



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Fisiología Celular

Caracterización funcional de la proteína EscO del sistema de secreción
tipo III de *Escherichia coli* enteropatógena: interacciones con
componentes del aparato secretor.

Tesis

Que para optar por el grado de

Doctora en Ciencias Biomédicas

Presenta:

Mariana Romo Castillo

Tutor Principal:

Dra. Bertha González Pedrajo
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Miembros del Comité Tutor:

Dra. Irma Romero Álvarez
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Georges Dreyfus Cortés
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

México D. F. Noviembre del 2014



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.

*Sometimes it's hard to be a
woman. It's even harder if you
are trying to be a scientist.
Tammy Wynette*

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de continuar con mi desarrollo profesional, así como por el apoyo para asistir a los diferentes congresos nacionales e internacionales.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Bertha González Pedrajo, perteneciente al departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Gracias por todos estos años de enseñanza, por ayudarme a crecer profesionalmente y ser una guía.

El proyecto contó con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN209514), y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (180460), además de la beca de doctorado que me brindó CONACyT (210440). Para la realización de la presente tesis me fue otorgada una beca por proyecto del donativo de la DGAPA, UNAM (IN209514).

Este trabajo contó con la asesoría del comité tutorial conformado por el Dr. Georges Dreyfus (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y la Dra. Irma Romero (Facultad de Medicina, UNAM), quienes en conjunto con la Dra. Bertha González Pedrajo

fueron guías indispensables para el buen desarrollo del proyecto. Gracias por compartir sus consejos y experiencia, por las críticas constructivas y el apoyo brindado.

A los miembros del jurado: Dra. Marietta Tuena(Presidente), Dra. Irma Romero (Secretaria), Dr. Juan Xicohtencatl, Dr. Oscar Flores y Dra. Teresita Sainz por dedicar tiempo para la revisión y crítica de este escrito.

A las doctoras Norma Espinosa y Elizabeth García por el apoyo técnico y la colaboración brindada para la realización de este proyecto. Así como al resto del equipo del laboratorio de la Dra. Bertha González.

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, Ing. Ivette Rosas Arciniega, del Bioterio: MVZ. Héctor Malagón Rivero y del Taller de Mantenimiento: Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides.

CONTENIDO

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
Diarrea: aspectos generales	6
<i>Escherichia coli</i> : de comensal a patógeno	7
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena: patogenicidad	10
Sistema de secreción tipo III: una jeringa molecular	13
Estructura del SST3: cuerpo basal	16
Aparato de exportación: el complejo ATPasa	18
La F ₀ F ₁ ATP sintasa	24
ANTECEDENTES	27
EscO: importancia durante el proceso de secreción vía SST3	27
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
METODOLOGÍA	31
Cepas y condiciones de crecimiento	31
Manipulación de ADN	33
Construcción de plásmidos	39
Producción, purificación y cuantificación de proteínas recombinantes	41
Ensayos de copurificación tipo <i>pull-down</i>	42
Inmunodetección tipo <i>Western Blot</i>	43
Ensayo de doble híbrido en levadura	44
Ensayo de actividad de ATPasa	44
Ensayo de secreción de proteínas del SST3	45
Ensayo de movilidad	45
Obtención de la fracción periplásmica de EPEC	46
Modelaje de EscO en I-Tasser	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
Interacción de EscO con las proteínas chaperonas del SST3	48

EscO interacciona con la ATPasa EscN	50
EscO incrementa la actividad de EscN <i>in vitro</i>	56
Interacción de EscO con la proteína EscL	58
EscL inhibe la sobreactivación de la ATPasa EscN por la proteína EscO	61
EscO sustituye parcialmente la función de FliJ	62
EscO incrementa la actividad de la ATPasa flagelar FliI.....	64
FliJ no sustituye la función de EscO	65
Modelo estructural de EscO.....	66
Las argininas de EscO conservadas con la familia de proteínas YscO, no son indispensables para su función	68
La proteína EscO forma dímeros y la cisteína 52 les confiere estabilidad	71
Las proteínas mutantes de EscO en las cisteínas complementan la secreción de una cepa $\Delta escO$	72
Las versiones mutantes de EscO en las cisteínas presentan un retraso sobre la activación de la ATPasa EscN	73
La cinética de secreción de efectores se modifica en la cepa $\Delta escO$ complementada con versiones de EscO afectadas en su dimerización.....	74
La proteína EscO no se localiza en el periplasma.....	75
Modelo de función de EscO.....	77
CONCLUSIONES.....	79
APENDICE.....	82
REFERENCIAS	82

ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
A/E	Adherencia y esfacelamiento
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
Amp ^R	Resistencia a ampicilina
BDP	BL21 (DE3) pLysS
C _f	Concentración final
Cm	Cloranfenicol
Cm ^R	Resistencia a cloranfenicol
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTP	Deoxinucleótidos
DO	Densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
g	Gramos
h	Horas
His	Histidina
IPTG	Isopropil-β-D-galactopiranosido
Kan	Kanamicina
Kan ^R	Resistencia a kanamicina
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LB	Luria Bertnani
LEE	<i>Locus</i> de esfacelamiento enterocítico
Leu	Leucina
MBP	<i>Maltose binding protein</i>
ME	Membrana externa

mg	Miligramos
MI	Membrana interna
min	Minutos
mM	Milimolar
Nal	Ácido nalidíxico
Nal ^R	Resistencia a ácido nalidíxico
Ni-NTA	Níquel-ácido nitrilotriacético
Nle	<i>Non LEE encoded proteíns</i>
nM	Nanomolar
°C	Grado Celsius
PAGE	Electroforesis de gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa
pI	Punto isoelectrico
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PSA	Persulfato de amonio
rpm	Revoluciones por minuto
SD	<i>Synthetic-dropout medium</i>
Spp	Especies
SST3	Sistema de secreción tipo III
STEC	<i>E. coli</i> productora de toxina tipo <i>shiga</i>
Stp	Estreptomina
Stp ^R	Resistencia a estreptomina
Tc	Tetraciclina
TCA	Ácido Tricloroacético
Tc ^R	Resistencia a tetraciclina
Trp	Triptofano
UFC	Unidades formadoras de colonias
x g	Fuerza centrífuga

RESUMEN

Muchas bacterias patógenas, como *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), utilizan el sistema de secreción tipo III (SST3) para inyectar proteínas de virulencia directamente al interior de la célula hospedera. Recientemente se demostró que el complejo ATPasa del SST3 está relacionado evolutivamente con componentes de la F₀F₁ ATP sintasa. En EPEC este complejo está formado principalmente por 3 proteínas diferentes: una ATPasa (EscN), un regulador negativo de la ATPasa (EscL) y la proteína EscO. La primera proteína, la ATPasa EscN, forma un anillo hexamérico similar al anillo α/β de la F₀F₁ ATPasa. La segunda proteína, denominada EscL, tiene similitud con las subunidades b y δ de la F₀F₁ ATP sintasa, que forman el tallo lateral que conecta el sector F₀ con el F₁ y que funciona como estator durante la catálisis rotacional. Por último la tercera proteína, denominada EscO, presenta similitud con la proteína FliJ del SST3 flagelar que funciona como la subunidad γ de la F₁ ATPasa, promoviendo la oligomerización de la ATPasa e incrementando su actividad hidrolítica.

En el presente trabajo se demuestra que EscO es una proteína multifuncional que participa en varias etapas del proceso de secreción, al interactuar con las chaperonas y las proteínas del complejo ATPasa. EscO interactúa con las proteínas chaperonas, participando probablemente en un proceso de reciclaje de las mismas para facilitar la secreción de sustratos. EscO interactúa con la ATPasa EscN estimulando su actividad enzimática y favoreciendo el proceso de secreción. Asimismo, EscO interactúa con el regulador negativo de la ATPasa, EscL. Adicionalmente se demostró que EscO restaura parcialmente el defecto en el nado de la cepa mutante $\Delta fliJ$, y es capaz de estimular la actividad de la ATPasa flagelar FliI. En resumen,

nuestros resultados indican que EscO es el equivalente de la proteína FliJ en el sistema de virulencia de EPEC.

ABSTRACT

Many pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli* (EPEC), use the type III secretion system (T3SS) to inject virulence proteins directly into the host cell. It was recently demonstrated that the T3SS ATPase complex is evolutionarily related to components of the F₀F₁ ATP-synthase. In EPEC this complex consists principally of 3 different proteins: an ATPase (EscN), a negative regulator of the ATPase (EscL) and the EscO protein. The EscN ATPase forms a hexameric ring similar to the α/β ring of the F₀F₁. The second protein, EscL, has sequence identity with the b and δ subunits of F₀F₁ ATP synthase that form the lateral stalk connecting the F₀ sector to F₁. Finally, the EscO protein has similarity to the flagellar T3SS FliJ protein. FliJ functions as the γ subunit of the F₁ ATPase, promoting ATPase oligomerization and increasing its hydrolytic activity.

In the present work we demonstrate that EscO is a multifunctional protein involved in several steps of the secretion process, interacting with chaperones and proteins of the ATPase complex. EscO interacts with chaperones, and it is probably involved in a process of recycling proteins to facilitate the secretion of substrates. EscO interacts with the ATPase, stimulating its enzymatic activity. EscO also interacts with the negative regulator of the ATPase, EscL. Additionally, we demonstrate that EscO partially restores the swimming defect of the flagellar mutant strain $\Delta fliJ$, and is capable of stimulating FliI ATPase activity. In summary, our results indicate that EscO is equivalent of the FliJ protein in the virulence system.

INTRODUCCIÓN

Diarrea: aspectos generales

Las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad infantil en todo el mundo (Kosek, Bern et al. 2003). Se ha reportado que estas infecciones causan en promedio 3.2 episodios de diarrea por año en niños menores de un año en países en vías de desarrollo. También se ha estimado que las infecciones gastrointestinales son una de las 3 primeras causas de mortandad a nivel mundial, solo precedida por infecciones en las vías respiratorias bajas y el VIH/SIDA (Lopez, Mathers et al. 2006). Se estima que en el mundo 21% de las muertes en niños menores de 5 años están relacionadas con infecciones diarreogénicas (Kosek, Bern et al. 2003).

Previamente, la diarrea se definía como la evacuación de heces más blandas de lo normal o acuosas por lo menos 3 veces en un periodo de 24 horas (WHO 2005). Actualmente el término de diarrea se describe como un síntoma, el cual puede ser causado por infecciones del tracto gastrointestinal (también llamada gastroenteritis infecciosa), por infecciones sistémicas y por condiciones no-infecciosas. Existen 3 tipos principales de diarrea clínica: aguda, persistente y sanguinolenta. La diarrea aguda y la persistente no son padecimientos diferentes, pero presentan una duración diferente. Mientras que la diarrea aguda se detiene en los primeros 7 días, la diarrea persistente puede durar 14 días o más (Alam and Ashraf 2003). Por otro lado, la diarrea sanguinolenta se define como diarrea con rastros visibles o microscópicos de sangre en las heces, causada por daño local de la mucosa gástrica o por hemorragia intestinal. De estos 3 tipos de

diarrea, la aguda es la más común, produciendo 80% de todos los casos de diarrea infantil y un 50% de los casos de mortalidad (WHO 2005).

La fisiología intestinal se altera por infecciones entéricas, principalmente en una de las siguientes formas:

1. Cambiando el flujo de agua y electrolitos en el intestino delgado.
2. Por destrucción inflamatoria o citotóxica de la mucosa intestinal.
3. Por penetración microbiana al sistema retículo-endotelial.

Un gran número de patógenos pueden ser responsables de causar diarrea, entre los que se encuentran el rotavirus, y bacterias como: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Vibrio*, y algunas cepas de *Escherichia coli*.

***Escherichia coli*: de comensal a patógeno**

E. coli se describió por primera vez en 1885 por Theodore Escherich bajo el nombre de *Bacterium coli*. Este nombre se utilizó hasta 1919, cuando el género *Escherichia* se definió por Astellani y Chalmers (Borriello, Murray et al. 2005). Esta bacteria Gram negativa, es miembro de la familia Enterobacteriaceae. Es un bacilo de 2-6 μm de largo y 1.1-1.5 μm de ancho. Las cepas pertenecientes a la especie *E. coli* pueden ser cultivadas tanto anaeróbica como aeróbicamente, poseen requerimientos nutricionales simples y no forman esporas. La mayoría de las cepas son

móviles. Bioquímicamente la especie *E. coli* es generalmente oxidasa negativa, catalasa positiva, fermenta glucosa, reduce nitrato, es positiva a una reacción *o*-nitrofenil- β -lactamasa, no produce urea o H₂S y fermenta lactosa (Rodríguez-Angeles 2002).

E. coli es un comensal tanto en el intestino humano, como de otros mamíferos y de aves, donde constituye una de las especies anaerobias facultativas más prevalentes con 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de materia fecal (Borriello, Murray et al. 2005). Sin embargo, esta especie está presente en mucho menor número que las bacterias aerobias las cuales forman más del 99% de las bacterias totales en heces (10¹⁰-10¹¹ UFC/g de heces) (Moore and Holdeman 1974).

Además de desempeñar un papel importante como comensal humano, algunas cepas de *E. coli* causan varios tipos de infecciones intra- y extraintestinales. Estas cepas patógenas poseen factores de virulencia específicos, los cuales se han clasificado en 2 grupos dependiendo de su función (Kaper, Nataro et al. 2004): uno de estos, consiste en la colonización y capacidad de las bacterias de sobrevivir en la superficie de la mucosa o invadir al hospedero; el segundo grupo consiste en toxinas y proteínas efectoras las cuales pueden inducir daño en el hospedero. Incluso, algunos de los factores de virulencia permiten a la bacteria evadir la respuesta inmune del hospedero. De acuerdo a su perfil de virulencia, las cepas patógenas de *E. coli* se han clasificado en diversos grupos, los cuales se revisarán más adelante.

Por muchos años, la serotipificación ha sido una de las herramientas disponibles para identificar las variantes patógenas de *E. coli*. Este método, establecido por Kauffman en los años 40's, se basa principalmente en la identificación antigénica de un lipopolisacárido termoestable y un antígeno flagelar termolábil denominados "O" y "H" respectivamente. Esta clasificación permitió la identificación de 174 serogrupos "O" y 53 antígenos "H" (Vidal, Canizalez-Roman et al. 2007).

La capacidad de ciertas cepas de *E. coli* de causar diarrea se reportó por primera vez en 1887, sin embargo, la primera cepa patógena se aisló en 1945 (Clarke, Haigh et al. 2002). Durante las tres siguientes décadas, algunos serotipos de *E. coli* (O111, O55 y O127) se diagnosticaron frecuentemente en casos de diarrea infantil en países industrializados. El potencial patogénico de estos serotipos se confirmó en diversos estudios con voluntarios, durante la primera mitad de los años 50's. Además, estos serotipos se aislaron en mayor porcentaje a partir de niños enfermos que presentaban diarrea que de niños sanos (Levine and Edelman 1984).

El término "*E. coli* enteropatógena" (EPEC) se introdujo por primera vez en 1955 por Neter, para describir a un grupo de *E. coli* que estaba epidemiológicamente implicado en diarrea infantil (Neter, Westphal et al. 1955). Durante este periodo más del 50% de los casos de mortalidad infantil se relacionaron con brotes de diarrea causados por EPEC. Fue en los años 60s cuando la incidencia y letalidad de EPEC en países industrializados disminuyó por razones desconocidas (Nataro and Martinez 1998).

Durante los años 60-70's, se identificó la presencia de diferentes factores de virulencia en los serotipos que se habían clasificado originalmente como EPEC, lo que llevó a una nueva clasificación de las cepas de *E. coli* asociadas a diarrea. Las cepas que poseen enterotoxinas termolábiles o termoestables se denominaron *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), las cepas invasivas se denominaron enteroinvasivas (EIEC), las cepas que se adhieren de manera no específica se clasificaron como de adherencia difusa (DAEC), las cepas productoras de toxinas tipo *Shiga* se describieron como enterohemorrágicas (EHEC), las cepas que se agregan se nombraron enteroagregativas (EAEC) y las cepas que no poseen estas características permanecieron en el grupo de EPEC. Cabe mencionar que todos estos grupos poseen características fenotípicas y genéticas diferentes (Kaper, Nataro et al. 2004).

