	MxiD	InvG	HrcC	
<i>Switch 2</i>	SepD	YscB				
Anillo de membrana interna	EscJ	YscJ	MxiJ	PrgK	HrcJ	FliF
Eje interno	EscI	YscI	MxiI	PrgJ	HrpB2	
Aparato de exportación	EscV	YscV/ LrcD	MxiA	InvA	HrcV	FlhA
ATPasa	EscN	YscN	Spa47	InvC	HrcN	FliI
Componente esencial para la secreción	EscO (Orf15)	YscO	Spa13	InvI	HrpO	FliJ
Control de la longitud del gancho/aguja y <i>Switch 1</i>	EscP (Orf16)	YscP	Spa32	InvJ	HpaC/ HrpP	FliK
Aparato de exportación (anillo C)	EscQ	YscQ	Spa33	SpaO	HrcQ	FliN

Chaperona de multiefectores	CesT				HpaB	
Intimina	Eae					
Anillo de membrana interna	EscD	YscD	MxiG	PrgH	HrpD5	FliG
<i>Switch 2</i>	SepL	YopN/ TyeA	MxiC	InvE	HrpJ	
Translocón (Filamento)	EspA	LcrV	IpaD	SipD		FliC
Translocón (Poro)	EspD	YopB	IpaB	SipB	HrpK/ HrpF	SipB
Translocón (Poro)	EspB	YopD	IpaC	SipC		SipC
Chaperona EspD	CesD2					
Aguja/gancho/pilus	EscF	YscF	MxiH	PrgI		FlgE

A N E X O III

Modelo de cómo podría EscP regular la longitud de la aguja y participar en el cambio de especificidad de sustratos (Hughes 2012) (Figura 46). Durante el ensamblaje de la estructura basal del inyectisoma, EscP se secreta a una tasa demasiado rápida como para permitir la interacción de EscP con EscU_{CC} (Figura 46A). Las subunidades del eje se secretan pero no logran ensamblarse (Figura 46B) hasta que pueden interaccionar con EscP (probablemente en la región amino). La interacción de EscI con EscP_N en el periplasma (durante la secreción de EscP) permite la formación del eje interno (Figura 46C). Durante el ensamblaje de la aguja, después de la formación del eje, la tasa de secreción de EscP disminuye y una vez que la aguja alcanza un tamaño mínimo, EscP_C interacciona con EscU_{CC} y se da el *switch* que permite la secreción de proteínas translocadoras (Figura 46D).

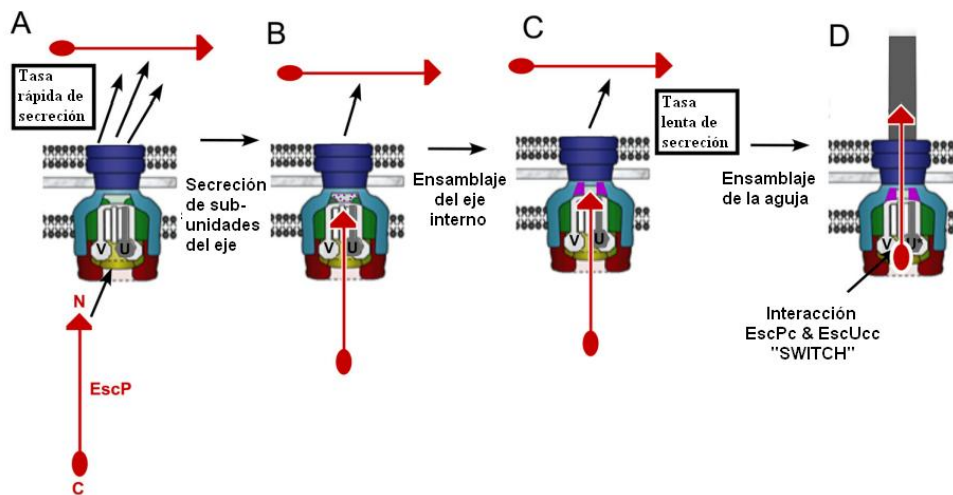


Fig. 46 Modelo del cambio de especificidad de sustratos en el inyectisoma de EPEC. (A) Después del ensamblaje del cuerpo basal, EscU asociado a la membrana es permisivo en la secreción de EscP, EscI y EscF. La secreción de la proteína que regula la longitud de la aguja EscP ocurre a una tasa de secreción que es muy rápida para permitir la interacción entre EscP_C y EscU_{CC}. (B) Las subunidades del eje interno, EscI se secretan al periplasma. (C) La interacción de las subunidades de EscI periplásmicas con EscP_N secretada permite la formación del eje. (D) Después del ensamblaje del eje interno y durante el ensamblaje de la aguja, la tasa de secreción de EscP es baja y una vez que la aguja alcanza su longitud mínima interacciona con EscU_{CC} para cambiar la especificidad de secreción y permitir la salida de los sustratos del translocón y resultando en una estructura que es competente para la secreción de los efectores en la célula hospedera

REFERENCES

- Abby, S. S. and E. P. Rocha (2012). "The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems." *PLoS Genet* **8**(9): e1002983.
- Abrusci, P., M. Vergara-Irigaray, et al. (2013). "Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus." *Nat Struct Mol Biol* **20**(1): 99-104.
- Agrain, C., I. Callebaut, et al. (2005). "Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*." *Mol Microbiol* **56**(1): 54-67.
- Agrain, C., I. Sorg, et al. (2005). "Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity." *Mol Microbiol* **57**(5): 1415-1427.
- Aizawa, S. (2012). "Mystery of FliK in Length Control of the Flagellar Hook." *J Bacteriol* **194**(18): 4798-4800.
- Akeda, Y. and J. E. Galan (2005). "Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion." *Nature* **437**(7060): 911-915.
- Alto, N. M., A. W. Weflen, et al. (2007). "The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways." *J Cell Biol* **178**(7): 1265-1278.
- Allaoui, A., S. Woestyn, et al. (1994). "YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion." *J Bacteriol* **176**(15): 4534-4542.
- Andrade, A., J. P. Pardo, et al. (2007). "Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN." *Arch Biochem Biophys* **468**(1): 121-127.
- Armstrong, D. J. and A. Roman (1993). "The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues." *Biochem Biophys Res Commun* **192**(3): 1380-1387.
- Barba, J., V. H. Bustamante, et al. (2005). "A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA." *J Bacteriol* **187**(23): 7918-7930.
- Barnett Foster, D., D. Philpott, et al. (1999). "Phosphatidylethanolamine recognition promotes enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* host cell attachment." *Microb Pathog* **27**(5): 289-301.
- Baruch, K., L. Gur-Arie, et al. (2011). "Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF-kappaB." *Embo J* **30**(1): 221-231.
- Berger, C., G. P. Robin, et al. (2010). "Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *Microbiology* **156**(Pt 7): 1963-1974.
- Berger, C. N., V. F. Crepin, et al. (2012). "EspZ of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Regulates Type III Secretion System Protein Translocation." *MBio* **3**(5).
- Berger, C. N., V. F. Crepin, et al. (2009). "The mechanisms used by enteropathogenic *Escherichia coli* to control filopodia dynamics." *Cell Microbiol* **11**(2): 309-322.
- Bieber, D., S. W. Ramer, et al. (1998). "Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*." *Science* **280**(5372): 2114-2118.
- Biemans-Oldehinkel, E., N. Sal-Man, et al. (2011). "Quantitative proteomic analysis reveals formation of an EscL-EscQ-EscN type III complex in enteropathogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **193**(19): 5514-5519.
- Blocker, A., N. Jouihri, et al. (2001). "Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin." *Mol Microbiol* **39**(3): 652-663.

- Blocker, A., K. Komoriya, et al. (2003). "Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3027-3030.
- Blocker, A. J., J. E. Deane, et al. (2008). "What's the point of the type III secretion system needle?" Proc Natl Acad Sci U S A **105**(18): 6507-6513.
- Botteaux, A., C. A. Kayath, et al. (2010). "The 33 carboxyl-terminal residues of Spa40 orchestrate the multi-step assembly process of the type III secretion needle complex in *Shigella flexneri*." Microbiology **156**(Pt 9): 2807-2817.
- Botteaux, A., M. Sani, et al. (2008). "Spa32 interaction with the inner-membrane Spa40 component of the type III secretion system of *Shigella flexneri* is required for the control of the needle length by a molecular tape measure mechanism." Mol Microbiol **70**(6): 1515-1528.
- Botteaux, A., M. P. Sory, et al. (2009). "MxiC is secreted by and controls the substrate specificity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus." Mol Microbiol **71**(2): 449-460.
- Bulgin, R., B. Raymond, et al. (2010). "Bacterial guanine nucleotide exchange factors SopE-like and WxxxE effectors." Infect Immun **78**(4): 1417-1425.
- Bustamante, V. H., F. J. Santana, et al. (2001). "Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression." Mol Microbiol **39**(3): 664-678.
- Bustamante, V. H., M. I. Villalba, et al. (2011). "PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **82**(2): 398-415.
- Buttner, D. (2012). "Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **76**(2): 262-310.
- Buttner, D., C. Lorenz, et al. (2006). "Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." Mol Microbiol **59**(2): 513-527.
- Campellone, K. G. (2010). "Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly." FEBS J **277**(11): 2390-2402.
- Campellone, K. G., A. Giese, et al. (2002). "A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals." Mol Microbiol **43**(5): 1227-1241.
- Campellone, K. G., S. Rankin, et al. (2004). "Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly." J Cell Biol **164**(3): 407-416.
- Clarke, S. C., R. D. Haigh, et al. (2003). "Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen." Clin Microbiol Rev **16**(3): 365-378.
- Cleary, J., L. C. Lai, et al. (2004). "Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin." Microbiology **150**(Pt 3): 527-538.
- Clements, A., K. Smollett, et al. (2011). "EspG of enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli* binds the Golgi matrix protein GM130 and disrupts the Golgi structure and function." Cell Microbiol **13**(9): 1429-1439.
- Collazo, C. M., M. K. Zierler, et al. (1995). "Functional analysis of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invI* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus." Mol Microbiol **15**(1): 25-38.
- Cordes, F. S., K. Komoriya, et al. (2003). "Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*." J Biol Chem **278**(19): 17103-17107.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." Nat Rev Microbiol **4**(11): 811-825.
- Cornelis, G. R. and F. Van Gijsegem (2000). "Assembly and function of type III secretory systems." Annu Rev Microbiol **54**: 735-774.

- Craig, L. and J. Li (2008). "Type IV pili: paradoxes in form and function." Curr Opin Struct Biol **18**(2): 267-277.
- Creasey, E. A., R. M. Delahay, et al. (2003). "Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic Escherichia coli." Microbiology **149**(Pt 8): 2093-2106.
- Creasey, E. A., D. Friedberg, et al. (2003). "CesAB is an enteropathogenic Escherichia coli chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB." Microbiology **149**(Pt 12): 3639-3647.
- Croxen, M. A. and B. B. Finlay (2010). "Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity." Nat Rev Microbiol **8**(1): 26-38.
- Chandry, P. S., S. Gladman, et al. (2012). "A Genomic Island in Salmonella enterica ssp. salamae Provides New Insights on the Genealogy of the Locus of Enterocyte Effacement." PLoS One **7**(7): e41615.
- Daniell, S. J., R. M. Delahay, et al. (2001). "Coiled-coil domain of enteropathogenic Escherichia coli type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis." Infect Immun **69**(6): 4055-4064.
- Daniell, S. J., E. Kocsis, et al. (2003). "3D structure of EspA filaments from enteropathogenic Escherichia coli." Mol Microbiol **49**(2): 301-308.
- Daniell, S. J., N. Takahashi, et al. (2001). "The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic Escherichia coli." Cell Microbiol **3**(12): 865-871.
- Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-6645.
- Day, J. B. and G. V. Plano (1998). "A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in Yersinia pestis." Mol Microbiol **30**(4): 777-788.
- Dean, P. and B. Kenny (2004). "Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic Escherichia coli is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein." Mol Microbiol **54**(3): 665-675.
- Dean, P. and B. Kenny (2009). "The effector repertoire of enteropathogenic E. coli: ganging up on the host cell." Curr Opin Microbiol **12**(1): 101-109.
- Dean, P., M. Maresca, et al. (2005). "EPEC's weapons of mass subversion." Curr Opin Microbiol **8**(1): 28-34.
- Dean, P., M. Maresca, et al. (2006). "Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic Escherichia coli-injected effector proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(6): 1876-1881.
- Dean, P., S. Muhlen, et al. (2010). "The bacterial effectors EspG and EspG2 induce a destructive calpain activity that is kept in check by the co-delivered Tir effector." Cell Microbiol **12**(9): 1308-1321.
- Deane, J. E., P. Abrusci, et al. (2010). "Timing is everything: the regulation of type III secretion." Cell Mol Life Sci **67**(7): 1065-1075.
- Deane, J. E., S. C. Graham, et al. (2008). "Crystal structure of Spa40, the specificity switch for the Shigella flexneri type III secretion system." Mol Microbiol **69**(1): 267-276.
- Deane, J. E., P. Roversi, et al. (2006). "Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12529-12533.
- Delahay, R. M., R. K. Shaw, et al. (2002). "Functional analysis of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system chaperone CesT identifies domains that mediate substrate interactions." Mol Microbiol **43**(1): 61-73.
- Deng, W., Y. Li, et al. (2005). "Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens." Infect Immun **73**(4): 2135-2146.
- Deng, W., Y. Li, et al. (2001). "Locus of enterocyte effacement from Citrobacter rodentium: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens." Infect Immun **69**(10): 6323-6335.