***Escherichia coli* enteropatógena: patogenicidad**

EPEC es uno de los patógenos de niños más importantes en todo el mundo, debido a su prevalencia en la comunidad y en los hospitales. Dado que el diagnóstico de estos patógenos está basado principalmente en el diagnóstico molecular, se ha producido un cambio importante en la determinación de la prevalencia y distribución de estos microorganismos. No está claro si las infecciones causadas por EPEC han disminuido debido a las medidas preventivas adoptadas, como la difusión de la importancia de la lactancia materna, o si los estudios de diagnósticos previos no eran tan exactos como los utilizados actualmente (Nataro and Kaper 1998).

EPEC ocasiona un fenotipo histológico distintivo, caracterizado por una adherencia localizada en células en cultivo de tejidos y por la capacidad de producir lesiones de adherencia y esfacelamiento (lesión A/E). En la lesión A/E las bacterias se unen fuertemente a la membrana de la célula huésped causando una interrupción de la superficie celular que conduce a la desaparición de las microvellosidades del epitelio intestinal, el reordenamiento de la F-actina y la formación subsecuente de estructuras en forma de pedestal por debajo del sitio de adherencia (Figura 1). La unión al enterocito está mediada por una adhesina de la membrana externa de la bacteria denominada intimina y por un efector de virulencia translocado por EPEC hacia la célula eucarionte, conocido como Tir. La interacción intimina-Tir desencadena una respuesta que conduce al reclutamiento de proteínas del citoesqueleto debajo de las bacterias adheridas (Caron, Crepin et al. 2006). Una vez que la bacteria se ha unido íntimamente al enterocito, se induce una serie de señales intracelulares, promovidas por una serie de proteínas que han sido translocadas desde la bacteria al citosol del enterocito a través del sistema de secreción tipo III. Como resultado de esta transducción de señales, la actividad fisiológica normal del enterocito se ve comprometida al alterarse la secreción de electrolitos al espacio extracelular, la permeabilidad de las uniones estrechas intracelulares y la remodelación de la región apical del enterocito; dando como resultado una diarrea acuosa en el individuo infectado (DeVinney, Knoechel et al. 1999).

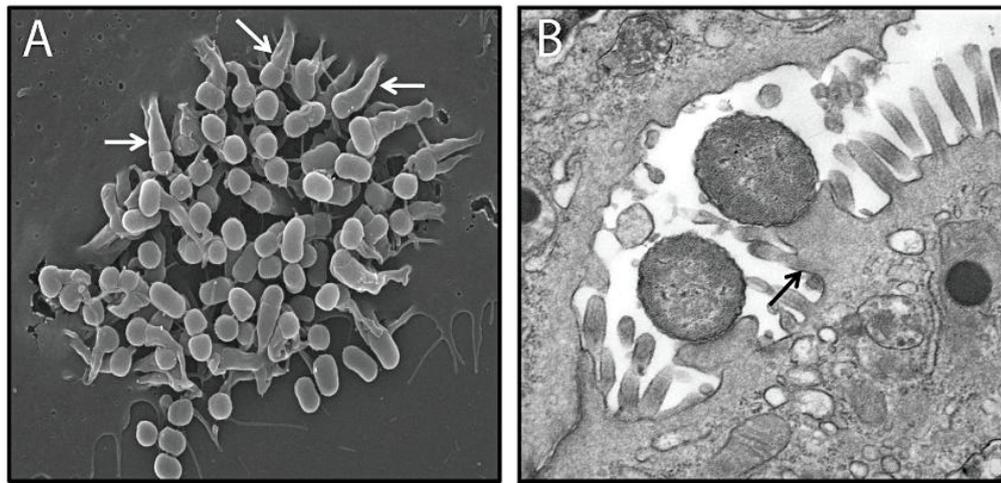


Figura 1. Lesiones histopatológicas causadas por EPEC. A. Fotografía de microscopía electrónica de barrido mostrando los pedestales producidos EPEC (flechas blancas). B. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión mostrando la eliminación de microvellosidades en los sitios de adherencia y la formación del pedestal (flecha negra) (Wong, Pearson et al. 2011).

Todos los elementos genéticos requeridos para producir la lesión A/E están organizados en una isla de patogenicidad, localizada en el cromosoma de EPEC, denominada Locus de Esfacelamiento Enterocítico (LEE) (McDaniel, Jarvis et al. 1995, McDaniel and Kaper 1997). LEE contiene genes que codifican para la adhesina de membrana externa (intimina), la maquinaria del SST3 (Esc), las proteínas efectoras y componentes que se secretan (Esp, Tir y Map), las proteínas chaperonas (Ces) y algunos reguladores de secreción (Sep) y transcripcionales (Ler, GrlR y GrlA) (

Figura 2 y Apéndice) (Jarvis, Giron et al. 1995). La regulación transcripcional del LEE es un proceso muy complejo, regido por diversos reguladores entre los que se encuentran tanto proteínas codificadas dentro de la isla, como reguladores globales de *E. coli* como H-NS, IHF, y aquellos que participan en la detección del *quórum* y la respuesta SOS (Friedberg, Umanski et al. 1999, Mellies, Elliott et al. 1999, Sperandio, Mellies et al. 1999, Elliott, Sperandio et al. 2000, Sperandio, Mellies et al. 2000, Bustamante, Santana et al. 2001, Yona-Nadler, Umanski et al. 2003, Berdichevsky, Friedberg et al. 2005, Iyoda, Koizumi et al. 2006, Mellies, Haack et al. 2007). EPEC

utiliza las proteínas efectoras codificadas en el LEE, así como otras proteínas efectoras, codificadas fuera de la isla LEE (Nle, *non LEE encoded proteins*), para subvertir y modular las funciones celulares y la barrera intestinal del huésped (Dean and Kenny 2009).

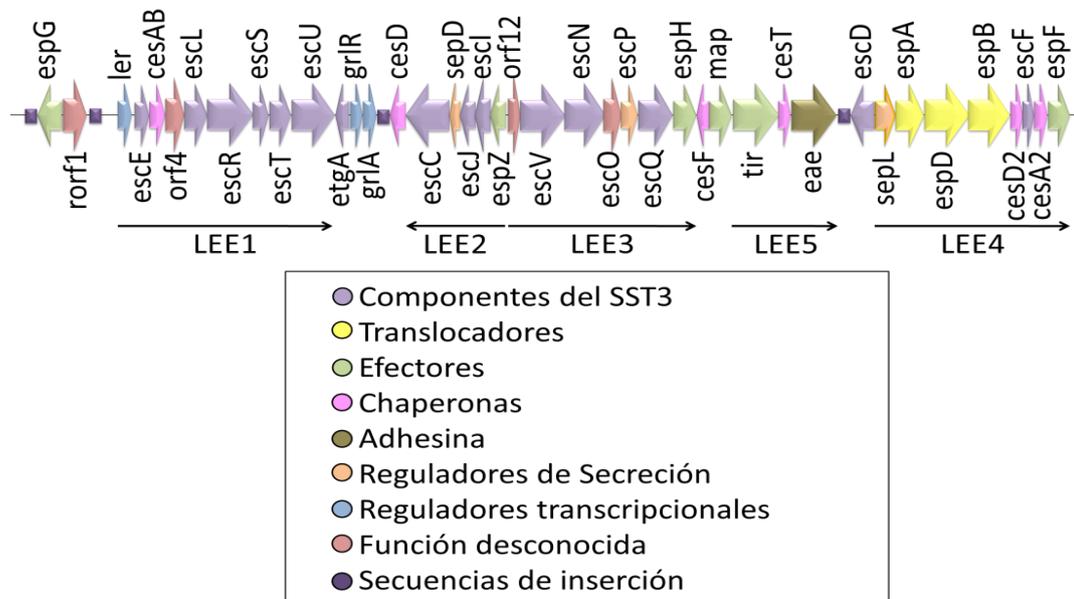


Figura 2. Esquema representativo de la isla de patogenicidad LEE de EPEC. Las flechas negras indican los principales operones que conforman la isla LEE (Modificada de (Romo-Castillo 2010)).

EPEC se considera un patógeno no invasivo y depende de un SST3 para suministrar las proteínas efectoras directamente en las células huésped. La cepa E2348/69 (serotipo O127:H6) se ha utilizado en todo el mundo como una cepa prototipo para estudiar la biología, genética y virulencia de EPEC.

Sistema de secreción tipo III: una jeringa molecular

El sistema de secreción tipo III (SST3) es una nanomáquina macromolecular que permite a un gran número de bacterias patógenas de humanos, de otros animales y de plantas inyectar proteínas de virulencia directamente dentro del citoplasma de células hospederas. La diversidad de las proteínas inyectadas, denominadas proteínas efectoras, produce diferentes alteraciones dentro de las células hospederas que van desde el reordenamiento del citoesqueleto, la alteración de la membrana celular y las uniones estrechas hasta la apoptosis. Este sistema presenta una notable similitud entre diferentes especies bacterianas (Cornelis 2006, Galan 2009).

El SST3, también llamado inyectisoma, está compuesto principalmente por 3 partes: el cuerpo basal, la aguja y el translocón (Figura 3A). El cuerpo basal es un sistema de anillos múltiples y un eje, que atraviesa ambas membranas bacterianas. La aguja es una estructura extracelular hueca a través de la cual viajan las proteínas en un estado semidesplegado. El translocón está formado por una proteína hidrofílica (que puede formar un filamento extracelular) y dos proteínas hidrofóbicas que forman un poro que se inserta en la membrana de la célula hospedera (Blocker, Deane et al. 2008, Mueller, Broz et al. 2008, Gendrin, Sarrazin et al. 2010, Mattei, Faudry et al. 2011). El cuerpo basal está íntimamente asociado con proteínas citoplásmicas y membranales que conforman el aparato de exportación. El aparato de exportación dirige el proceso de secreción de forma jerárquica y ordenada (Diepold, Amstutz et al. 2010, Wagner, Konigsmaier et al. 2010).

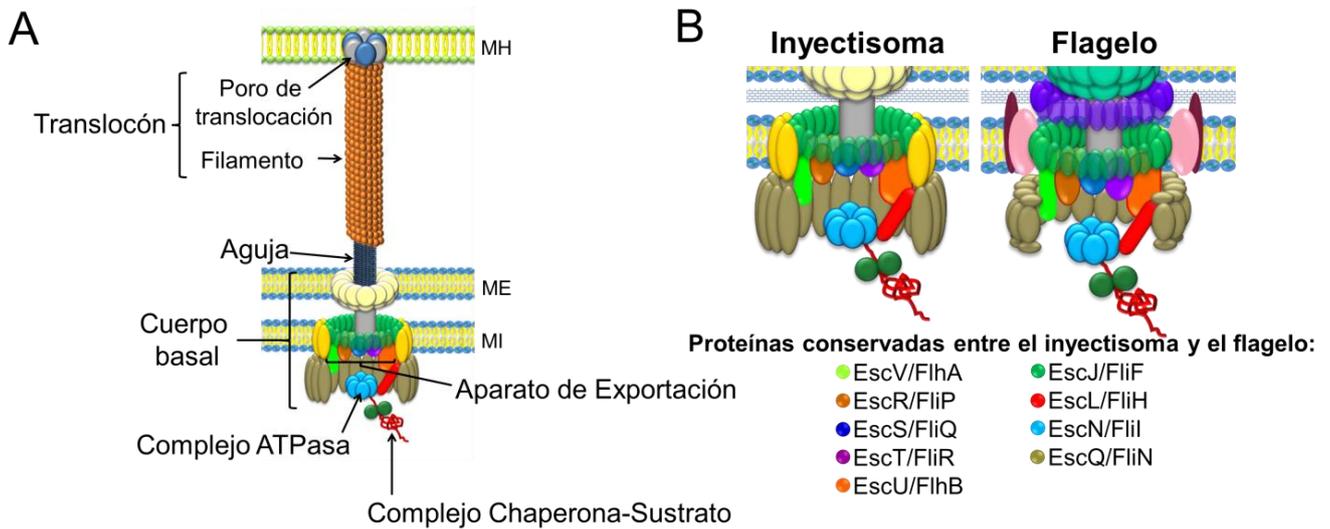


Figura 3. Estructura del SST3. A. Representación de la estructura del inyectisoma de EPEC. MH: membrana de la célula hospedera. ME: membrana externa bacteriana. MI: membrana interna bacteriana. B. Representación de las proteínas conservadas entre el inyectisoma y el flagelo.

El ensamblaje del SST3 involucra a más de 20 proteínas, de las cuales 9 están evolutivamente relacionadas con el flagelo bacteriano (Blocker, Komoriya et al. 2003) (Figura 3B). Muchas de las proteínas que participan en la biogénesis del inyectisoma se producen en el citoplasma bacteriano en complejo con sus chaperonas, y su expresión, secreción y translocación, se encuentra bajo una regulación muy fina (Izore, Job et al. 2011).

El ensamblaje del SST3 y la secreción de sustratos ocurre de manera secuencial e involucra 4 pasos principales (Figura 4): (1) Formación del cuerpo basal, (2) Ensamblaje del eje y la aguja (secreción de sustratos tempranos), (3) Secreción y ensamblaje de las proteínas que forman el poro de translocación, también llamadas translocadores (secreción de sustratos intermedios) y (4) Translocación de las proteínas efectoras al citosol de la célula hospedera (secreción de sustratos tardíos) (Izore, Job et al. 2011).

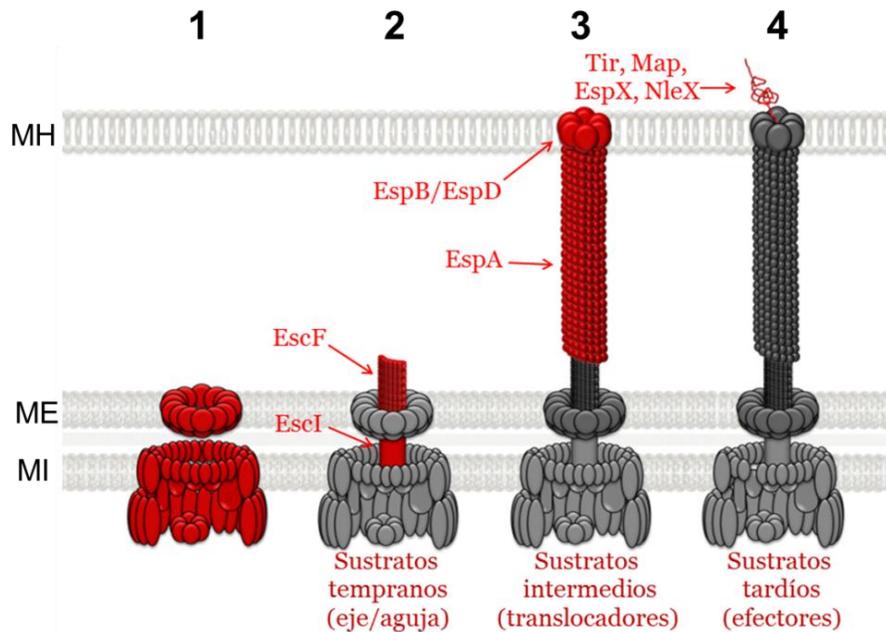


Figura 4. Ensamblaje del SST3. El ensamblaje del SST3 involucra 4 pasos esenciales: la formación del cuerpo basal, el ensamblaje del eje y la aguja (sustratos tempranos; EscI y EscF) la secreción de los translocadores (sustratos intermedios; EspA, EspB y EspD) y la secreción de los efectores (sustratos tardíos: Tir, Map, EspX, NleX). MH: membrana de la célula hospedera. ME: membrana externa bacteriana. MI: membrana interna bacteriana.

Estructura del SST3: cuerpo basal

El cuerpo basal consiste de 2 grupos de anillos posicionados tanto en la membrana externa (ME) como en la membrana interna (MI) de la bacteria (Figura 5). El anillo en la ME está formado por un componente de la familia de las secretinas (InvG en *Salmonella* y EscC en EPEC). Esta familia de proteínas posee una región N-terminal periplásmica y una región C-terminal altamente conservada, que se inserta en la membrana externa denominada “región homóloga a la secretina”. Las secretinas forman oligómeros altamente estables, típicamente de 12 a 14 subunidades. La oligomerización de las secretinas forma un poro central lo suficientemente amplio para permitir la secreción de proteínas desplegadas o parcialmente plegadas y dicha estructura se encuentra conservada en diferentes sistemas de secreción bacterianos (Chami,

Guilvout et al. 2005, Hodgkinson, Horsley et al. 2009, Schraidt, Lefebre et al. 2010). Recientemente se han obtenido cristales de las secretinas y las estructuras terciarias muestran que la región N-terminal forma un “cuello” que conecta el anillo de ME con el anillo de MI (Spreter, Yip et al. 2009) (Figura 5). Por otro lado, los anillos de MI están formados por las proteínas (YscJ/YscD, MxiJ/MxiG, PrgK/PrgH y EscJ /EscD en *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* y EPEC, respectivamente) que oligomerizan para formar dos anillos concéntricos de diámetros diferentes.