- Deng, W., J. L. Puente, et al. (2004). "Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3597-3602.
- DeVinney, R., A. Gauthier, et al. (1999). "Enteropathogenic Escherichia coli: a pathogen that inserts its own receptor into host cells." Cell Mol Life Sci **55**(6-7): 961-976.
- Diepold, A., M. Amstutz, et al. (2010). "Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome." Embo J **29**(11): 1928-1940.
- Diepold, A., U. Wiesand, et al. (2012). "Assembly of the Yersinia injectisome: the missing pieces." Mol Microbiol **85**(5): 878-892.
- Diepold, A., U. Wiesand, et al. (2011). "The assembly of the export apparatus (YscR,S,T,U,V) of the Yersinia type III secretion apparatus occurs independently of other structural components and involves the formation of an YscV oligomer." Mol Microbiol **82**(2): 502-514.
- Dong, N., L. Liu, et al. (2010). "A bacterial effector targets host DH-PH domain RhoGEFs and antagonizes macrophage phagocytosis." Embo J **29**(8): 1363-1376.
- Donnenberg, M. S., J. A. Giron, et al. (1992). "A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic Escherichia coli associated with localized adherence." Mol Microbiol **6**(22): 3427-3437.
- Donnenberg, M. S., L. C. Lai, et al. (1997). "The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic Escherichia coli encodes secretion functions and remnants of transposons at its extreme right end." Gene **184**(1): 107-114.
- Echtenkamp, F., W. Deng, et al. (2008). "Characterization of the NleF effector protein from attaching and effacing bacterial pathogens." FEMS Microbiol Lett **281**(1): 98-107.
- Edqvist, P. J., J. Olsson, et al. (2003). "YscP and YscU regulate substrate specificity of the Yersinia type III secretion system." J Bacteriol **185**(7): 2259-2266.
- Elliott, S. J., E. O. Krejany, et al. (2001). "EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic Escherichia coli with similarities to VirA of Shigella flexneri." Infect Immun **69**(6): 4027-4033.
- Elliott, S. J., C. B. O'Connell, et al. (2002). "A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic Escherichia coli to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF." Infect Immun **70**(5): 2271-2277.
- Elliott, S. J., V. Sperandio, et al. (2000). "The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli." Infect Immun **68**(11): 6115-6126.
- Elliott, S. J., L. A. Wainwright, et al. (1998). "The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic Escherichia coli E2348/69." Mol Microbiol **28**(1): 1-4.
- Erhardt, M., T. Hirano, et al. (2010). "The role of the FliK molecular ruler in hook-length control in Salmonella enterica." Mol Microbiol **75**(5): 1272-1284.
- Erhardt, M., K. Namba, et al. (2010). "Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(11): a000299.
- Erhardt, M., H. M. Singer, et al. (2011). "An infrequent molecular ruler controls flagellar hook length in Salmonella enterica." Embo J **30**(14): 2948-2961.
- Evans, L. D. and C. Hughes (2009). "Selective binding of virulence type III export chaperones by FliJ escort orthologues InvI and YscO." FEMS Microbiol Lett **293**(2): 292-297.
- Fan, F. and R. M. Macnab (1996). "Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in Salmonella typhimurium." J Biol Chem **271**(50): 31981-31988.
- Ferracci, F., J. B. Day, et al. (2004). "Expression of a functional secreted YopN-TyeA hybrid protein in Yersinia pestis is the result of a +1 translational frameshift event." J Bacteriol **186**(15): 5160-5166.

- Ferris, H. U., Y. Furukawa, et al. (2005). "FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism." *J Biol Chem* **280**(50): 41236-41242.
- Ferris, H. U. and T. Minamino (2006). "Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly." *Trends Microbiol* **14**(12): 519-526.
- Frankel, G. and A. D. Phillips (2008). "Attaching effacing Escherichia coli and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal." *Cell Microbiol* **10**(3): 549-556.
- Frankel, G., A. D. Phillips, et al. (2001). "Intimin and the host cell--is it bound to end in Tir(s)?" *Trends Microbiol* **9**(5): 214-218.
- Fraser, G. M., T. Hirano, et al. (2003). "Substrate specificity of type III flagellar protein export in Salmonella is controlled by subdomain interactions in FlhB." *Mol Microbiol* **48**(4): 1043-1057.
- Frost, S., O. Ho, et al. (2012). "Autoproteolysis and intramolecular dissociation of Yersinia YscU precedes secretion of its C-terminal polypeptide YscU(CC)." *PLoS One* **7**(11): e49349.
- Gao, X., F. Wan, et al. (2009). "Bacterial effector binding to ribosomal protein s3 subverts NF-kappaB function." *PLoS Pathog* **5**(12): e1000708.
- Garcia-Gomez, E., N. Espinosa, et al. (2011). "The muramidase EtgA from enteropathogenic Escherichia coli is required for efficient type III secretion." *Microbiology* **157**(Pt 4): 1145-1160.
- Garmendia, J., G. Frankel, et al. (2005). "Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli infections: translocation, translocation, translocation." *Infect Immun* **73**(5): 2573-2585.
- Gauthier, A. and B. B. Finlay (2003). "Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic Escherichia coli." *J Bacteriol* **185**(23): 6747-6755.
- Gauthier, A., J. L. Puente, et al. (2003). "Secretin of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization." *Infect Immun* **71**(6): 3310-3319.
- Germane, K. L. and B. W. Spiller (2011). "Structural and functional studies indicate that the EPEC effector, EspG, directly binds p21-activated kinase." *Biochemistry* **50**(6): 917-919.
- Gill, R. K., A. Borthakur, et al. (2007). "Mechanism underlying inhibition of intestinal apical Cl/OH exchange following infection with enteropathogenic E. coli." *J Clin Invest* **117**(2): 428-437.
- Giron, J. A., M. S. Donnenberg, et al. (1993). "Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (bfpA) among enteropathogenic Escherichia coli." *J Infect Dis* **168**(4): 1037-1041.
- Giron, J. A., A. S. Ho, et al. (1991). "An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli." *Science* **254**(5032): 710-713.
- Giron, J. A., A. G. Torres, et al. (2002). "The flagella of enteropathogenic Escherichia coli mediate adherence to epithelial cells." *Mol Microbiol* **44**(2): 361-379.
- Glotfelty, L. G. and G. A. Hecht (2012). "Enteropathogenic E. coli effectors EspG1/G2 disrupt tight junctions: new roles and mechanisms." *Ann N Y Acad Sci* **1258**: 149-158.
- Gonzalez-Pedrajo, B., G. M. Fraser, et al. (2002). "Molecular dissection of Salmonella FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway." *Mol Microbiol* **45**(4): 967-982.
- Goosney, D. L., M. de Grado, et al. (1999). "Putting E. coli on a pedestal: a unique system to study signal transduction and the actin cytoskeleton." *Trends Cell Biol* **9**(1): 11-14.
- Goosney, D. L., R. DeVinney, et al. (2001). "Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli pedestals." *Infect Immun* **69**(5): 3315-3322.
- Goosney, D. L., R. DeVinney, et al. (2000). "Enteropathogenic E. coli translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin." *Curr Biol* **10**(12): 735-738.
- Gophna, U., E. Z. Ron, et al. (2003). "Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events." *Gene* **312**: 151-163.

- Gruenheid, S., R. DeVinney, et al. (2001). "Enteropathogenic E. coli Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells." Nat Cell Biol **3**(9): 856-859.
- Gruenheid, S., I. Sekirov, et al. (2004). "Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7." Mol Microbiol **51**(5): 1233-1249.
- Ham, H., A. Sreelatha, et al. (2011). "Manipulation of host membranes by bacterial effectors." Nat Rev Microbiol **9**(9): 635-646.
- Hamaguchi, M., D. Hamada, et al. (2008). "Molecular basis of actin reorganization promoted by binding of enterohaemorrhagic Escherichia coli EspB to alpha-catenin." FEBS J **275**(24): 6260-6267.
- Hardwidge, P. R., W. Deng, et al. (2005). "Modulation of host cytoskeleton function by the enteropathogenic Escherichia coli and Citrobacter rodentium effector protein EspG." Infect Immun **73**(5): 2586-2594.
- Hayward, R. D., J. M. Leong, et al. (2006). "Exploiting pathogenic Escherichia coli to model transmembrane receptor signalling." Nat Rev Microbiol **4**(5): 358-370.
- Hemrajani, C., C. N. Berger, et al. (2010). "NleH effectors interact with Bax inhibitor-1 to block apoptosis during enteropathogenic Escherichia coli infection." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 3129-3134.
- Hirano, T., S. Shibata, et al. (2005). "N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook." Mol Microbiol **56**(2): 346-360.
- Hirano, T., S. Yamaguchi, et al. (1994). "Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in Salmonella typhimurium." J Bacteriol **176**(17): 5439-5449.
- Hodges, K., N. M. Alto, et al. (2008). "The enteropathogenic Escherichia coli effector protein EspF decreases sodium hydrogen exchanger 3 activity." Cell Microbiol **10**(8): 1735-1745.
- Hoiczky, E. and G. Blobel (2001). "Polymerization of a single protein of the pathogen Yersinia enterocolitica into needles punctures eukaryotic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4669-4674.
- Holmes, A., S. Muhlen, et al. (2010). "The EspF effector, a bacterial pathogen's Swiss army knife." Infect Immun **78**(11): 4445-4453.
- Huang, L. H. and W. J. Syu (2008). "GrlA of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 activates LEE1 by binding to the promoter region." J Microbiol Immunol Infect **41**(1): 9-16.
- Hughes, K. T. (2012). "The locus of enterocyte effacement type III secretion specificity switch: the devil's in the data for a common mechanism." J Bacteriol **194**(22): 6019-6022.
- Humphries, R. M., T. P. Griener, et al. (2010). "N-acetyllactosamine-induced retraction of bundle-forming pili regulates virulence-associated gene expression in enteropathogenic Escherichia coli." Mol Microbiol **76**(5): 1111-1126.
- Hyland, R. M., J. Sun, et al. (2008). "The bundlin pilin protein of enteropathogenic Escherichia coli is an N-acetyllactosamine-specific lectin." Cell Microbiol **10**(1): 177-187.
- Ide, T., S. Laarmann, et al. (2001). "Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic Escherichia coli." Cell Microbiol **3**(10): 669-679.
- Iguchi, A., N. R. Thomson, et al. (2009). "Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic Escherichia coli O127:H6 strain E2348/69." J Bacteriol **191**(1): 347-354.
- Iriarte, M., M. P. Sory, et al. (1998). "TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of Yersinia Yop effectors." Embo J **17**(7): 1907-1918.
- Islam, M. S., L. E. Bingle, et al. (2011). "Organization of the LEE1 operon regulatory region of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and activation by GrlA." Mol Microbiol **79**(2): 468-483.

- Iyoda, S., N. Koizumi, et al. (2006). "The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*." J Bacteriol **188**(16): 5682-5692.
- Jackson, M. W., J. B. Day, et al. (1998). "YscB of *Yersinia pestis* functions as a specific chaperone for YopN." J Bacteriol **180**(18): 4912-4921.
- Jagannatha, H. M., U. K. Sharma, et al. (1991). "Identification of carbohydrate structures as receptors for localised adherent enteropathogenic *Escherichia coli*." Microb Pathog **11**(4): 259-268.
- Jerse, A. E. and J. B. Kaper (1991). "The eae gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid." Infect Immun **59**(12): 4302-4309.
- Jimenez, R., S. B. Cruz-Migoni, et al. (2010). "Molecular characterization of GrlA, a specific positive regulator of ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **192**(18): 4627-4642.
- Journet, L., C. Agrain, et al. (2003). "The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler." Science **302**(5651): 1757-1760.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, et al. (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **2**(2): 123-140.
- Kenny, B. (1999). "Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications." Mol Microbiol **31**(4): 1229-1241.
- Kenny, B., R. DeVinney, et al. (1997). "Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells." Cell **91**(4): 511-520.
- Kenny, B., S. Ellis, et al. (2002). "Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules." Mol Microbiol **44**(4): 1095-1107.
- Kim, J., A. Thanabalasuriar, et al. (2007). "The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function." Cell Host Microbe **2**(3): 160-171.
- Kimbrough, T. G. and S. I. Miller (2000). "Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 11008-11013.
- Knodler, L. A., J. A. Ibarra, et al. (2011). "Coiled-coil domains enhance the membrane association of *Salmonella* type III effectors." Cell Microbiol **13**(10): 1497-1517.
- Knutton, S., I. Rosenshine, et al. (1998). "A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells." Embo J **17**(8): 2166-2176.
- Kosarewicz, A., L. Konigsmaier, et al. (2012). "The blueprint of the type-3 injectisome." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **367**(1592): 1140-1154.
- Kresse, A. U., M. Rohde, et al. (1999). "The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells." Infect Immun **67**(9): 4834-4842.
- Kubori, T. and J. E. Galan (2002). "*Salmonella* type III secretion-associated protein InvE controls translocation of effector proteins into host cells." J Bacteriol **184**(17): 4699-4708.
- Kubori, T., Y. Matsushima, et al. (1998). "Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system." Science **280**(5363): 602-605.
- Kubori, T., A. Sukhan, et al. (2000). "Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10225-10230.
- Kutsukake, K., T. Minamino, et al. (1994). "Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **176**(24): 7625-7629.