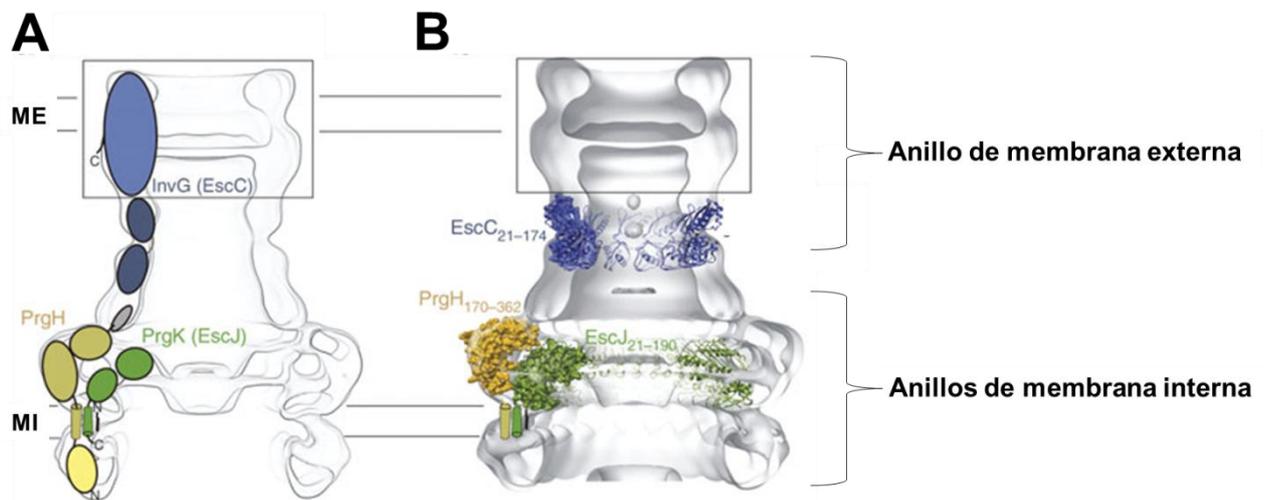


Figura 5. El cuerpo basal del SST3. A. Representación del cuerpo basal y los componentes de los anillos de membrana externa (ME) y membrana interna (MI). InvG/EscC, PrgK/EscJ, PrgH/EscD son los homólogos correspondientes en *Salmonella* y EPEC respectivamente. B. Estructuras cristalográficas de la secretina EscC₂₁₋₁₇₄ (PDB: 3GR5), PrgH₁₇₀₋₃₆₂ (PDB: 3GR0) y EscJ₂₁₋₁₉₀ (1YJ7), y su localización propuesta en el SST3 (Spreter, Yip et al. 2009).

Se postula que en la membrana interna se localiza el aparato de exportación, el cual incluye tanto a proteínas membranales como a proteínas citoplásmicas asociadas a la membrana, que son indispensables para la secreción. Las proteínas membranales del aparato de exportación están conservadas en los SST3 de diferentes especies bacterianas. Interactuando con estos componentes membranales se encuentran al menos 3 componentes citoplásmicos, denominados complejo ATPasa, los cuales también son indispensables para la secreción. Estos componentes se

han caracterizado como una ATPasa, un regulador negativo de la ATPasa y una proteína de función desconocida.

Aparato de exportación: el complejo ATPasa

El SST3 requiere de una ATPasa (InvC/Spa47/YscN/EscN en *Salmonella*/ *Shigella*/ *Yersinia* y EPEC, respectivamente), la cual está altamente conservada entre las proteínas del aparato de exportación, aunado al hecho de que posee una alta similitud de secuencia con la ATPasa flagelar FliI (Akeda and Galan 2004, Andrade, Pardo et al. 2007, Zarivach, Vuckovic et al. 2007, Johnson and Blocker 2008). La ATPasa del SST3 está implicada en el reconocimiento y disociación de los complejos chaperona-sustrato, así como en el desplegamiento de los sustratos a secretarse, de una forma dependiente de la hidrólisis de ATP (Radics, Konigsmair et al. 2014). Aunque se ha visto que la función de estas ATPasas en los SST3 de virulencia es indispensable para llevar a cabo eficientemente el proceso de exportación, también se ha demostrado que la fuerza protón motriz (*proton motive force*, PMF) desempeña un papel importante (Lee, Zmina et al. 2014). La ATPasa del SST3 forma un homohexámero (Figura 6) o un doble anillo hexamérico con un diámetro interno de 2.5 a 3.0 nm, cuya formación se induce por la unión de Mg^{2+} y ATP (Claret, Calder et al. 2003, Pozidis, Chalkiadaki et al. 2003, Muller, Pozidis et al. 2006, Kazetani, Minamino et al. 2009, Ibuki, Imada et al. 2011). La oligomerización y el contacto con la membrana permiten a esta ATPasa incrementar su actividad. La oligomerización de la ATPasa también puede inducirse por interacción con proteínas chaperonas, como se demostró en *Salmonella*, donde la chaperona multicargo SrcA interacciona con la ATPasa SsaN y promueve la formación de hexámeros (Cooper, Zhang et al. 2010). Por otro lado, se ha visto que la liberación

de ADP y Pi, productos de la hidrólisis de ATP, induce la desestabilización del anillo hexamérico, lo que sugiere que la formación del oligómero de la ATPasa en la base del aparato de exportación es temporal (Minamino and Namba 2008, Kazetani, Minamino et al. 2009).

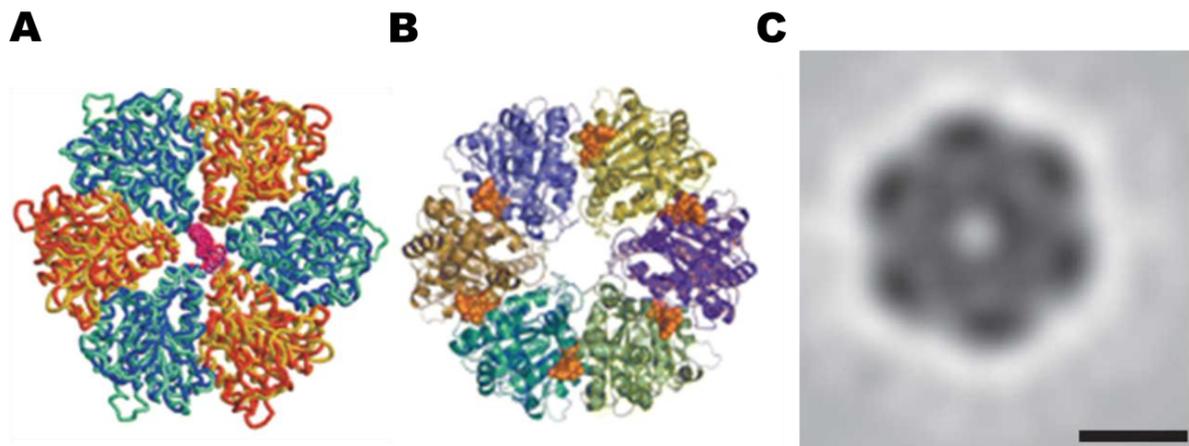


Figura 6. Anillo hexamérico de la ATPasa del SST3. A. Modelo del anillo hexamérico de FliI (ATPasa flagelar, azul y amarillo) realizado sobre el anillo heterohexamérico $\alpha_3\beta_3$ del dominio F₁ de la ATP-sintasa (verde y naranja). Al centro del hexámero se encuentra la subunidad γ (rosa) (Imada, Minamino et al. 2007). B. Vista superior del modelo hexamérico de la ATPasa EscN (EPEC), realizado utilizando el mismo molde que en A (Zarivach, Vuckovic et al. 2007). C. Fotografía de crio-microscopía electrónica del anillo hexamérico de FliI (Ibuki, Imada et al. 2011). Barra de escala =5 nm.

Las estructuras cristalográficas tanto de la ATPasa EscN de EPEC como de la ATPasa flagelar FliI, muestran una similitud estructural con las subunidades α/β de la F₀F₁ ATPsintasa (Imada, Minamino et al. 2007, Zarivach, Vuckovic et al. 2007) (Figura 7). La F₀F₁ ATP sintasa consiste de un dominio membranal denominado F₀ y un dominio soluble denominado F₁. El dominio F₁ está formado por un hexámero de subunidades α y β organizadas alrededor de un tallo central, denominado subunidad γ . Un segundo tallo periférico, el cual contiene a las subunidades b y δ , conecta el dominio F₀ y el dominio F₁; y éste comparte similitud de secuencia con los miembros

de la familia YscL (SsaK/MxiN/YscL/EscL/FliH en *Salmonella/Shigella/Yersinia/EPEC* y el flagelo). Las proteínas de esta familia interaccionan con la ATPasa y además son reguladores negativos de su actividad enzimática (Pallen, Bailey et al. 2006). Se ha propuesto que este regulador negativo pudiera estar evitando la hidrólisis de ATP previo a la activación del sistema de secreción (Minamino and MacNab 2000). En el sistema flagelar se demostró que FliH forma un complejo soluble con la ATPasa (FliH₂FliI) y que esta proteína es responsable de localizar a FliI en el aparato de secreción (Minamino and MacNab 2000, Auvray, Ozin et al. 2002, Gonzalez-Pedrajo, Fraser et al. 2002). La ausencia de FliH produce una pérdida en la movilidad bacteriana, pero este fenotipo puede suprimirse al sobreexpresar la ATPasa FliI, lo que indica que FliH *per se* no es esencial para el ensamblaje y la funcionalidad del SST3 (Minamino, Gonzalez-Pedrajo et al. 2003). FliI y FliH se localizan en la membrana interna principalmente, pero no están embebidos en ésta (Kubori, Yamaguchi et al. 1997). Estas proteínas interaccionan de manera estable a través del N-terminal de FliI y el C-terminal de FliH (Auvray, Ozin et al. 2002, Gonzalez-Pedrajo, Fraser et al. 2002). La actividad de FliI se incrementa en presencia de fosfolípidos, sin embargo, este incremento en la actividad no sucede cuando FliI está interactuando con su inhibidor FliH. Estos resultados indican que la asociación intrínseca con la membrana es crítica para la función de FliI (Auvray, Ozin et al. 2002). Se ha propuesto que durante el proceso de exportación, el anillo multimérico de la ATPasa se localiza junto con otros componentes en la base del anillo interno de la MI. Aunque el mecanismo de exportación no se conoce con exactitud se cree que la hidrólisis de ATP está involucrada con la disociación del complejo sustrato-chaperona (Akeda and Galan 2005).

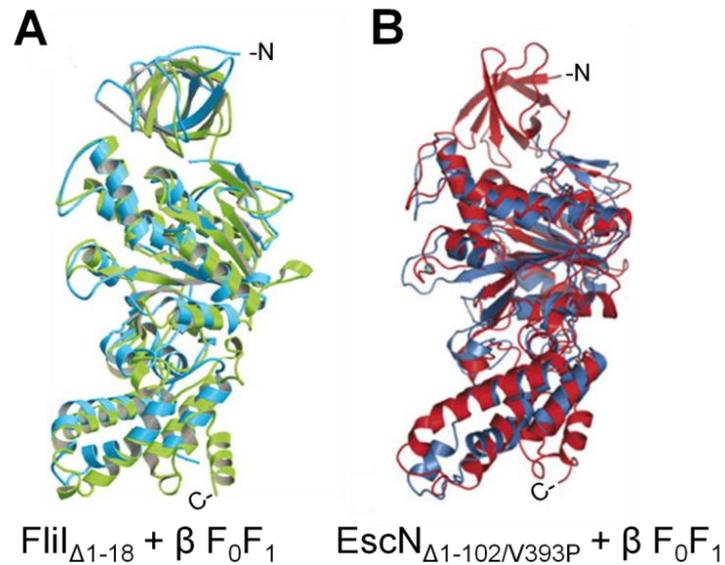


Figura 7. Comparación de la estructura de las ATPasas FliI y EscN del SST3 y la subunidad β de la F_0F_1 ATP sintasa. A. Estructura de $FliI_{\Delta 1-18}$ (color cian, PDB: 2DPY) superpuesta en el estado β_E de la F_1 (color verde, PDB: 1H8E) (Imada, Minamino et al. 2007). B. Estructura de $EscN_{\Delta 1-102/V393P}$ (color rojo, PDB: 2OBL) superpuesta con la estructura de la subunidad β (color azul, PDB: 1H8E) (Zarivach, Vuckovic et al. 2007).

Se ha identificado que la ATPasa del SST3 interacciona con diversos componentes del SST3, como son algunas proteínas del aparato de exportación, su regulador negativo y algunas proteínas chaperonas (Jouihri, Sory et al. 2003, Minamino, Gonzalez-Pedrajo et al. 2003, Blaylock, Riordan et al. 2006, Johnson and Blocker 2008, Minamino, Kinoshita et al. 2012).

Estudios previos en el sistema flagelar han demostrado que FliJ interacciona con diversos componentes del SST3 como son los sustratos del eje-gancho, sustratos del filamento, la ATPasa, el regulador negativo de la ATPasa, proteínas del aparato de exportación, y algunas chaperonas; lo que sugería que funcionaba como una chaperona general del SST3 (Minamino, Chu et al. 2000, Minamino and MacNab 2000, Minamino and MacNab 2000, Fraser, Gonzalez-Pedrajo et al. 2003, Evans, Stafford et al. 2006, Gonzalez-Pedrajo, Minamino et al. 2006). Posteriormente se demostró

que FliJ no reconoce a los sustratos libres ni al complejo chaperona-sustrato, sino que reconoce a algunas chaperonas libres. Las chaperonas, reclutadas por FliJ, reconocen a las proteínas adaptadoras entre gancho y filamento, denominadas *haps*, así como a la proteína de la tapa del filamento, denominada *cap*. Sin embargo, FliJ no interacciona con la chaperona del filamento. Por tal motivo, se propuso un modelo en el cual FliJ participa en un proceso de reciclaje de las chaperonas de las proteínas *haps* y *cap*, para facilitar su secreción; ya que estas proteínas compiten con las miles de subunidades del filamento (Evans, Stafford et al. 2006).

Recientemente se obtuvo la estructura cristalográfica de FliJ y se reportó que, a pesar de no poseer similitud de secuencia, estructuralmente es muy similar al dominio *coiled-coil* formado por el N-terminal y C-terminal de la subunidad γ de la F_0F_1 ATP-sintasa (Figura 8). FliJ favorece la formación del hexámero de FliI al incubarlos en una relación molar 1:6 FliJ/FliI, por lo que se ha propuesto que FliJ actúa como núcleo para la formación del anillo, y lo estabiliza; ya que el anillo hexamérico de FliI es inestable aún en presencia de ATP y fosfolípidos. Sin embargo, al analizar la formación de anillos hexaméricos, en esta relación molar, disminuye respecto a la relación molar 6:1 FliI:FliJ. Con estos resultados se propuso que la formación del anillo hexamérico FliI no es necesaria para que la ATPasa alcance su actividad máxima. Debido a que el sitio catalítico de la enzima está localizado en la interfase entre las subunidades de FliI y que FliJ facilita el ensamblaje de FliI, una mayor probabilidad de formar estructuras como dímeros y trímeros, puede ser suficiente para incrementar la actividad de la ATPasa. Así mismo, se identificó que FliJ interacciona con el C-terminal de la ATPasa FliI, lo que es comparable con la región de la subunidad β que interacciona con la subunidad γ de la F_0F_1 ATPsintasa (Ibuki, Imada et al. 2011).

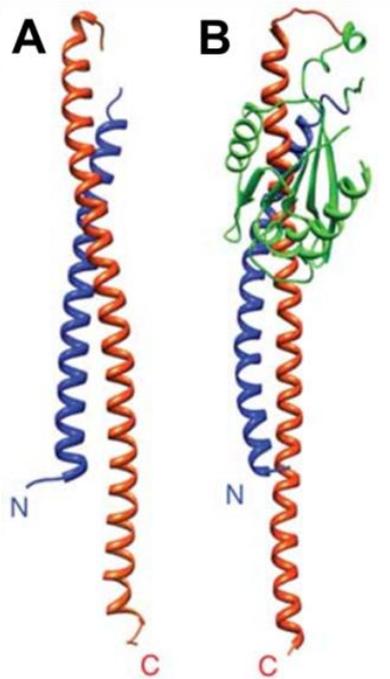


Figura 8. Similitud estructural entre FliJ y la subunidad γ de la F1 ATP sintasa. A. Estructura cristalográfica de FliJ (PDB: 3AJW). B. Estructura cristalográfica de la subunidad γ de la F₀F₁ ATP sintasa (PDB: 1E79). Las hélices α 1 y α 2 están coloreadas en rojo y azul. El dominio central de la subunidad γ que no posee similitud con FliJ está coloreado en verde.