- Lai, L. C., L. A. Wainwright, et al. (1997). "A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells." *Infect Immun* **65**(6): 2211-2217.
- Lara-Tejero, M., J. Kato, et al. (2011). "A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems." *Science* **331**(6021): 1188-1191.
- Lavander, M., L. Sundberg, et al. (2002). "Proteolytic cleavage of the FlhB homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for bacterial survival but not for type III secretion." *J Bacteriol* **184**(16): 4500-4509.
- Levine, M. M., E. J. Bergquist, et al. (1978). "Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive." *Lancet* **1**(8074): 1119-1122.
- Levine, M. M., J. P. Nataro, et al. (1985). "The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor." *J Infect Dis* **152**(3): 550-559.
- Li, M., I. Rosenshine, et al. (2006). "Identification and characterization of NleI, a new non-LEE-encoded effector of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)." *Microbes Infect* **8**(14-15): 2890-2898.
- Lin, A. E. and J. A. Guttman (2012). "Lack of Tir Ubiquitylation Contributes to Enteropathogenic *E. coli* Remaining Extracellular During Nonphagocytic Cell Infections." *Anat Rec (Hoboken)* **295**(8): C1.
- Lorenz, C. and D. Buttner (2009). "Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *J Bacteriol* **191**(5): 1414-1428.
- Lorenz, C. and D. Buttner (2011). "Secretion of early and late substrates of the type III secretion system from *Xanthomonas* is controlled by HpaC and the C-terminal domain of HrcU." *Mol Microbiol* **79**(2): 447-467.
- Lorenz, C., S. Schulz, et al. (2008). "HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system." *PLoS Pathog* **4**(6): e1000094.
- Luo, W. and M. S. Donnenberg (2011). "Interactions and predicted host membrane topology of the enteropathogenic *Escherichia coli* translocator protein EspB." *J Bacteriol* **193**(12): 2972-2980.
- Macnab, R. M. (2004). "Type III flagellar protein export and flagellar assembly." *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 207-217.
- Magdalena, J., A. Hachani, et al. (2002). "Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretion of *Shigella flexneri* from needle components to Ipa proteins." *J Bacteriol* **184**(13): 3433-3441.
- Makishima, S., K. Komoriya, et al. (2001). "Length of the flagellar hook and the capacity of the type III export apparatus." *Science* **291**(5512): 2411-2413.
- Marches, O., M. Batchelor, et al. (2006). "EspF of enteropathogenic *Escherichia coli* binds sorting nexin 9." *J Bacteriol* **188**(8): 3110-3115.
- Marches, O., V. Covarelli, et al. (2008). "EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis." *Cell Microbiol* **10**(5): 1104-1115.
- Marches, O., S. Wiles, et al. (2005). "Characterization of two non-locus of enterocyte effacement-encoded type III-translocated effectors, NleC and NleD, in attaching and effacing pathogens." *Infect Immun* **73**(12): 8411-8417.
- Marlovits, T. C., T. Kubori, et al. (2006). "Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome." *Nature* **441**(7093): 637-640.
- Marlovits, T. C., T. Kubori, et al. (2004). "Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex." *Science* **306**(5698): 1040-1042.

- Martinez-Argudo, I. and A. J. Blocker (2010). "The Shigella T3SS needle transmits a signal for MxiC release, which controls secretion of effectors." *Mol Microbiol* **78**(6): 1365-1378.
- Martinez, E., G. N. Schroeder, et al. (2010). "Binding to Na⁽⁺⁾ /H⁽⁺⁾ exchanger regulatory factor 2 (NHERF2) affects trafficking and function of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system effectors Map, EspI and NleH." *Cell Microbiol* **12**(12): 1718-1731.
- Matsuzawa, T., A. Kuwae, et al. (2005). "Enteropathogenic Escherichia coli type III effectors EspG and EspG2 alter epithelial paracellular permeability." *Infect Immun* **73**(10): 6283-6289.
- Matsuzawa, T., A. Kuwae, et al. (2004). "Enteropathogenic Escherichia coli activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1." *Embo J* **23**(17): 3570-3582.
- McDaniel, T. K. and J. B. Kaper (1997). "A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K-12." *Mol Microbiol* **23**(2): 399-407.
- McNamara, B. P., A. Koutsouris, et al. (2001). "Translocated EspF protein from enteropathogenic Escherichia coli disrupts host intestinal barrier function." *J Clin Invest* **107**(5): 621-629.
- Medhekar, B., R. Shrivastava, et al. (2009). "Bordetella Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo." *Mol Microbiol* **71**(2): 492-504.
- Mellies, J. L., A. M. Barron, et al. (2007). "Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli virulence gene regulation." *Infect Immun* **75**(9): 4199-4210.
- Mellies, J. L., G. Benison, et al. (2011). "Ler of pathogenic Escherichia coli forms toroidal protein-DNA complexes." *Microbiology* **157**(Pt 4): 1123-1133.
- Mellies, J. L., S. J. Elliott, et al. (1999). "The Per regulon of enteropathogenic Escherichia coli : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler)." *Mol Microbiol* **33**(2): 296-306.
- Mellies, J. L., F. Navarro-Garcia, et al. (2001). "espC pathogenicity island of enteropathogenic Escherichia coli encodes an enterotoxin." *Infect Immun* **69**(1): 315-324.
- Minamino, T., H. U. Ferris, et al. (2006). "Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the substrate specificity switching of the flagellar type III export apparatus." *J Mol Biol* **362**(5): 1148-1158.
- Minamino, T., B. Gonzalez-Pedrajo, et al. (1999). "FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in Salmonella, is exported during hook assembly." *Mol Microbiol* **34**(2): 295-304.
- Minamino, T., K. Imada, et al. (2008). "Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly." *Mol Biosyst* **4**(11): 1105-1115.
- Minamino, T., K. Kazetani, et al. (2006). "Oligomerization of the bacterial flagellar ATPase FliI is controlled by its extreme N-terminal region." *J Mol Biol* **360**(2): 510-519.
- Minamino, T. and R. M. Macnab (2000). "Domain structure of Salmonella FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching." *J Bacteriol* **182**(17): 4906-4914.
- Minamino, T., N. Moriya, et al. (2009). "Interaction of FliK with the bacterial flagellar hook is required for efficient export specificity switching." *Mol Microbiol* **74**(1): 239-251.
- Minamino, T. and K. Namba (2008). "Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export." *Nature* **451**(7177): 485-488.
- Minamino, T. and A. P. Pugsley (2005). "Measure for measure in the control of type III secretion hook and needle length." *Mol Microbiol* **56**(2): 303-308.
- Minamino, T., Y. Saijo-Hamano, et al. (2004). "Domain organization and function of Salmonella FliK, a flagellar hook-length control protein." *J Mol Biol* **341**(2): 491-502.
- Mizuno, S., H. Amida, et al. (2011). "The NMR structure of FliK, the trigger for the switch of substrate specificity in the flagellar type III secretion apparatus." *J Mol Biol* **409**(4): 558-573.