En el 2013 se reportó que FliJ de *S. enterica* serovar Typhimurium tiene una función similar a la del rotor de la A₃B₃ de *Thermus thermophilus* (Kishikawa, Ibuki et al. 2013). Se demostró que la estructura *coiled-coil* antiparalela de FliJ funciona como rotor en A₃B₃, sugiriendo que el rotor de las ATPasas rotatorias y FliJ tienen un origen evolutivo común.

De igual forma, la similitud estructural y funcional entre los componentes solubles del aparato de exportación del SST3 y algunos componentes de la F₀F₁ ATP sintasa sugieren que el complejo ATPasa del SST3 está relacionado evolutivamente con dicha enzima.

La F_0F_1 ATP sintasa

Como se mencionó, las ATPasas tipo F están conformadas por 2 sectores, el dominio catalítico F_1 y el complejo transmembranal F_0 (Figura 9). La región F_1 está conformada por 5 subunidades ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$), mientras que la región F_0 está conformada por sólo 3 (ab_2c_{10}). En el complejo F_1 , las subunidades homólogas α y β poseen un plegamiento idéntico y se encuentran alternadas en un anillo heterohexamérico. Durante el proceso catalítico para la síntesis e hidrólisis de ATP se requieren los 3 sitios catalíticos que se encuentran en la subunidad β , en la interfase entre las subunidades α y las subunidades β . En el sector F_0 , los protones son transportados a través de un ácido carboxílico conservado en cada subunidad c ; y se transportan a través de un canal transmembranal en la interfase, entre las subunidades a y c (Figura 9) (Fillingame, Angevine et al. 2003).

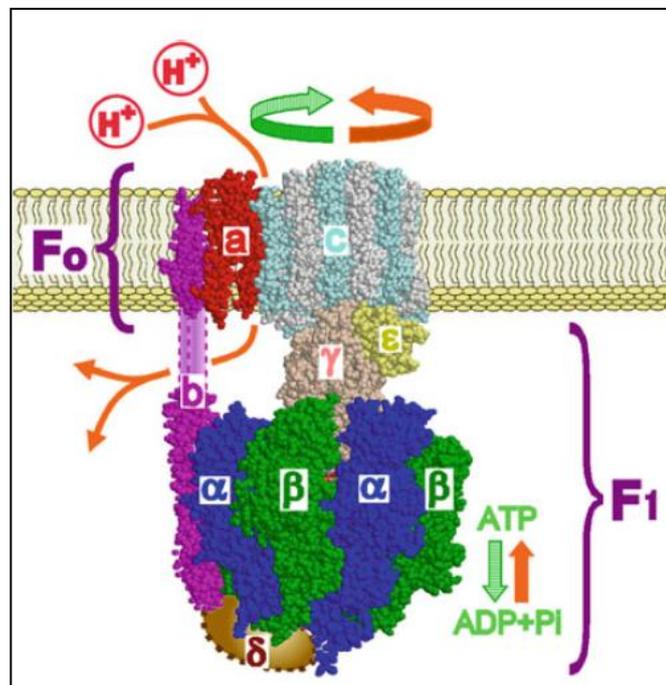


Figura 9. Estructura de la F_0F_1 ATP sintasa. La composición mínima de F_1 está formada por las subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, mientras que F_0 está conformada por las subunidades ab_2c_{10} (Kinosita 2012).

La arquitectura multi-subunidad permite a las F-ATPasas acoplar la reacción química para sintetizar ATP y para translocar protones de manera muy eficiente. Un componente clave en esta eficiencia es la alta cooperatividad de interacción entre los 3 sitios catalíticos. Estas interacciones son parte crítica para el primer mecanismo catalítico propuesto por Paul Boyer, quien acuñó el término de “mecanismo de unión-cambio” el cual involucra un movimiento rotacional como parte de un estado catalítico continuo (Boyer 1997). Este modelo catalítico predice que simultáneamente cada sitio catalítico se encuentra en diferente estado conformacional. Esto se demostró al obtener la estructura del complejo F_1 de mitocondria de corazón de bovino, en donde se puede observar que las 3 subunidades β se encuentran en diferente conformación (Figura 10). A las diferentes conformaciones que puede adquirir β se les ha denominado β_{TP} (retiene el ATP y cataliza la hidrólisis o síntesis), β_{DP} (retiene los productos disociados: ADP+ P_i) y β_E (libera los productos disociados para regresar a la conformación β_{TP}) (Abrahams, Leslie et al. 1994). Esta asimetría conformacional se relaciona con la rotación de la subunidad γ (Noji, Yasuda et al. 1997, Omote, Sambonmatsu et al. 1999). Sin embargo, para la enzima de *Bacillus* se ha demostrado que las subunidades β pueden adquirir estas diferentes conformaciones en la ausencia de la subunidad γ (Uchihashi, Iino et al. 2011).

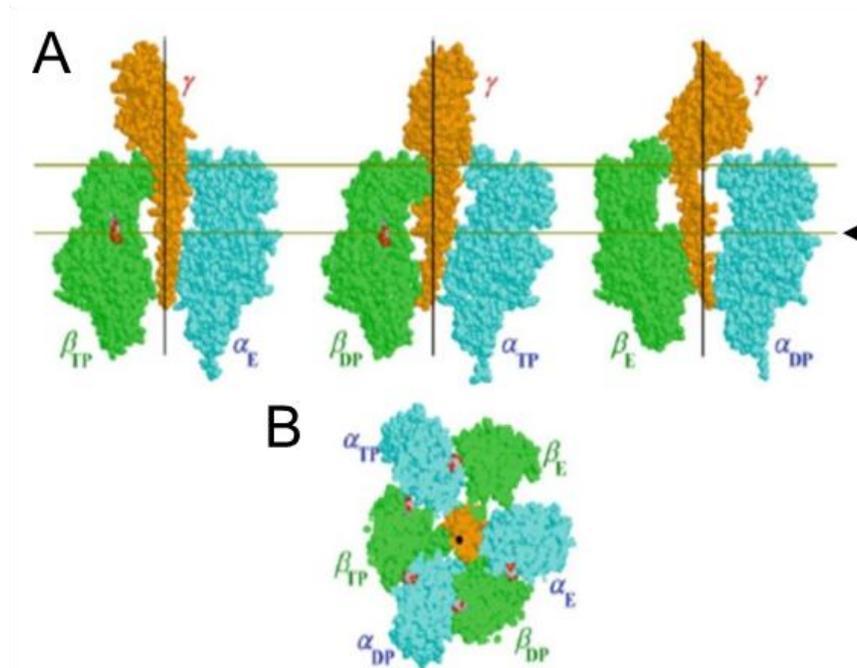


Figura 10. Diferentes conformaciones de la subunidad β de la F_1 ATPasa. A. Vista lateral de la estructura atómica de la F_1 -ATPasa mitocondrial de bovino (Gibbons, Montgomery et al. 2000). B. Vista inferior del complejo F_1 . Los nucleótidos se muestran en rojo. Las subunidades se designaron de acuerdo a los nucleótidos encontrados en los sitios catalíticos (Abrahams, Leslie et al. 1994): TP, sitio entre β_{TP} y α_{TP} une un análogo del ATP (AMP-PNP), el sitio DP es el sitio del ADP y el sitio E está vacío. La línea negra vertical en (a) y el punto en (b) representan el eje de rotación de la subunidad γ . La flecha indica el plano utilizado para la vista inferior (Wang and Oster 1998).

ANTECEDENTES

EscO: importancia durante el proceso de secreción vía SST3

Previamente se analizó la relevancia de la proteína EscO (antes Orf15) (Romo-Castillo 2010). El gen *escO* (375 pb) se encuentra codificado en el operón LEE3, de la isla de patogenicidad LEE. La proteína EscO tiene una masa molecular predicha de 16 kDa, un punto isoeléctrico alcalino de 9.6 y una estructura secundaria principalmente α -helicoidal, con alta probabilidad de formar estructuras tipo *coiled-coil* (hélices super-enrolladas). Estas características las comparte con las proteínas codificadas por genes sinténicos en el SST3 de otros patógenos como Spa13 (*Shigella*), SpaM/InvI (*Salmonella*), YscO (*Yersinia*), Cpn0706 (*Chlamydomphila*), CdsO (*Chlamydia*) y HrpO (*Pseudomonas*); así como con la proteína flagelar FliJ.

En el 2012 se reportó que la proteína codificada por el gen *orf15* (*escO*), denominada entonces EscA, no poseía ningún equivalente funcional en otro SST3 por lo que se propuso que era una proteína única de EPEC. También se identificó que EscA es una proteína que se encuentra tanto asociada a la membrana interna como en la fracción periplásmica. La región N-terminal de EscA, principalmente los primeros 19 residuos de aminoácidos, son los responsables de localizar a la proteína en la membrana interna, mientras que no se necesitan para su transporte a periplasma. El transporte de EscA al periplasma es independiente del SST3. Debido a que la secuencia de la proteína no predice tener secuencia señal típica para ser transportada al periplasma, se ha sugerido que posee una secuencia señal no identificada. EscA interacciona con la proteína EscC, la cual se encarga de formar el anillo en la membrana externa de EPEC; sin embargo, la

importancia de esta interacción no se ha determinado aún (Sal-Man, Biemans-Oldehinkel et al. 2012). En el presente trabajo se muestran las pruebas necesarias para demostrar que esta proteína, renombrada EscO, es equivalente a FliJ/YscO.

La purificación de la proteína recombinante His-EscO permitió observar la presencia de formas oligoméricas resistentes a SDS (en ausencia de un agente reductor como el β -mercaptoetanol) que equivalen a homodímeros de la proteína. La secuencia de EscO posee dos cisteínas (C37 y C52), las cuales podrían ser responsables de esta oligomerización. Sin embargo, no se conoce la importancia o funcionalidad de este dímero. La purificación de la proteína recombinante His-EscO permitió a su vez la generación de anticuerpos policlonales.

Al analizar el fenotipo de una cepa mutante $\Delta escO::kan$, se identificó una supresión en el proceso de secreción de proteínas efectoras y translocadoras, lo que indica que EscO es una proteína indispensable para el funcionamiento del SST3 y que muy probablemente forma parte del aparato de exportación.

Adicionalmente, se analizó el efecto de la sobreproducción de EscO en la secreción de la cepa silvestre de EPEC E2348/69. Los resultados indicaron que la sobreproducción de EscO suprime la secreción de proteínas vía SST3, lo que podría sugerir que EscO interacciona con algunas proteínas indispensables para el proceso de secreción como la ATPasa EscN. Para analizar si la función de EscO pudiera estar relacionada con la ATPasa, se sobreprodujo la proteína EscN en la

cepa $\Delta escO::kan$, lo que permitió restaurar parcialmente la secreción. Este resultado sugiere que la función de EscO está relacionada con la de la ATPasa, ya sea facilitando su localización en la base del aparato de exportación o teniendo algún efecto sobre su actividad para mantener el proceso de secreción de manera eficiente.

Estos datos sugieren que EscO es una proteína esencial para el proceso de secreción como parte del aparato de exportación, y cuya función está relacionada con la ATPasa y con otros de los componentes que participan en el proceso de secreción, como el regulador de la ATPasa (EscL) y las proteínas chaperonas. Por tal motivo se planteó como objetivo de esta segunda etapa del proyecto analizar la importancia de la interacción de EscO con diferentes componentes del SST3 de EPEC.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la interacción de EscO con diferentes componentes del SST3 y la importancia de estas interacciones durante el proceso de secreción.

OBJETIVOS PARTICULARES

Identificar la interacción de EscO con las diferentes chaperonas del SST3.

Caracterizar la interacción de la proteína EscO con la ATPasa EscN.

Analizar la actividad de la ATPasa EscN en presencia de EscO.

Caracterizar la interacción de EscO con la proteína EscL.

Analizar la actividad de la ATPasa EscN en presencia de EscO y EscL.

Analizar el papel de la dimerización de EscO durante el proceso de secreción.

Comparar la complementación heteróloga entre EscO y la proteína flagelar FliJ en las respectivas mutantes.

Analizar el efecto de EscO sobre la actividad de la ATPasa flagelar FliI.

Diseñar un modelo *in silico* de la estructura de la proteína EscO.

Identificar residuos conservados entre EscO y la familia YscO, importantes para la función de las proteínas.

Diseñar un modelo de la función de EscO

METODOLOGÍA

Cepas y condiciones de crecimiento.

Las cepas utilizadas en el presente trabajo se enlistan en la Tabla 1. Las cepas bacterianas se crecieron a 37 °C en agitación a 250 rpm en el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) enriquecido con una solución de vitaminas. De acuerdo con los requerimientos, el medio fue suplementado con antibióticos en las siguientes concentraciones: 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Ampicilina (Amp), 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Cloranfenicol (Cm), 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Kanamicina (Kan), 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Estreptomicina (Stp), o 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Tetraciclina (Tc).

Para el ensayo de secreción de proteínas de virulencia, las cepas de EPEC se crecieron en el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) en condiciones estáticas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Para el ensayo de doble híbrido en levadura, se utilizó medio SD (*synthetic-dropout médium*, Clontech) de baja y mediana astringencia (SD -Trp -Leu y SD -Trp -Leu -His respectivamente).

Las levaduras se crecieron a 30 °C.

Tabla 1. Cepas utilizadas en el estudio.

Nombre Genotipo	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
Top10 <i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Stp^R) endA1 λ⁻</i>	Posee una eliminación parcial del gen <i>lacZ</i> ; lo que permite la α -complementación. Permite obtener transformaciones más eficientes. Reduce la probabilidad de que haya una recombinación no deseada del ADN. Presenta resistencia a Stp.	Invitrogen
XL1-Blue <i>endA1 gyrA96 (nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ) M15] hsdR17 (r_K m_K⁺)</i>	Cepas derivadas de <i>E. coli</i> K12. Mutante en la endonucleasa I. Reduce la probabilidad de que haya una recombinación no deseada del ADN. Posee una eliminación parcial del gen <i>lacZ</i> ; lo que permite la α -complementación. Permite obtener transformaciones más eficientes. Presenta resistencia a Tc.	Stratagene
BL21(DE3)pLysS <i>E. coli B F₁ dcm ompT hsdS (r_Bm_B⁻) gal λ(DE3) [pLysS Cam^r]</i>	Cepas derivadas de <i>E. coli</i> B. Carece de las proteasas Lon y OmpT lo que ayuda a una mejor expresión de genes. Posee el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> . Es capaz de producir la lisozima T7 para reducir los niveles de expresión basal y posee resistencia a Cm.	Stratagene
M15(pREP4) <i>nal^r, str^r, rif^r, thi⁻, lac⁻, ara⁺, gal⁺, mtl⁻, F⁻, recA⁺, uvr^r, lon⁺ [pREP4 Kan^r]</i>	Cepas derivadas de <i>E. coli</i> K12. Posee el plásmido represor pREP4 el cual inhibe la producción de proteínas previo a la inducción con IPTG. Se utiliza para la expresión de proteínas en el vector pQE30.	Qiagen
<i>Salmonella</i>		
JR501 <i>r^m⁺</i>	Cepas utilizadas para convertir plásmidos a compatibilidad con <i>Salmonella</i> .	(Ryu and Hartin 1990)

SJW1103	Cepa silvestre para biogénesis del flagelo y nado.	(Yamaguchi, Fujita et al. 1984)
SJW1368 <i>ΔcheW-flhD</i>	Cepa de <i>Salmonella</i> mutante en el operón maestro. Cepa utilizada para producir proteínas codificadas en el vector pTrc99A, así como control negativo en los ensayos de nado.	(Ohnishi, Ohto et al. 1994)
MKM40 <i>ΔfliJ</i>	Cepa de <i>Salmonella</i> mutante en el gen <i>fliJ</i> .	(Minamino, Yoshimura et al. 2009)
MKM30 <i>ΔfliI</i>	Cepa de <i>Salmonella</i> mutante en el gen <i>fliI</i> .	(Minamino, Kazetani et al. 2006)
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena		
EPEC_{WT} <i>E2348/69- O127:H6</i>	Cepa prototipo de <i>E. coli</i> enteropatógena. Resistente a Stp.	(Levine, Caplan et al. 1977)
ΔescN	Cepa mutante en el gen <i>escN</i> . Resistente a Stp.	(Gauthier, Puente et al. 2003)
ΔescO <i>escO::kan</i>	Cepa mutante en el gen <i>escO</i> . Posee un casete de resistencia a Kanamicina insertado por recombinación homóloga en el sitio del gen <i>escO</i> . Resistente a Stp y Kan.	(Romo-Castillo 2010)
<i>Saccharomyces</i>		
AH109 <i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}</i>	Cepa reportera para ensayo de doble híbrido. Cepa gal4- y gal80- lo cual previene una interfase de la regulación nativa de proteínas con los elementos de regulación del sistema de doble híbrido.	Clontech (James, Halladay et al. 1996)

Manipulación de ADN

Los ensayos de restricción enzimática, la electroforesis en geles de agarosa, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la extracción de plásmido, la ligación de ADN, la transformación

bacteriana y otros procedimientos de rutina, se realizaron como se ha descrito anteriormente (Sambrook 2001). Los plásmidos y cebadores utilizados en este estudio se muestran en las Tablas 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en el estudio.