- Monjaras Feria, J., E. Garcia-Gomez, et al. (2012). "Role of EscP (Orf16) in injectisome biogenesis and regulation of type III protein secretion in enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **194**(22): 6029-6045.
- Monjaras Feria, J., E. Garcia-Gomez, et al. (2012). "Role of EscP (Orf16) in injectisome biogenesis and regulation of type III protein secretion in enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol.
- Moraes, T. F., T. Spreter, et al. (2008). "Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens." Curr Opin Struct Biol **18**(2): 258-266.
- Morello, J. E. and A. Collmer (2009). "Pseudomonas syringae HrpP Is a type III secretion substrate specificity switch domain protein that is translocated into plant cells but functions atypically for a substrate-switching protein." J Bacteriol **191**(9): 3120-3131.
- Morita-Ishihara, T., M. Ogawa, et al. (2006). "Shigella Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery." J Biol Chem **281**(1): 599-607.
- Moriya, N., T. Minamino, et al. (2006). "The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock." J Mol Biol **359**(2): 466-477.
- Mota, L. J., L. Journet, et al. (2005). "Bacterial injectisomes: needle length does matter." Science **307**(5713): 1278.
- Mueller, C. A., P. Broz, et al. (2008). "The type III secretion system tip complex and translocon." Mol Microbiol **68**(5): 1085-1095.
- Muramoto, K., S. Makishima, et al. (1998). "Effect of cellular level of FliK on flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*." J Mol Biol **277**(4): 871-882.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." Clin Microbiol Rev **11**(1): 142-201.
- Neves, B. C., R. Mundy, et al. (2003). "CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD." Infect Immun **71**(4): 2130-2141.
- Newton, H. J., J. S. Pearson, et al. (2010). "The type III effectors NleE and NleB from enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* block nuclear translocation of NF-kappaB p65." PLoS Pathog **6**(5): e1000898.
- Nougayrede, J. P. and M. S. Donnenberg (2004). "Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway." Cell Microbiol **6**(11): 1097-1111.
- Nougayrede, J. P., P. J. Fernandes, et al. (2003). "Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells." Cell Microbiol **5**(6): 359-372.
- Nougayrede, J. P., G. H. Foster, et al. (2007). "Enteropathogenic *Escherichia coli* effector EspF interacts with host protein Abcf2." Cell Microbiol **9**(3): 680-693.
- Ogino, T., R. Ohno, et al. (2006). "Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **188**(8): 2801-2811.
- Ohnishi, K., F. Fan, et al. (1997). "The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly." J Bacteriol **179**(19): 6092-6099.
- Osborne, S. E. and B. K. Coombes (2011). "Expression and secretion hierarchy in the nonflagellar type III secretion system." Future Microbiol **6**(2): 193-202.
- Pallen, M. J., S. A. Beatson, et al. (2005). "Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion." BMC Microbiol **5**: 9.
- Papatheodorou, P., G. Domanska, et al. (2006). "The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology." Cell Microbiol **8**(4): 677-689.
- Patterson-Delafield, J., R. J. Martinez, et al. (1973). "A new fla gene in *Salmonella typhimurium*--flaR--and its mutant phenotype--superhooks." Arch Mikrobiol **90**(2): 107-120.
- Payne, P. L. and S. C. Straley (1999). "YscP of *Yersinia pestis* is a secreted component of the Yop secretion system." J Bacteriol **181**(9): 2852-2862.

- Pearson, J. S., P. Riedmaier, et al. (2011). "A type III effector protease NleC from enteropathogenic *Escherichia coli* targets NF-kappaB for degradation." Mol Microbiol **80**(1): 219-230.
- Petty, N. K., R. Bulgin, et al. (2010). "The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **192**(2): 525-538.
- Pham, T. H., X. Gao, et al. (2012). "Functional differences and interactions between the *Escherichia coli* type III secretion system effectors NleH1 and NleH2." Infect Immun **80**(6): 2133-2140.
- Phillips, N., R. D. Hayward, et al. (2004). "Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation." Nat Cell Biol **6**(7): 618-625.
- Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart (2006). "Bacterial adhesion and entry into host cells." Cell **124**(4): 715-727.
- Ple, S., V. Job, et al. (2010). "Cochaperone interactions in export of the type III needle component PscF of *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **192**(14): 3801-3808.
- Poyraz, O., H. Schmidt, et al. (2010). "Protein refolding is required for assembly of the type three secretion needle." Nat Struct Mol Biol **17**(7): 788-792.
- Quinaud, M., J. Chabert, et al. (2005). "The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*." J Biol Chem **280**(43): 36293-36300.
- Quinaud, M., S. Ple, et al. (2007). "Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7803-7808.
- Quitard, S., P. Dean, et al. (2006). "The enteropathogenic *Escherichia coli* EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting." Cell Microbiol **8**(6): 972-981.
- Ramboarina, S., P. J. Fernandes, et al. (2005). "Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*." J Biol Chem **280**(48): 40252-40260.
- Riordan, K. E. and O. Schneewind (2008). "YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes." Mol Microbiol **68**(6): 1485-1501.
- Riordan, K. E., J. A. Sorg, et al. (2008). "Impassable YscP substrates and their impact on the *Yersinia enterocolitica* type III secretion pathway." J Bacteriol **190**(18): 6204-6216.
- Rohatgi, R., P. Nollau, et al. (2001). "Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway." J Biol Chem **276**(28): 26448-26452.
- Rosenshine, I., S. Ruschkowski, et al. (1996). "A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation." Embo J **15**(11): 2613-2624.
- Roxas, J. L., J. S. Wilbur, et al. (2012). "The enteropathogenic *Escherichia coli* secreted protein EspZ inhibits intrinsic apoptosis of host intestinal epithelial cells." Infect Immun.
- Royan, S. V., R. M. Jones, et al. (2010). "Enteropathogenic *E. coli* non-LEE encoded effectors NleH1 and NleH2 attenuate NF-kappaB activation." Mol Microbiol **78**(5): 1232-1245.
- Russmann, H., T. Kubori, et al. (2002). "Molecular and functional analysis of the type III secretion signal of the *Salmonella enterica* InvJ protein." Mol Microbiol **46**(3): 769-779.
- Ryu, J. and R. J. Hartin (1990). "Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2." Biotechniques **8**(1): 43-45.
- Sal-Man, N., E. Biemans-Oldehinkel, et al. (2012). "EscA is a crucial component of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **194**(11): 2819-2828.
- Sal-Man, N., W. Deng, et al. (2012). "EscI: a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic *Escherichia coli*." Biochem J **442**(1): 119-125.
- Saldana, Z., A. L. Erdem, et al. (2009). "The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*." J Bacteriol **191**(11): 3451-3461.