Plásmido	Descripción	Referencia
pACTrc	Vector de expresión. Promotor <i>trc</i> . Origen de replicación p15A. Resistencia a Cm.	(Gonzalez-Pedrajo, Minamino et al. 2006)
pET19b	Vector de expresión. Promotor T7. Permite la producción de proteínas recombinantes con una etiqueta de 10 Histidinas en la región N-terminal. Resistencia a Amp.	Novagen
pGEM T-Easy	Vector de clonación. Promotores T7 y SP6. Vector digerido con EcoRV con una timidina terminal 3' en ambos extremos para insertar productos de PCR generados por polimerasas termoestables. Resistencia a Amp.	Promega
pTrc99A	Vector de expresión. Promotor <i>trc</i> . Resistencia a Amp.	Amersham-Pharmacia
pTrc99A_FF4	Vector pTrc99A modificado. Promotor <i>trc</i> . Resistencia a Amp.	(Ohnishi, Fan et al. 1997)
pGADT7	Vector del sistema de doble híbrido en levadura. Contiene el dominio de activación de Gal4 y el marcador nutricional LEU2.	Clontech
pGBKT7	Vector del sistema de doble híbrido en levadura. Contiene el dominio de unión a ADN de Gal4 y el marcador nutricional TRP1.	Clontech
pGADT7-T	Vector del sistema de doble híbrido en levadura. Posee el antígeno largo T de SV40 fusionado al dominio de activación de Gal4. Por este sistema interacciona con p53, por lo que se utiliza como control positivo.	Clontech

pGBKT7-53	Vector del sistema de doble híbrido en levadura. Posee a p53 de ratón fusionado al dominio de unión de ADN de Gal4. Por este sistema interacciona con el antígeno largo T de SV40, utilizado como control positivo.	Clontech
pGBKT7-lam	Vector del sistema de doble híbrido en levadura. Posee lamina C humana fusionada al sitio de unión de ADN de Gal4. Debido a que es una proteína no relacionada con las del sistema no interactúa con el antígeno largo T de SV40, utilizado como control negativo.	Clontech
pMMescO	<i>escO</i> clonado en pGEM T-Easy.	(Romo-Castillo 2010)
pMMescO₁₋₆₀	Versión trunca de <i>escO</i> que codifica para los primeros 60 residuos de la proteína (EscO ₁₋₆₀) clonada en pGEM T-Easy.	(Romo-Castillo 2010)
pMMescO₆₀₋₁₂₅	Versión trunca de <i>escO</i> que codifica para los residuos 60 a 125 de EscO (EscO ₆₀₋₁₂₅) clonada en pGEM T-Easy.	(Romo-Castillo 2010)
pMMescO_{Δ10}	Versión trunca de <i>escO</i> que codifica para EscO carente de los primeros 10 residuos (EscO _{Δ10}) clonada en pGEM T-Easy.	Este trabajo
pNEescO	<i>escO</i> clonado en pET19b.	(Romo-Castillo 2010)
pNE₂₃escO	<i>escO</i> clonado en pET23b.	Este trabajo
pMEescO₁₋₆₀	<i>escO₁₋₆₀</i> clonado en pET19b.	(Romo-Castillo 2010)
pMEescO₆₀₋₁₂₅	<i>escO₆₀₋₁₂₅</i> clonado en pET19b.	(Romo-Castillo 2010)
pMEescO_{Δ10}	<i>escO_{Δ10}</i> clonado en pET19b.	Este trabajo
pMEescO_{C37S}	Versión de EscO cuya cisteína 37 ha sido modificada por serina, codificada en pET19b.	Este trabajo
pMEescO_{C52S}	Versión de EscO cuya cisteína 52 ha sido modificada por serina, codificada en pET19b.	Este trabajo

pMEscO_{DMCS}	Versión de EscO cuyas cisteínas 37 y 52 han sido modificadas por serinas, codificada en pET19b.	Este trabajo
pMEscO_{DMRA}	Versión de EscO cuyas argininas 12 y 15 han sido modificadas por alaninas, codificada en pET19b.	Este trabajo
pMTescO	<i>escO</i> clonado en pTrc99A_FF4.	(Romo-Castillo 2010)
pMTHescO	Versión de EscO etiquetada con 10 histidinas en el N-terminal.	(Romo-Castillo 2010)
pMTescO₁₋₆₀	<i>escO₁₋₆₀</i> clonado en pTrc99A_FF4.	(Romo-Castillo 2010)
pMTescO₆₀₋₁₂₅	<i>escO₆₀₋₁₂₅</i> clonado en pTrc99A_FF4.	(Romo-Castillo 2010)
pMEscO_{Δ10}	<i>escO_{Δ10}</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pMTescO_{C37S}	<i>escO_{C37S}</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pMTescO_{C52S}	<i>escO_{C52S}</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pMTescO_{DMCS}	<i>escO_{DMCS}</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pMTescO_{DMRA}	<i>escO_{DMRA}</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pMATescO	<i>escO</i> clonado en pACTrc.	(Romo-Castillo 2010)
pMATescO_{Δ10}	<i>escO_{Δ10}</i> clonado en pACTrc.	Este trabajo
pAEscN	<i>escN</i> clonado en pET19b.	(Andrade, Pardo et al. 2007)
pAEscN_{K183E}	Versión de EscN cuya lisina 183 se modificó por alanina, codificado en pET19b.	Este trabajo
pAEscN_{Δ1-102}	Versión trunca de <i>escN</i> que codifica para EscN carente de los primeros 102 residuos, clonada en pET19b.	Este trabajo
pATescN	<i>escN</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pMTescN_{K183E}	<i>escN_{K183E}</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pATescN_{Δ1-102}	<i>escN_{Δ1-102}</i> clonada en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pNATescN	<i>escN</i> clonada en pACTrc.	Este trabajo
pMM404	<i>fliJ</i> clonada en pTrc99A.	(Minamino, Chu et al. 2000)
pMM406	<i>fliJ</i> etiquetada con 10 histidinas en el N-terminal clonada en pTrc99A.	(Minamino and MacNab 2000)
pACTrcJ	<i>fliJ</i> clonado en pACTrc.	G.M. Fraser, sin publicar.
pMM1702	<i>fliI</i> etiquetada con 10 histidinas en el N-terminal clonada en pTrc99A.	(Minamino and MacNab 2000)
pAQescL	<i>escL</i> clonada en pQE30.	Este trabajo

pATescL	<i>escL</i> clonado en pTrc99A.	Este trabajo
pAATescL	<i>escL</i> clonado en pACTrc.	Este trabajo
pMTcesD	<i>cesD</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pMTcesD2	<i>cesD2</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pMTcesF	<i>cesF</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pATcesAB	<i>cesAB</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pMTcesT	<i>cesT</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Este trabajo
pNGADescO	<i>escO</i> clonado en pGADT7.	Este trabajo
pNGBKescN	<i>escN</i> clonado en pGBKT7.	Este trabajo
pNGADescL	<i>escL</i> clonado en pGADT7.	Este trabajo
pATescN_{V393P}	<i>escN_{V393P}</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Andrade <i>et. al.</i> , no publicado
pATescN_{Δ102}	<i>escN_{Δ102}</i> clonado en pTrc99A_FF4.	Andrade <i>et. al.</i> , no publicado

Tabla 3. Cebadores utilizados en este estudio

Cebador	Secuencia 5' - 3'	Referencia
<i>escO_Fw</i>	TTGCCTGCATATGTTGGACAG	(Romo-Castillo 2010)
<i>escO_Rv</i>	AGAGGATCCCTAGTCAAAGTA	(Romo-Castillo 2010)
<i>escO₆₀_Rv</i>	TTATGGATCCTCACTTTATCC	(Romo-Castillo 2010)
<i>escO₆₀_Fw</i>	AATTTGGCATATGTGTCGTTG	(Romo-Castillo 2010)
<i>escO₁₀_Fw</i>	ATTCGTCATATGAGAGCGAAC	Este trabajo
<i>escO_{C37S}_Fw</i>	GTAAACTCGATGACAGCGAGCAATCCAA TTAAAG	Este trabajo
<i>escO_{C37S}_Rv</i>	CTTTAATGGATTGCTCGCTGTCATCGAGT TTAC	Este trabajo

<i>escO</i> _{C52S} _Fw	CTCTAAGCAGGCGTATATAGTGCATCGCT GGTGA	Este trabajo
<i>escO</i> _{C52S} _Rv	TCACCAGCGATGCACTATAGGCCTGCTTA GAG	Este trabajo
<i>escO</i> _{DMRA} _Fw	CGTAAAAGCGCAGCGAACGCATTGAGAG AAATC	Este trabajo
<i>escO</i> _{DMRA} _Rv	GATTCTCTCAATGCGTTCGCTGCGCTTTTA CG	Este trabajo
<i>escN</i> _Fw	AGGAACGGCATATGATTTTCAGAGC	(Andrade, Pardo et al. 2007)
<i>escN</i> _Rv	ACTGTCCAGGATCCTCAGGCAACC	(Andrade, Pardo et al. 2007)
<i>escN</i> ₁₀₂ _Fw	CAGGGGCATATGTTCAAGATTCG	Este trabajo
<i>escN</i> _{K183E} _Fw	GGTTCAGGCGTTGGTGAAAGTACGCTTTG G	Este trabajo
<i>escN</i> _{K183E} _Rv	CCAAAAGCGTACTTTCACCAACGCCTGA ACC	Este trabajo
Δ <i>escO</i> _Fw	AGTAGTTACGAAAAACGATTGAAAGCC TATTCAAAGTGGTTGCCTGAGTTGTAGGC TGGAGCTGCTTCG	(Romo-Castillo 2010)
Δ <i>escO</i> _Rv	CGAAAAGAAACAGGCTCTATCAAATTC TTTTTAGAGAAACTCTAGTCAACATATGA ATATCCTACTTAG	(Romo-Castillo 2010)
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	(Datsenko and Wanner 2000)
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	(Datsenko and Wanner 2000)
KT	CGGCCACAGTCGATGAATCC	(Datsenko and Wanner 2000)
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Novagen

Construcción de plásmidos

El gen *escO* se amplificó a partir de ADN cromosomal de EPEC E2348/69 utilizando los plásmidos *escO_Fw* y *escO_Rv*. El producto resultante se clonó en el vector de clonación pGEM T-Easy para generar la construcción pMM*escO*. A partir de esta construcción, el gen *escO* se subclonó en el vector de expresión pET19b, el cual permite la producción de una proteína EscO con una etiqueta de 10 histidinas en la región N-terminal, y en los vectores de expresión pTrc99A_FF4 y pACTrc para generar las construcciones pNE*escO*, pMT*escO* y pMAT*escO*, respectivamente. Además, la construcción pNE*escO* se utilizó para clonar al gen *escO* con la etiqueta de histidinas en el vector pTrc99A para obtener la construcción pMTH*escO* (Romo-Castillo 2010).

Para generar las versiones truncas de EscO, se amplificó el gen *escO* a partir de ADN cromosomal de EPEC E2348/69 utilizando los cebadores *escO_Fw* y *escO₆₀_Rv* para la versión *escO₁₋₆₀*, mientras que los cebadores *escO₆₀_Fw* y *escO_Rv* se utilizaron para obtener la versión *escO₆₀₋₁₂₅*. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM T-Easy para crear las construcciones pMM*escO₁₋₆₀* y pMM*escO₆₀₋₁₂₅*. Dichos plásmidos se utilizaron para subclonar en el vector pET19b y generar las construcciones pME*escO₁₋₆₀* y pME*escO₆₀₋₁₂₅*; y en el vector pTrc99A_FF4 para obtener los plásmidos pMT*escO₁₋₆₀* y pMT*escO₆₀₋₁₂₅*, respectivamente (Romo-Castillo 2010).

La versión *escO_{Δ10}* se amplificó utilizando los cebadores *escO₁₀_Fw* y *escO_Rv*. Posteriormente, el producto se clonó en el vector pGEM T-Easy generando la construcción pMM*escO_{Δ10}*; este plásmido se utilizó para subclonar *escO_{Δ10}* en los vectores pET19b, pTrc99AFF4 y pACTrc para generar las construcciones pME*escO_{Δ10}*, pMT*escO_{Δ10}* y pMAT*escO_{Δ10}*.

Para producir la construcción pAU*escN*, el gen *escN* se amplificó utilizando los cebadores *escN_Fw* y *escN_Rv* y el producto se clonó en el vector pUC18. Esta construcción se utilizó para subclonar el gen en los vectores pET19b, pTrc99A_FF4 y pACTrc y generar los plásmidos pAE*escN*, pAT*escN* y pNAT*escN*.

Para obtener la construcción pAE*escN_{Δ102}*, la cual produce una versión trunca de His-EscN carente de los residuos 1 a 102, el gen *escN* se amplificó utilizando los cebadores *escN₁₀₂_Fw* y *escN_Rv*, y el producto obtenido se clonó en pET19b.

Por medio de mutagénesis sitio dirigida, utilizando el protocolo QuikChange (Stratagene) y empleando los plásmidos pNE*escO* y pAE*escN* como molde y los cebadores *escO_{C37S}_Fw/escO_{C37S}_Rv*, *escO_{C52S}_Fw/escO_{C52}_Rv*, *escO_{DMRA}_Fw/escO_{DMRA}_Rv*, *escN_{K183E}_Fw/escN_{K183E}_Rv*, se generaron las construcciones pME*escO_{C37S}*, pME*escO_{C52S}*, pME*escO_{DMRA}* y pAE*escN_{K183E}*. La confirmación de las mutaciones deseadas se realizó por medio de secuenciación utilizando el cebador T7 promotor (Novagen). Posteriormente, las versiones mutantes de *escO* y *escN* se subclonaron en el vector pTrc99AFF4 para generar las construcciones pMT*escO_{C37S}*, pMT*escO_{C52S}*, pMT*escO_{DMRA}* y pMT*escN_{K183E}*. Por otro lado, con la misma metodología se generó la versión *escO_{DMCS}* utilizando como molde el vector pME*escO_{C37S}* y los cebadores *escO_{C52S}_Fw/escO_{C52}_Rv*;

esta construcción denominada pME_{escO_{DMCS}}, se utilizó para subclonar a *escO_{DMCS}* en el vector pTrc99A_FF4 y obtener el plásmido pMT_{escO_{DMCS}}.

Producción, purificación y cuantificación de proteínas recombinantes

Los plásmidos recombinantes producidos en el vector pET19b se transformaron en células *E. coli* BL21(DE3)pLysS (BDP). Las células BDP que contienen los plásmidos *escO* se crecieron en 300 ml de LB con ampicilina a 37 °C hasta obtener una DO₆₀₀ = 0.8-1.0; entonces se agregó 0.5 mM IPTG y se incubó a 20 °C durante 4 h con agitación. Las células BDP con los plásmidos *escN* se incubaron en 500 ml de LB con ampicilina a 30 °C hasta obtener una DO₆₀₀ = 0.6-0.7. Para inducir la producción de se agregó 0.1 mM IPTG e incubó el cultivo en agitación a 30 °C durante 4 h. Las pastillas celulares se colectaron por centrifugación (8,000 × g, 10 min) y se almacenaron a -4 °C.

Para purificar las proteínas, las pastillas celulares se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 1/10 del volumen inicial de amortiguador TN (20 mM Tris-Cl pH 7.4, 500 mM NaCl) con 1 mM PMSF y 100 µg·ml⁻¹ lisozima. Las células se lisaron por sonicación y después se centrifugaron a 27,000 × g durante 30 min. El sobrenadante se aplicó a una columna de agarosa Ni-NTA (Qiagen) pre-equilibrada con amortiguador TN. La columna se lavó con el amortiguador TN que contenía concentraciones crecientes de Imidazol (35, 60 y 75 mM) y posteriormente las proteínas se eluyeron en 3 ml de TN con 500 mM Imidazol. La producción y purificación de las proteínas His-FliJ y His-FliI usando los plásmidos pMM406 y pMM1702

respectivamente, se realizó utilizando la misma metodología pero en células de *Salmonella* SJW1368. La cuantificación de proteína se llevó a cabo por medio del método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay).

Ensayos de copurificación tipo *pull-down*

Con el objetivo de investigar la interacción de EscO con diferentes proteínas del SST3, se realizaron ensayos de copurificación tipo *pull-down*. Cultivos de *E. coli* BDP transformados con pET19b codificando las diferentes versiones de EscO (pNEescO, pMEescO₁₋₆₀, pMEescO₆₀₋₁₂₅ o pMEescO_{Δ10}) se indujeron como se describió. Por otro lado, cultivos de *Salmonella* SJW1369 transformados con pTrc99A_FF4 codificando las diferentes versiones de EscN (pATescN o pATescN_{Δ102}) o las chaperonas (pATcesAB, pMTcesD, pMTcesD2, pMTcesF, pMTcesT) se indujeron con 0.1 mM IPTG durante 5 h a 30 °C en agitación. Las pastillas celulares se colectaron por centrifugación (8,000 × g, 10 min) y se almacenaron a -20 °C. Las pastillas de los cultivos inducidos se resuspendieron en 20 ml de amortiguador TN (20 mM Tris-Cl pH 7.4, 500 mM NaCl) con 100 μg·ml⁻¹ lisozima y 0.1 mM PMSF. Las células se lisaron por sonicación y se centrifugaron a 15,000 × g durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes conteniendo la fracción soluble de BDP con His-EscO y la fracción soluble de SJW1368 con la proteína blanco sin etiqueta (EscN, CesAB, CesD, CesD2, CesF o CesT) se incubaron en agitación suave a 4 °C durante 1 h. Después se agregaron 200 μl de resina Ni-NTA (QIAGEN) pre-equilibrada y se incubó 1 h a 4 °C en agitación suave. Después de colectar la fracción de la muestra al pasar por la columna (fracción no unida), la resina se lavó 3 veces con 10 ml de amortiguador TN conteniendo 30, 60 y 75 mM Imidazol respectivamente. Finalmente, las fracciones eluidas se obtuvieron con 400 μl de

amortiguador TN + 500 mM Imidazol. Fracciones equivalentes de las muestras se analizaron por SDS-PAGE 15% y por inmunodetección tipo Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas.

Inmunodetección tipo Western Blot

Para la detección de las proteínas, las muestras se separaron por SDS-PAGE al 15% y se electrotransfirieron húmeda a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con solución TBS-tween-leche (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 10% Tween 20, 5% leche). Posteriormente se analizaron con anticuerpos policlonales anti-EscO (1:2,000), anti-EspA (1:40,000), anti-EspB (1:35,000), anti-EspF (1:30,000), anti-Tir (1:10,000), anti-EscN (1:30,000), anti-CesAB (1:30,000), anti-CesD (1:40,000), anti-CesD2 (1:30,000), anti-CesF (1:35,000) y anti-CesT (1:30,000); los cuales, han sido generados en el laboratorio por inmunización en conejos. La inmunodetección con anticuerpos monoclonales anti-His (Pierce, 1:10,000) y anti-DnaK (MBL International, 1:15,000) se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*horseradish peroxidase*) son anti-conejo (*goat anti-rabbit*, GAR) o anti-ratón (*goat anti-mouse*, GAM) obtenidos en cabra (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:20,000. La detección se realizó utilizando el estuche de inmunodetección ECL (Amersham) o ECL Advance (Amersham).

Ensayo de doble híbrido en levadura

El ensayo de doble híbrido en levadura se realizó utilizando el sistema “Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3” (Clontech) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las construcciones obtenidas en los vectores pGBKT7 y pG7ADT (Tabla 2) se cotransformaron en la cepa de levadura AH109 utilizando acetato de litio (Gietz and Schiestl 1995). Las levaduras se plaquearon en medio sólido SD de baja astringencia (SD -Leu -Trp) y se crecieron a 30 °C. Se eligió una colonia al azar, seleccionadas en medio líquido SD de baja astringencia a 30 °C durante toda la noche en agitación. Se realizaron diluciones seriales (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000, 1/100 000 v/v) en agua desionizada estéril. Se inocularon 3µl de cada dilución en medio sólido SD de baja (SD -Leu -Trp) y mediana (SD -Leu -Trp -His) astringencia. Las levaduras se crecieron a 30 °C. Como control positivo y negativo se utilizaron los del sistema (pGADT7-T + pGBKT7-53 y pGADT7-T + pGBKT7-lam, respectivamente).

Ensayo de actividad de ATPasa

Se utilizó una modificación del ensayo de verde de malaquita descrito previamente para determinar la actividad de ATPasa de EscN (Andrade, Pardo et al. 2007). Una mezcla de reacción conteniendo 0.25 µM His-EscN, 3mM ATP y 4 mM MgCl₂ se incubó con diferentes relaciones molares de las diferentes versiones de His-EscO o His-FliJ a 37°C en 100 mM Tris-HCl pH 8.0. A diferentes tiempos, 100 µl de la reacción se mezcló con 800 µl del agente colorimétrico de verde de malaquita (0.034% hidrocloreto de verde de malaquita, 1N HCl, 1.05% molibdato de amonio y 0.1% Tritón X-100). Después de 2 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 100µl de ácido cítrico 34% y se incubó 25 min a temperatura ambiente. La liberación de fosfato inorgánico

(Pi) se determinó comparando la absorbancia a 650 nm con una curva estándar de fosfatos. El mismo procedimiento se utilizó para evaluar la actividad de la ATPasa flagelar His-FliI en presencia de His-EscO y His-FliJ.

Ensayo de secreción de proteínas del SST3

La secreción de proteínas de virulencia de EPEC se realizó en medio DMEM (Deng, Vallance et al. 2003). Brevemente, 120 µl de un precultivo de EPEC (crecido toda la noche a 37 °C con agitación en medio LB) se inoculó en 6 ml de medio DMEM pre-equilibrado (toda la noche a 37 °C en 5% CO₂) y se incubó durante 6 h a 37 °C en 5% CO₂. El cultivo se centrifugó a 26,000 × g durante 5 min y la pastilla celular se resuspendió en amortiguador de carga Laemmli 1X. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron agregando ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 10% e incubándolo al menos 1 hora en hielo. Después se centrifugó a 26,000 × g durante 30 min a 4 °C. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en amortiguador de carga Laemmli 1X + 10% de Tris saturado. La concentración de proteína se normalizó con base en la DO₆₀₀ de los diferentes cultivos. Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE y por inmunodetección tipo Western Blot.

Ensayo de movilidad

Colonias frescas se inocularon en placas de agar de tripton suave 0.5% (Sockett, Yamaguchi et al. 1992) en ausencia o presencia de 1 mM IPTG, y se incubaron a 37 °C durante 5 h. En el ensayo de efecto multicopia de EscO sobre el nado de *Salmonella*, se analizó la cepa silvestre (SJW1103)

transformada con los plásmidos pMT_{escO}, pMT_{escO}_{Δ10} o pMM404 (*fliJ*). Para el ensayo de complementación heteróloga, se analizó la movilidad de la cepa Δ *fliJ* en presencia de los plásmidos pMAT_{escO}, pMAT_{escO}_{Δ10} o pACTrcJ (*fliJ*).

Obtención de la fracción periplásmica de EPEC

Para analizar la presencia de EscO en el periplasma como se ha reportado (Sal-Man, Biemans-Oldehinkel et al. 2012), se utilizó la metodología para la de extracción de la fracción periplásmica de EPEC (Garcia-Gomez, Espinosa et al. 2011). Brevemente, 2 ml de los cultivos iniciales de EPEC (3 ml de LB crecidos a 37 °C en agitación toda la noche) transformada con los plásmidos pME_{escO} y pME_{23escO} se inocularon en 100 ml de medio DMEM pre-equilibrado y se crecieron a 37 °C con 5 %CO₂ hasta obtener una DO₆₀₀ = 0.6-0.8. Se tomó una muestra de 1.5 ml como referencia de células completas. Los cultivos se centrifugaron y lavaron con PBS 1X. La pastilla celular se resuspendió en 1 ml de solución de choque osmótico (50mM Tris-Cl pH 7.0, 20% Sacarosa (w/v) y 1mM PMSF). Se agregó 2 mM EDTA e incubó durante 10 min a temperatura ambiente. La fracción periplásmica se obtuvo del sobrenadante al centrifugar la muestra 8,000 x g durante 10 min a 4 °C. La fracción periplásmica se analizó por inmunodetección tipo Western Blot con anticuerpos específicos anti-His. Para analizar la pureza de la muestra se utilizaron anticuerpos anti-MBP (proteína periplásmica), así como anti-DnaK y anti-CesT (proteínas citoplásmicas).

Modelaje de EscO en I-Tasser

Utilizando el programa I-Tasser se obtuvo un modelo tridimensional de la proteína EscO (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Este servidor requiere únicamente de la secuencia de aminoácidos para generar el modelo 3D. La selección de la plantilla, alineación y construcción del modelo se realizó automáticamente por el servidor (Zhang 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Interacción de EscO con las proteínas chaperonas del SST3

Previamente se demostró que la proteína FliJ, equivalente de EscO en el sistema flagelar, posee una función como chaperona de chaperonas mediante un proceso de reciclaje (Evans, Stafford et al. 2006). Posteriormente se propuso este mecanismo en el ensamblaje del inyectisoma en *Yersinia* y *Salmonella* a través de las proteínas YscO e InvI, respectivamente (Evans and Hughes 2009). Previamente se demostró que EscO comparte algunas características con la proteína FliJ y sus equivalentes en el inyectisoma YscO e InvI (Romo-Castillo 2010). Por tal motivo, se analizó si EscO interacciona con proteínas chaperonas para favorecer el reciclaje de éstas durante la biogénesis del inyectisoma de EPEC. Hasta el momento se han reportado 6 proteínas chaperonas: CesAB: chaperona de los translocadores EspA y de EspB (Creasey, Friedberg et al. 2003), CesD: chaperona de los translocadores EspD y EspB (Wainwright and Kaper 1998), CesD2: chaperona auxiliar del translocador EspD (Neves *et al.*, 2002), CesF: chaperona del efector EspF (Elliott, O'Connell et al. 2002), CesT: chaperona de los efectores Tir, EscN, Map, EspF, NleA, NleH, NleF y EspZ (Thomas *et al.*, 2005) y CesA2: chaperona auxiliar de EspA (Su, Kao et al. 2008).

Por medio de ensayos de copurificación tipo *pull-down* se analizó la capacidad de His-EscO de interaccionar con las diferentes chaperonas del sistema: CesAB, CesA2, CesD, CesD2, CesF y CesT. Los resultados obtenidos demostraron que EscO interacciona con las chaperonas CesD,

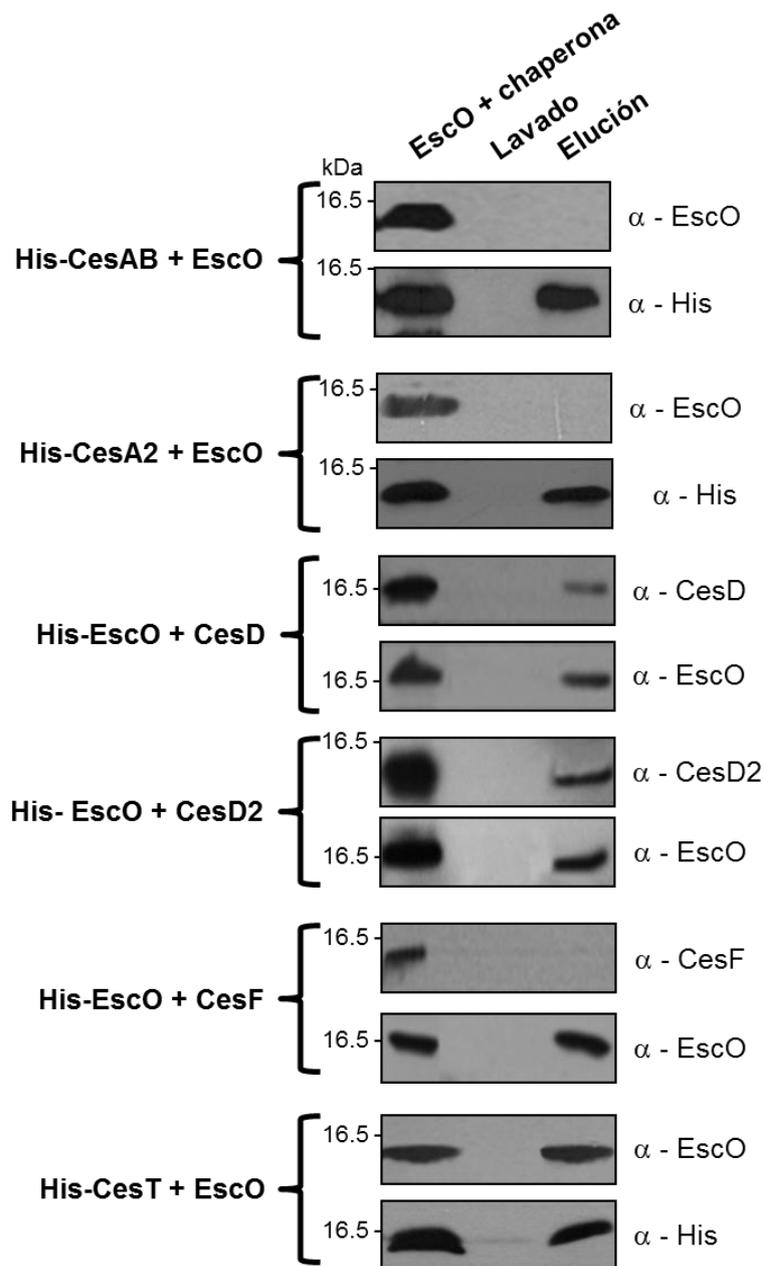


Figura 11. Interacción de EscO con las proteínas chaperonas del SST3 de EPEC. Ensayo de copurificación tipo *pull-down* por cromatografía de afinidad a níquel. Las fracciones solubles de *E. coli* BDP expresando las proteínas recombinantes etiquetadas con histidinas y *Salmonella* SJW1368 expresando las proteínas sin etiqueta, se mezclaron e incubaron con la resina Ni-NTA y se cargaron en la columna. Después de extensivos lavados las proteínas se eluyeron y se analizaron por inmunodetección tipo Western Blot. Se utilizaron anticuerpos policlonales específicos anti-CesD, anti-CesD2, anti-CesF, anti-EscO, o el anticuerpo monoclonal anti-His (Santa Cruz Biotechnology), así como el anticuerpo secundario GAR (Goat anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology).

CesD2 y CesT; pero no interacciona con las chaperonas CesAB, CesA2 ni CesF (Figura 11). Esto sugiere que EscO, al igual que FliJ, pudiera estar realizando un reciclaje de proteínas chaperonas

durante dos etapas, primero durante el proceso de secreción de las proteínas translocadoras (facilitando la exportación de EspB y EspD) y posteriormente, durante el proceso de secreción de proteínas efectoras (facilitando la exportación de los efectores Tir, Map, EspG, EspG2, Nle's). Durante el proceso de secreción de proteínas translocadoras, se lleva a cabo la exportación de múltiples subunidades de la proteína EspA y pocas subunidades de las proteínas EspB y EspD. Por lo tanto, proponemos que para facilitar la exportación de las proteínas EspB/D, EscO es responsable de reciclar a las chaperonas CesD y CesD2; mientras que las chaperonas CesAB y CesA2 son responsables de la exportación de las subunidades de EspA. Una vez que la bacteria ha hecho contacto con la célula hospedera, y se da el cambio de especificidad de secreción de translocadores a efectores, EscO es responsable de reciclar a la chaperona CesT. Debido a que CesT es una chaperona multicargo que se requiere para la secreción de varios de los efectores (Tir, Map, NleA, NleH, NleF y EspZ), el mantenerla disponible es indispensable para que se lleve a cabo el proceso de secreción. Por otro lado, la chaperona CesF no se requiere reciclar porque asiste únicamente al efector EspF.