- Samba-Louaka, A., J. P. Nougayrede, et al. (2009). "The enteropathogenic *Escherichia coli* effector Cif induces delayed apoptosis in epithelial cells." *Infect Immun* **77**(12): 5471-5477.
- Scaletsky, I. C., M. L. Silva, et al. (1984). "Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells." *Infect Immun* **45**(2): 534-536.
- Schmidt, M. A. (2010). "LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC." *Cell Microbiol* **12**(11): 1544-1552.
- Schraidt, O. and T. C. Marlovits (2011). "Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution." *Science* **331**(6021): 1192-1195.
- Schulz, S. and D. Buttner (2011). "Functional characterization of the type III secretion substrate specificity switch protein HpaC from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *Infect Immun* **79**(8): 2998-3011.
- Sekiya, K., M. Ohishi, et al. (2001). "Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11638-11643.
- Sham, H. P., S. R. Shames, et al. (2011). "Attaching and effacing bacterial effector NleC suppresses epithelial inflammatory responses by inhibiting NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase activation." *Infect Immun* **79**(9): 3552-3562.
- Shames, S. R., A. P. Bhavsar, et al. (2011). "The pathogenic *Escherichia coli* type III secreted protease NleC degrades the host acetyltransferase p300." *Cell Microbiol* **13**(10): 1542-1557.
- Shames, S. R., M. A. Croxen, et al. (2011). "The type III system-secreted effector EspZ localizes to host mitochondria and interacts with the translocase of inner mitochondrial membrane 17b." *Infect Immun* **79**(12): 4784-4790.
- Shames, S. R., W. Deng, et al. (2010). "The pathogenic *E. coli* type III effector EspZ interacts with host CD98 and facilitates host cell pro-survival signalling." *Cell Microbiol* **12**(9): 1322-1339.
- Shaw, R. K., S. Daniell, et al. (2001). "EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells." *Cell Microbiol* **3**(4): 213-222.
- Shaw, R. K., K. Smollett, et al. (2005). "Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells." *Infect Immun* **73**(7): 4385-4390.
- Shen, D. K., N. Moriya, et al. (2012). "Needle length control and the secretion substrate specificity switch are only loosely coupled in the type III secretion apparatus of *Shigella*." *Microbiology* **158**(Pt 7): 1884-1896.
- Shibata, S., N. Takahashi, et al. (2007). "FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler." *Mol Microbiol* **64**(5): 1404-1415.
- Simpson, N., R. Shaw, et al. (2006). "The enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system effector Map binds EBP50/NHERF1: implication for cell signalling and diarrhoea." *Mol Microbiol* **60**(2): 349-363.
- Sorg, I., S. Wagner, et al. (2007). "YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome." *Embo J* **26**(12): 3015-3024.
- Sperandio, V., J. L. Mellies, et al. (2000). "Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler." *Mol Microbiol* **38**(4): 781-793.
- Spreter, T., C. K. Yip, et al. (2009). "A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system." *Nat Struct Mol Biol* **16**(5): 468-476.
- Stainier, I., S. Bleves, et al. (2000). "YscP, a *Yersinia* protein required for Yop secretion that is surface exposed, and released in low Ca²⁺." *Mol Microbiol* **37**(5): 1005-1018.
- Su, M. S., H. C. Kao, et al. (2008). "Gene 10017 encodes a second chaperone for EspA of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Microbiology* **154**(Pt 4): 1094-1103.
- Sukhan, A., T. Kubori, et al. (2003). "Synthesis and localization of the *Salmonella* SPI-1 type III secretion needle complex proteins PrgI and PrgJ." *J Bacteriol* **185**(11): 3480-3483.

- Sun, J. (2009). "Pathogenic Bacterial Proteins and their Anti-Inflammatory Effects in the Eukaryotic Host." *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* **8**(3): 214-227.
- Sun, P., J. E. Tropea, et al. (2008). "Structural characterization of the Yersinia pestis type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG." *J Mol Biol* **377**(3): 819-830.
- Suzuki, T. and T. Iino (1981). "Role of the flaR gene in flagellar hook formation in Salmonella spp." *J Bacteriol* **148**(3): 973-979.
- Swimm, A. I. and D. Kalman (2008). "Cytosolic extract induces Tir translocation and pedestals in EPEC-infected red blood cells." *PLoS Pathog* **4**(1): e4.
- Taieb, F., J. P. Nougayrede, et al. (2011). "Cycle inhibiting factors (cifs): cyclomodulins that usurp the ubiquitin-dependent degradation pathway of host cells." *Toxins (Basel)* **3**(4): 356-368.
- Tamano, K., S. Aizawa, et al. (2000). "Supramolecular structure of the Shigella type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors." *Embo J* **19**(15): 3876-3887.
- Tamano, K., E. Katayama, et al. (2002). "Shigella Spa32 is an essential secretory protein for functional type III secretion machinery and uniformity of its needle length." *J Bacteriol* **184**(5): 1244-1252.
- Taylor, K. A., C. B. O'Connell, et al. (1998). "The EspB protein of enteropathogenic Escherichia coli is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells." *Infect Immun* **66**(11): 5501-5507.
- Thanabalasuriar, A., A. Koutsouris, et al. (2010). "The bacterial virulence factor NleA's involvement in intestinal tight junction disruption during enteropathogenic E. coli infection is independent of its putative PDZ binding domain." *Gut Microbes* **1**(2): 114-118.
- Thomas, N. A., W. Deng, et al. (2007). "Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic Escherichia coli." *J Biol Chem* **282**(40): 29634-29645.
- Thomas, N. A., W. Deng, et al. (2005). "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* **57**(6): 1762-1779.
- Thomas, N. A., I. Ma, et al. (2012). "Expanded roles for multicargo and class 1B effector chaperones in type III secretion." *J Bacteriol* **194**(15): 3767-3773.
- Thomassin, J. L., X. He, et al. (2011). "Role of EscU auto-cleavage in promoting type III effector translocation into host cells by enteropathogenic Escherichia coli." *BMC Microbiol* **11**: 205.
- Tobe, T. (2010). "Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli: role of EspL2 in adherence and an alternative pathway for modulating cytoskeleton through Annexin A2 function." *FEBS J* **277**(11): 2403-2408.
- Tobe, T. and C. Sasakawa (2002). "Species-specific cell adhesion of enteropathogenic Escherichia coli is mediated by type IV bundle-forming pili." *Cell Microbiol* **4**(1): 29-42.
- Tomson, F. L., V. K. Viswanathan, et al. (2005). "Enteropathogenic Escherichia coli EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier." *Mol Microbiol* **56**(2): 447-464.
- Torres, A. G., X. Zhou, et al. (2005). "Adherence of diarrheagenic Escherichia coli strains to epithelial cells." *Infect Immun* **73**(1): 18-29.
- Tu, X., I. Nisan, et al. (2003). "EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli." *Mol Microbiol* **47**(3): 595-606.
- Vanmaele, R. P., L. D. Heerze, et al. (1999). "Role of lactosyl glycan sequences in inhibiting enteropathogenic Escherichia coli attachment." *Infect Immun* **67**(7): 3302-3307.
- Vidal, J. E., A. Canizalez-Roman, et al. (2007). "[Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic Escherichia coli]." *Salud Publica Mex* **49**(5): 376-386.
- Vidal, J. E. and F. Navarro-Garcia (2008). "EspC translocation into epithelial cells by enteropathogenic Escherichia coli requires a concerted participation of type V and III secretion systems." *Cell Microbiol* **10**(10): 1975-1986.