EscO interacciona con la ATPasa EscN

Previamente, estudios realizados demostraron que la sobreexpresión de la ATPasa EscN en la cepa $\Delta escO$ restaura parcialmente la secreción de proteínas de virulencia, sugiriendo que la función de EscO está ligada con la función de la ATPasa EscN, probablemente facilitando su localización u oligomerización (Romo-Castillo 2010). Adicionalmente, estudios previos del sistema flagelar demostraron que la proteína FliJ interacciona con la ATPasa FliI, promoviendo su oligomerización e incrementando su actividad catalítica (Ibuki, Imada et al. 2011). De igual

forma, la interacción entre estas proteínas también se demostró para el sistema de virulencia en *Salmonella* y *Chlamydomphila* (Stone, Johnson et al. 2008, Cherradi, Hachani et al. 2014). Sin embargo, esta interacción no se identificó en el sistema de virulencia de *Chlamydia* (Stone, Bulir et al. 2011) lo que sugiere que probablemente no esté conservada en todos los sistemas de virulencia.

Para analizar la posible interacción de EscO con la ATPasa EscN se realizaron ensayos de copurificación tipo *pull-down* incubando las fracciones solubles de lisados celulares con las proteínas EscO e His-EscN sobreexpresadas a partir del vector pTrc99A_FF4. Los resultados obtenidos indican que EscO interacciona directamente con la ATPasa EscN (Figura 12). La interacción se comprobó *in vivo* utilizando el sistema de doble híbrido en levadura (Y2H) (Figura 12). Este resultado indica que la interacción EscO-EscN está conservada como se ha demostrado para el sistema flagelar y el inyectisoma de *Salmonella* y *Chlamydomphila*; lo que sugiere que el mecanismo de función entre estas proteínas también podría estar conservado. Para analizar mejor esta interacción se consideró necesario el mapeo de las regiones de cada proteína, para determinar la región que es indispensable.

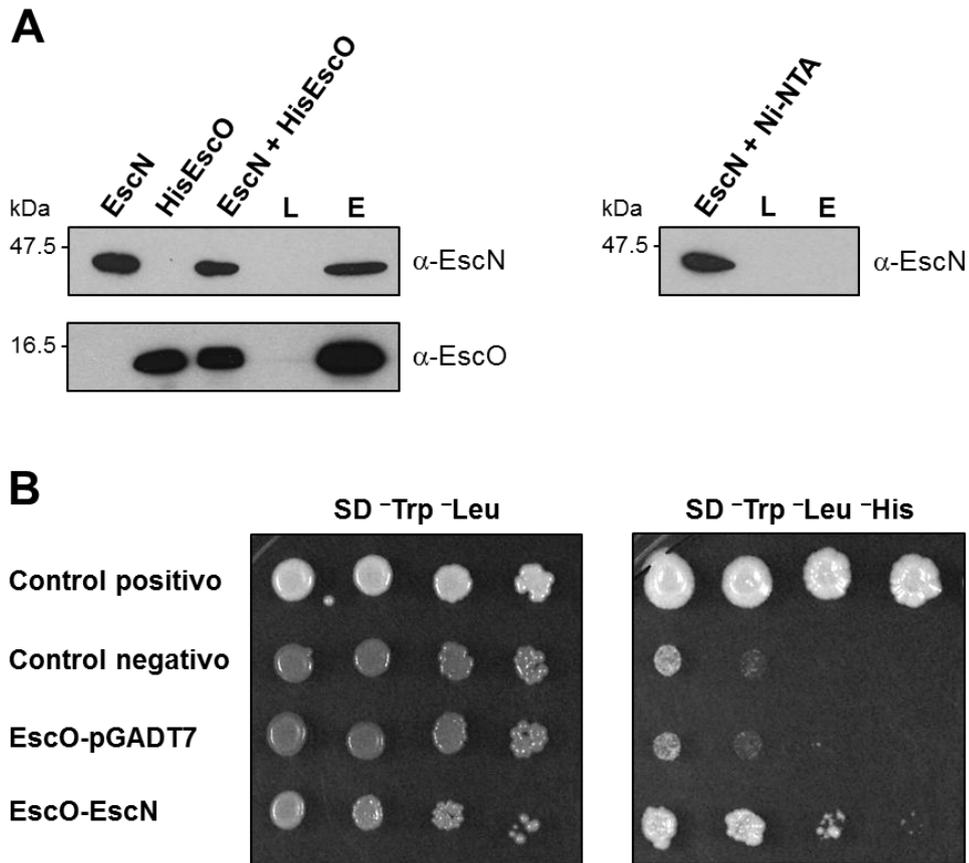


Figura 12. Interacción de EscO con la ATPasa EscN. A. Ensayo de copurificación tipo *pull-down* por cromatografía de afinidad a níquel. Las fracciones solubles de *E. coli* BDP expresando His-EscO y *Salmonella* SJW1368 expresando EscN se mezclaron, incubaron con la resina Ni-NTA y se cargaron en la columna. Después de extensivos lavados (L) las proteínas se eluyeron (E) y se analizaron por inmunodetección tipo Western Blot utilizando anticuerpos policlonales anti-EscO y anti-EscN. Como control negativo, la fracción soluble de *Salmonella* expresando EscN se incubó con la resina. B. Ensayo *in vivo* de la interacción EscO-EscN. El ensayo de doble híbrido en levadura se realizó utilizando *S. cerevisiae* AH109 cotransformada con los plásmidos pNGBKescO y pGADT7 o pNAGADescN. Las levaduras cotransformadas se crecieron en medio líquido SD de baja astringencia (SD -Trp -Leu). Posteriormente se realizaron diluciones seriales, las cuales se inocularon por goteo en medio SD de mediana astringencia (SD -Trp -Leu -His) para comprobar la interacción. Los controles positivos (pGADT7-T y pGBKT7-53) y negativo (pGADT7-T y pGBKT7-Lam) (Clontech).

Con el objetivo de analizar qué regiones de EscO participan en la interacción con la ATPasa EscN, se diseñaron dos proteínas truncas, donde cada una contiene uno de los dominios *coiled-coil* predichos para EscO, denominadas EscO₁₋₆₀ y EscO₆₀₋₁₂₅ (Figura 13A). Debido a la poca estabilidad de la proteína EscO₆₀₋₁₂₅, se continuó el análisis solo con la proteína EscO₁₋₆₀. Por medio de ensayos de copurificación se determinó la interacción de la ATPasa EscN con la

proteína EscO₁₋₆₀. Los resultados muestran que EscO₁₋₆₀ interacciona con la ATPasa EscN (Figura 13B); lo que sugiere que 60 residuos de aminoácidos de EscO son suficientes para que EscO interaccione con la ATPasa EscN. Sin embargo, la conformación estructural que adquiere esta proteína aún no está descrita, por lo que se decidió delimitar los residuos de EscO que participan en la interacción con la ATPasa EscN.

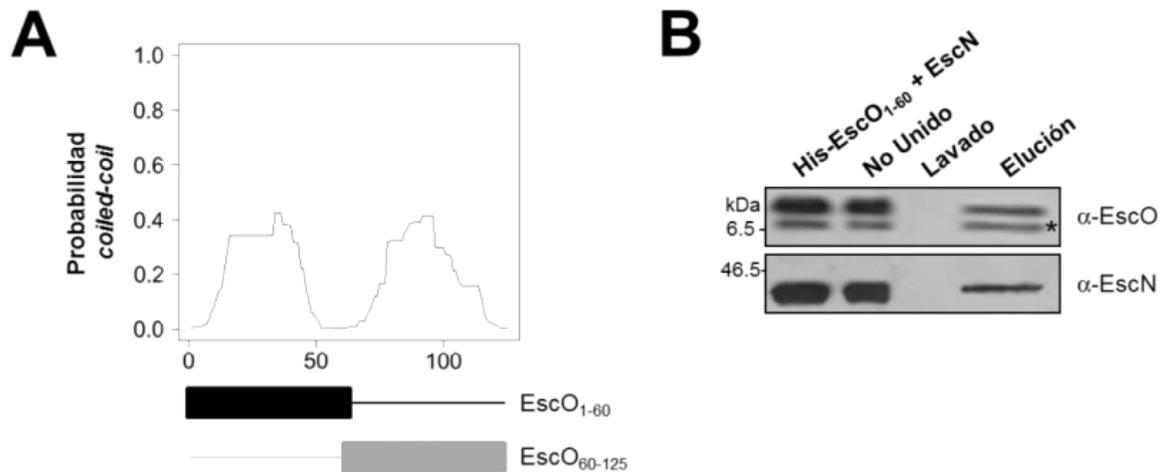


Figura 13. Interacción de EscN con los dominios *coiled-coil* de EscO. A. Predicción de dominios *coiled-coil* de EscO (Multicoil) y diseño de las versiones truncas de EscO. B. Ensayo de copurificación tipo *pull-down* por cromatografía de afinidad a níquel. Las fracciones solubles de *E. coli* BDP expresando His-EscO₁₋₆₀ y *Salmonella* SJW1368 expresando EscN sin etiqueta, se mezclaron e incubaron con la resina Ni-NTA y se cargaron en la columna. Después de extensivos lavados, las proteínas se eluyeron y se analizaron por inmunodetección tipo Western Blot. Se utilizaron anticuerpos policlonales específicos anti-EscO y anti-EscN, y el anticuerpo secundario GAR (Goat anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology). El asterisco (*) indica una banda que probablemente sea producto de la degradación de la proteína His-EscO₁₋₆₀.

Los resultados anteriores indican que los 60 primeros residuos de EscO son suficientes para interactuar con la ATPasa EscN, sin embargo para identificar los residuos importantes para la interacción es necesario identificar la región mínima de EscO que participa en la interacción. Se diseñó una proteína de EscO carente de los primeros 10 residuos del N-terminal (EscO_{Δ10}) y por medio de ensayos tipo *pull-down* se determinó la interacción de EscO_{Δ10} con la ATPasa EscN. Los resultados obtenidos muestran que EscO_{Δ10} no interacciona con la ATPasa EscN (Figura 14).

Estos datos sugieren que los 10 primeros residuos de aminoácidos de EscO son indispensables para mantener la interacción con la ATPasa EscN. Estos resultados son comparables con los resultados obtenidos tanto para el sistema flagelar como para la F₀F₁ ATP sintasa, en donde se ha propuesto que la región N-terminal de FliJ y de la subunidad γ , son suficientes para la interacción con las ATPasas respectivas (FliI y la subunidad β) (Mnatsakanyan, Hook et al. 2009, Minamino, Morimoto et al. 2011).

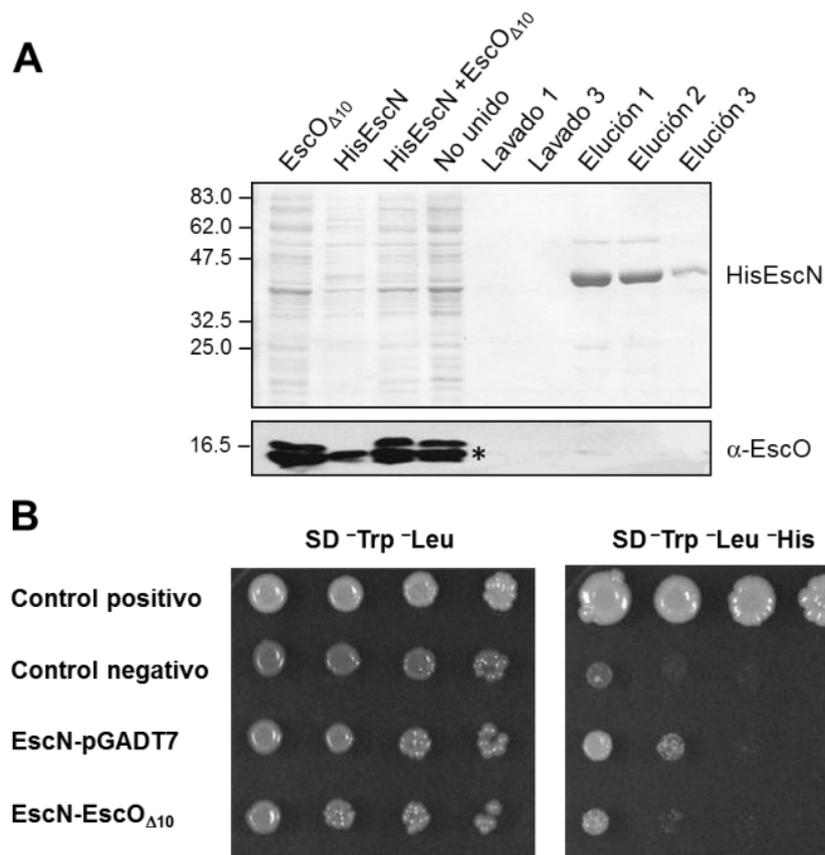


Figura 14. Interacción de la versión de EscO carente los primeros 10 aminoácidos (EscO Δ 10) con la ATPasa EscN. A. Ensayo de copurificación tipo *pull-down* por cromatografía de afinidad a níquel. Las fracciones solubles de lisados de *Salmonella* SJW1368 expresando His-EscN o EscO Δ 10 sin etiqueta se mezclaron, incubaron con la resina Ni-NTA y se cargaron en la columna. Después de extensivos lavados las proteínas se eluyeron y la copurificación de EscO Δ 10 se analizó por Western Blot utilizando anticuerpos policlonales anti-EscO. El asterisco (*) indica una banda inespecífica reconocida por los anticuerpos anti-EscO. B. Ensayo *in vivo* de la interacción EscO Δ 10-EscN. El ensayo de doble híbrido en levadura se realizó utilizando *S. cerevisiae* AH109 cotransformada con los plásmidos pNGAKescO Δ 10 y pGADT7 o pNAGBDescN. Las levaduras cotransformadas se crecieron en medio líquido SD de baja astringencia (SD -Trp -Leu). Posteriormente se realizaron diluciones seriales, las cuales se inocularon por goteo en medio SD de mediana astringencia (SD -Trp -Leu -His) para comprobar la interacción. Los controles positivo (pGADT7-T y pGBKT7-53) y negativo (pGADT7-T y pGBKT7-Lam) son los provistos por el proveedor (Clontech).

Por otro lado, para identificar la región de la ATPasa EscN responsable de interactuar con la proteína EscO, se realizaron ensayos de copurificación tipo *pull-down*. Para realizar este experimento se utilizaron dos versiones de la ATPasa EscN; la primera carente de la región N-terminal, denominada EscN Δ 102; y la segunda con una mutación puntual en la región C-terminal la cual a pesar de tener una actividad específica similar a la silvestre, es incapaz de restaurar el fenotipo de una cepa Δ escN, denominada EscN_{V393P} (Andrade *et. al.*, en proceso). Los resultados obtenidos muestran que EscN Δ 102 sí interacciona con EscO, mientras que EscN_{V393P} no (Figura 15). Estos datos sugieren que la región N-terminal de la ATPasa EscN no es la responsable de la interacción con EscO, mientras que el C-terminal de la ATPasa es la región responsable de la interacción. El resultado es comparable con el obtenido en el sistema flagelar, en donde se demostró que la región C-terminal de la ATPasa FliI (residuos 391-400) es la región de interacción para FliJ (Ibuki, Imada et al. 2011). Esta región de interacción en la ATPasa del SST3 es comparable con una de las regiones de la subunidad β en donde interacciona la subunidad γ , denominada *Catch2* (Abrahams, Leslie et al. 1994).

En conjunto estos resultados sugieren que EscO, al igual que FliJ y la subunidad γ , podría estar localizado en el centro del anillo hexamérico de EscN. La región N-terminal de EscO interacciona con el C-terminal de la ATPasa EscN definiendo, posiblemente, la estructura del sitio catalítico para favorecer la hidrólisis de ATP y proveer la energía necesaria para que se lleve a cabo el proceso de secreción.