- Wachter, C., C. Beinke, et al. (1999). "Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic Escherichia coli." Mol Microbiol **31**(6): 1695-1707.
- Wagner, S., L. Konigsmaier, et al. (2010). "Organization and coordinated assembly of the type III secretion export apparatus." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(41): 17745-17750.
- Wagner, S., I. Sorg, et al. (2009). "The helical content of the YscP molecular ruler determines the length of the Yersinia injectisome." Mol Microbiol **71**(3): 692-701.
- Wagner, S., M. Stenta, et al. (2010). "Length control of the injectisome needle requires only one molecule of Yop secretion protein P (YscP)." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(31): 13860-13865.
- Wainwright, L. A. and J. B. Kaper (1998). "EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic Escherichia coli." Mol Microbiol **27**(6): 1247-1260.
- Wang, D., A. J. Roe, et al. (2008). "Hierarchical type III secretion of translocators and effectors from Escherichia coli O157:H7 requires the carboxy terminus of SepL that binds to Tir." Mol Microbiol **69**(6): 1499-1512.
- Wang, Y., A. N. Ouellette, et al. (2007). "Differences in the electrostatic surfaces of the type III secretion needle proteins PrgI, BsaL, and MxiH." J Mol Biol **371**(5): 1304-1314.
- Warawa, J., B. B. Finlay, et al. (1999). "Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic Escherichia coli." Infect Immun **67**(10): 5538-5540.
- Waters, R. C., P. W. O'Toole, et al. (2007). "The FliK protein and flagellar hook-length control." Protein Sci **16**(5): 769-780.
- Weflen, A. W., N. M. Alto, et al. (2010). "E. coli secreted protein F promotes EPEC invasion of intestinal epithelial cells via an SNX9-dependent mechanism." Cell Microbiol **12**(7): 919-929.
- West, N. P., P. Sansonetti, et al. (2005). "Optimization of virulence functions through glucosylation of Shigella LPS." Science **307**(5713): 1313-1317.
- Wiesand, U., I. Sorg, et al. (2009). "Structure of the type III secretion recognition protein YscU from Yersinia enterocolitica." J Mol Biol **385**(3): 854-866.
- Wilson, R. K., R. K. Shaw, et al. (2001). "Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic Escherichia coli." Cell Microbiol **3**(11): 753-762.
- Wolff, C., I. Nisan, et al. (1998). "Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic Escherichia coli." Mol Microbiol **28**(1): 143-155.
- Wong, A. R., A. Clements, et al. (2012). "The interplay between the Escherichia coli Rho guanine nucleotide exchange factor effectors and the mammalian RhoGEF inhibitor EspH." MBio **3**(1).
- Wood, S. E., J. Jin, et al. (2008). "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 **190**(12): 4252-4262.
- Worrall, L. J., E. Lameignere, et al. (2011). "Structural overview of the bacterial injectisome." Curr Opin Microbiol **14**(1): 3-8.
- Yamaguchi, S., H. Fujita, et al. (1984). "Genetic analysis of H2, the structural gene for phase-2 flagellin in Salmonella." J Gen Microbiol **130**(2): 255-265.
- Yang, J., M. Tauschek, et al. (2010). "Virulence regulation in Citrobacter rodentium: the art of timing." Microb Biotechnol **3**(3): 259-268.
- Yen, H., T. Ooka, et al. (2010). "NleC, a type III secretion protease, compromises NF-kappaB activation by targeting p65/RelA." PLoS Pathog **6**(12): e1001231.
- Yip, C. K., T. G. Kimbrough, et al. (2005). "Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly." Nature **435**(7042): 702-707.
- Younis, R., L. E. Bingle, et al. (2010). "SepL resembles an aberrant effector in binding to a class 1 type III secretion chaperone and carrying an N-terminal secretion signal." J Bacteriol **192**(22): 6093-6098.

- Yu, X. J., K. McGourty, et al. (2010). "pH sensing by intracellular Salmonella induces effector translocation." Science **328**(5981): 1040-1043.
- Zahavi, E. E., J. A. Lieberman, et al. (2011). "Bundle-forming pilus retraction enhances enteropathogenic Escherichia coli infectivity." Mol Biol Cell **22**(14): 2436-2447.
- Zarivach, R., W. Deng, et al. (2008). "Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS." Nature **453**(7191): 124-127.
- Zarivach, R., M. Vuckovic, et al. (2007). "Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system." Nat Struct Mol Biol **14**(2): 131-137.
- Zhang, L., Y. Wang, et al. (2006). "Solution structure of monomeric BsaL, the type III secretion needle protein of Burkholderia pseudomallei." J Mol Biol **359**(2): 322-330.
- Zhong, D., M. Lefebre, et al. (2012). "The Salmonella Type III Secretion System Inner Rod Protein PrgJ Is Partially Folded." J Biol Chem **287**(30): 25303-25311.
- Zhu, K., B. Gonzalez-Pedrajo, et al. (2002). "Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of Salmonella." Biochemistry **41**(30): 9516-9524.