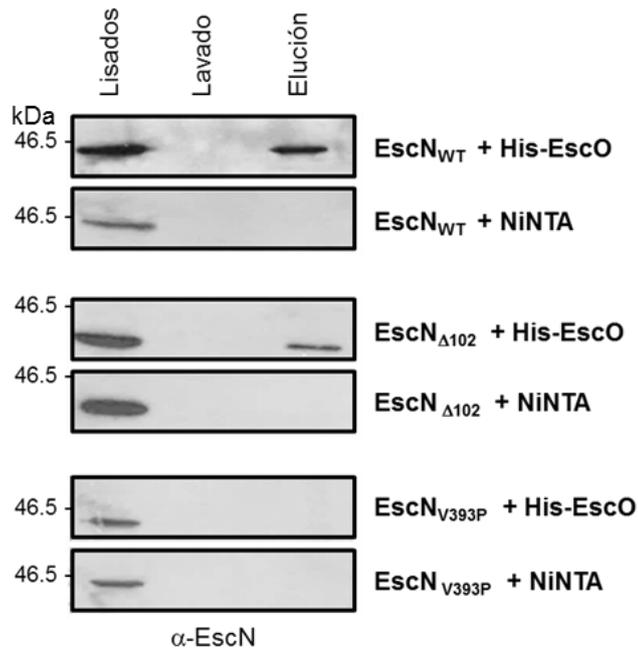


Figura 15. Interacción de EscO con diferentes versiones de la ATPasa EscN. Ensayo de copurificación tipo *pull-down* por cromatografía de afinidad a níquel. Las fracciones solubles de *E. coli* BDP expresando His-EscO y *Salmonella* SJW1368 expresando las diferentes versiones de la ATPasa EscN se mezclaron e incubaron con la resina Ni-NTA y se cargaron en la columna. Después de extensivos lavados las proteínas se eluyeron y se analizaron por inmunodetección tipo Western Blot utilizando anticuerpos policlonales anti-EscN. Como control negativo, la fracción soluble de *Salmonella* expresando cada versión de EscN se incubó con la resina de Ni-NTA.

EscO incrementa la actividad de EscN *in vitro*

Debido a que se identificó la interacción de la proteína EscO con la ATPasa EscN, se propuso analizar el efecto que pudiera tener EscO sobre la hidrólisis del ATP. Previamente se reportó que la proteína FliJ, equivalente flagelar de EscO, al interaccionar con la ATPasa flagelar FliI incrementa su actividad catalítica, proponiendo una función similar de FliJ respecto a la subunidad γ de la F_1F_0 ATPasa (Ibuki, Shimada et al. 2009). Si EscO es equivalente a la subunidad γ , probablemente su interacción con el anillo de la ATPasa EscN produce un cambio conformacional del sitio catalítico de la ATPasa, favoreciendo la unión de nucleótidos o la hidrólisis de ATP necesaria para la secreción de proteínas vía SST3. Se analizó la actividad de ATPasa de EscN *in vitro*, tanto en ausencia como en presencia de diversas concentraciones de

EscO. Como control negativo se utilizó la ATPasa EscN con una mutación en el sitio catalítico, la cual no posee actividad hidrolítica (EscN_{K183E}) (Figura 16). Los resultados muestran que la actividad de EscN incrementa en presencia de EscO hasta 10 veces en una relación molar 1:6 EscN/EscO (0.25 μ M EscN con 1.5 μ M EscO) (Figura 16). Este resultado sugiere que EscO, al igual que γ en la F₁, produce un cambio conformacional en EscN que favorece la unión de nucleótidos o la hidrólisis de ATP. Muy probablemente esta sobreactivación de la ATPasa sea un paso indispensable para que se lleve a cabo la secreción de proteínas vía SST3. Previamente se reportó que la actividad enzimática de la ATPasa EscN posee una cooperatividad positiva, indicando que la oligomerización de la enzima está acoplada con un aumento en la hidrólisis de ATP (Andrade, Pardo et al. 2007). También se identificaron diversas formas oligoméricas de la ATPasa EscN, con una predominancia del monómero, proponiendo que EscN requiere otro componente del aparato de exportación para facilitar la oligomerización de la enzima (Andrade, Pardo et al. 2007). Con los resultados obtenidos sugerimos que EscO sirve como núcleo de oligomerización para la ATPasa EscN y lo estabiliza para mantener a la enzima en un estado activo.

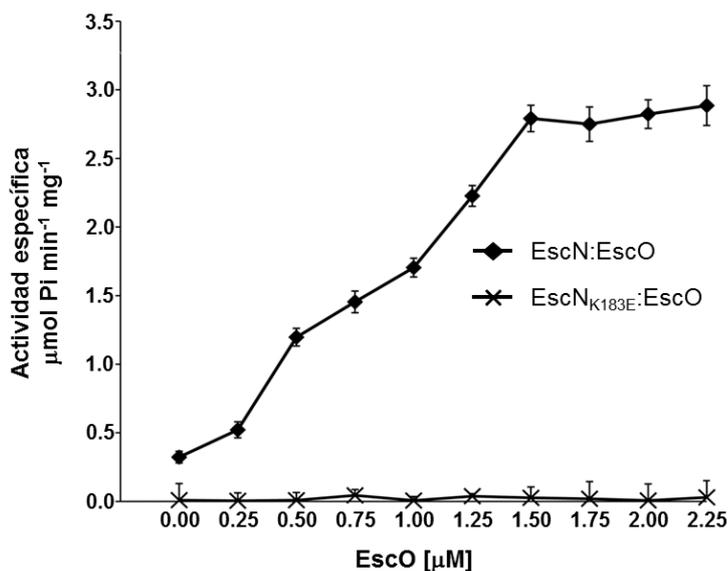


Figura 16. EscO incrementa la actividad de la ATPasa EscN. Ensayo de actividad con verde de malaquita de EscN_{WT} y la mutante catalítica EscN_{K183E} en presencia de diferentes concentraciones de EscO.

Interacción de EscO con la proteína EscL

En el sistema flagelar el complejo ATPasa está conformado por tres proteínas: la ATPasa FliI, el regulador negativo FliH y la proteína FliJ. FliH es una proteína que interacciona con la región amino de la ATPasa FliI e inhibe su actividad enzimática *in vitro* (Minamino and MacNab 2000). También se ha demostrado que FliH se requiere para la localización del complejo ATPasa en la base del aparato de exportación (Minamino, Yoshimura et al. 2009). Estudios previos demostraron que en el SST3 de EPEC esta proteína se encuentra codificada por el gen *orf5* de la isla LEE, el cual fue denominado como EscL (Biemans-Oldehinkel, Sal-Man et al. 2011). Debido a la solubilidad baja y a la poca cantidad de proteína EscL obtenida, por cromatografía de afinidad, para realizar los ensayos de copurificación se produjo una proteína soluble, trunca de los primeros 89 residuos de su región N-terminal (EscL Δ 89). EscL Δ 89 fue capaz de interaccionar con la ATPasa EscN (Figura 17) y de inhibir su actividad hidrolítica (Figura 19). Sin embargo, el mecanismo a través del cual EscL tiene dicho efecto sobre EscN aún se desconoce. En el sistema flagelar se ha propuesto que la proteína reguladora FliH disminuye la actividad de la ATPasa FliI, inhibiendo su oligomerización (Gonzalez-Pedrajo, Fraser et al. 2002).

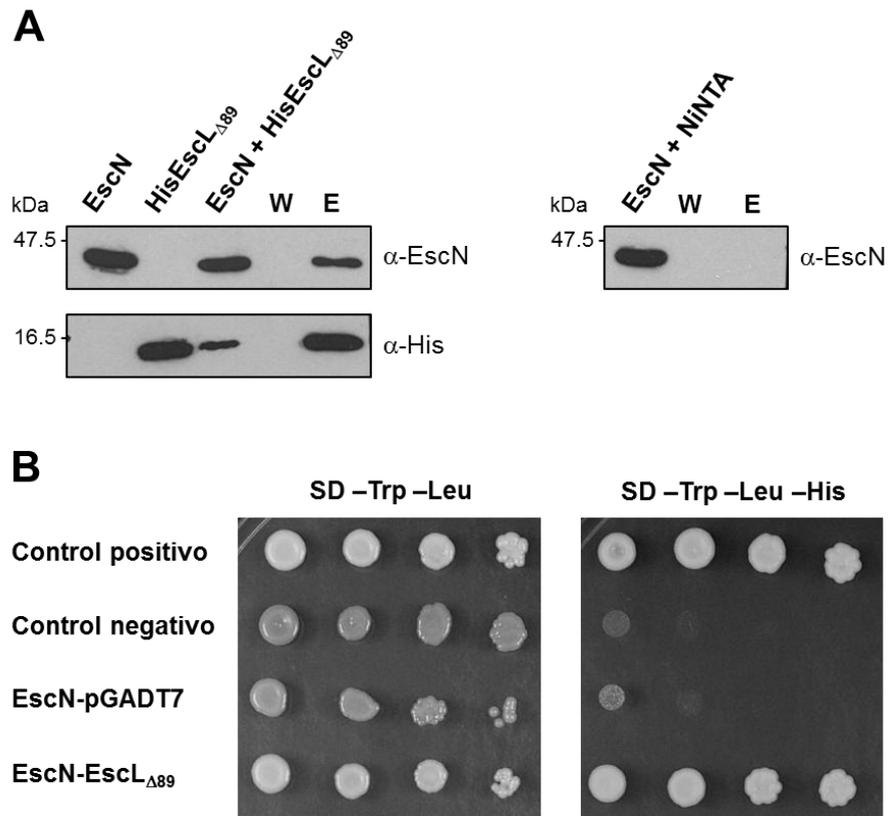


Figura 17. Interacción de la ATPasa EscN con la versión trunca de la proteína EscL (EscL_{Δ89}). A. Inmunodetección de las muestras obtenidas del ensayo de copurificación tipo *pull-down* de EscN con His-EscL_{Δ89}. L: Lavado, E: Elución. Para identificar a EscN se utilizó el anticuerpo primario anti-EscN. Para identificar a His-EscL_{Δ89} se utilizó el anticuerpo anti-histidinas-HRP (Santa Cruz Biotechnology). B. Ensayo de doble híbrido en levadura. Las levaduras cotransformadas se crecieron en medio líquido SD de baja astringencia (SD -Trp -Leu). Posteriormente se realizaron diluciones seriales, las cuales se inocularon en medio SD de mediana astringencia (SD -Trp -Leu -His) para comprobar la interacción.

Previamente se identificó la interacción de la proteína FliJ y su homólogo en *Pseudomonas*, HrpO, con el regulador negativo de la ATPasa (FliH y HrpE, respectivamente) (Gonzalez-Pedrajo, Fraser et al. 2002, Gazi, Bastaki et al. 2008). Además, se ha sugerido que la ATPasa flagelar FliI se encuentra en el citoplasma unida a su regulador FliH quien se encarga de mantenerla inhibida y dirigirla al aparato de exportación (Minamino and MacNab 2000), donde el complejo FliH-FliI interacciona con la proteína FliJ provocando la oligomerización de la ATPasa y su activación para favorecer el proceso de secreción (Minamino 2013). Para corroborar si en el injectisoma de EPEC el proceso dinámico del complejo ATPasa EscN es el mismo, se analizó la interacción de

EscO con el inhibidor de la ATPasa, EscL. Los resultados obtenidos indican que EscO interacciona con la proteína EscL Δ 89 (Figura 18). Este resultado difiere con los datos reportados para el sistema flagelar, donde se identificó que la región amino de FliH es la necesaria para interaccionar con FliJ (Gonzalez-Pedrajo, Fraser et al. 2002), y sugiere que la región de EscL encargada de interaccionar con EscN y EscO pudiera ser la misma (entre los residuos 90-231), desempeñando una dinámica diferente a la propuesta para el sistema flagelar.

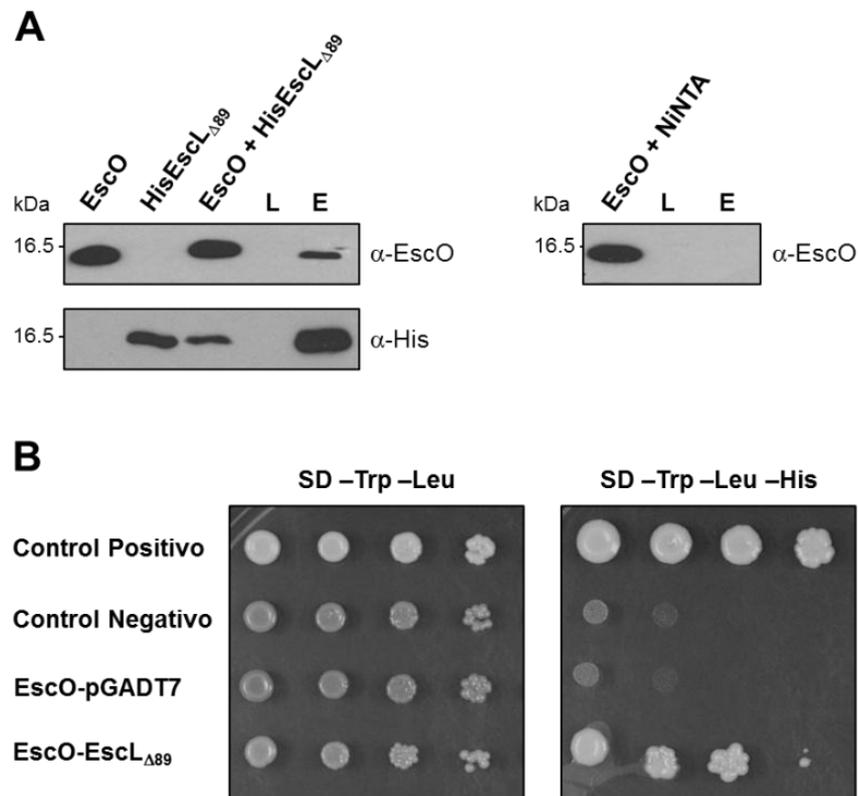


Figura 18. Interacción de EscO con la versión trunca de la proteína EscL (EscL Δ 89). A. Inmunodetección de las muestras obtenidas del ensayo de copurificación tipo *pull-down* de EscO con His-EscL Δ 89. L: Lavado, E: Elución. Para identificar a EscO se utilizó el anticuerpo primario anti-EscO 1:2,000 y como anticuerpo secundario se utilizó GAR 1:5000 (Goat anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology). Para identificar a His-EscL Δ 89 se utilizó el anticuerpo anti-Histidinas-HRP (Santa Cruz Biotechnology). B. Ensayo de doble híbrido en levadura. Las levaduras cotransformadas se crecieron en medio líquido SD de baja astringencia (SD -Trp -Leu). Posteriormente se realizaron diluciones seriales, las cuales se inocularon en medio SD de mediana astringencia (SD -Trp -Leu -His) para comprobar la interacción.

EscL inhibe la sobreactivación de la ATPasa EscN por la proteína EscO

Para poder profundizar sobre la importancia que tiene la sobreactivación de EscN por EscO, se analizó el fenómeno en presencia del inhibidor EscL. La sobreactivación de EscN por EscO desempeña un papel importante sobre el proceso de secreción de proteínas, ya que una vez que este proceso comienza la ATPasa se activa para proveer la energía necesaria para facilitar la disociación del complejo sustrato-chaperona. Previo a esto, la ATPasa EscN permanecer inactiva en el citoplasma hasta que se localice en la base del aparato de exportación evitando un gasto energético innecesario, proceso que está regulado por EscL (Biemans-Oldehinkel, Sal-Man et al. 2011). Una vez que el complejo EscN-EscL se localiza en la base del aparato de exportación, una tercera proteína favorece la oligomerización de la ATPasa EscN y la activa. Debido a los resultados obtenidos de sobreactivación de la ATPasa EscN, EscO podría participar como ese tercer elemento encargado de regular la activación del proceso. Para confirmar esta hipótesis, se analizó la capacidad de EscO de activar a la ATPasa EscN en presencia de su inhibidor, EscL. En este experimento se utilizó tanto EscL como la proteína trunca EscL Δ 89. Se analizó la actividad de EscN en presencia de EscL o EscL Δ 89 y EscO. Los resultados obtenidos indican que en presencia de EscL, la ATPasa EscN ya no puede sobreactivarse por EscO (Figura 19). Estos resultados indican que la ATPasa cuenta con dos proteínas reguladoras, una que inhibe su actividad y otra que la estimula. Probablemente se requiere de otra proteína, aún no identificada, que sea capaz de desplazar el efecto de EscL y permita entonces la sobreactivación por EscO, como podría ser alguno de los componentes del aparato de secreción, alguna chaperona, o alguna de las proteínas del switch.

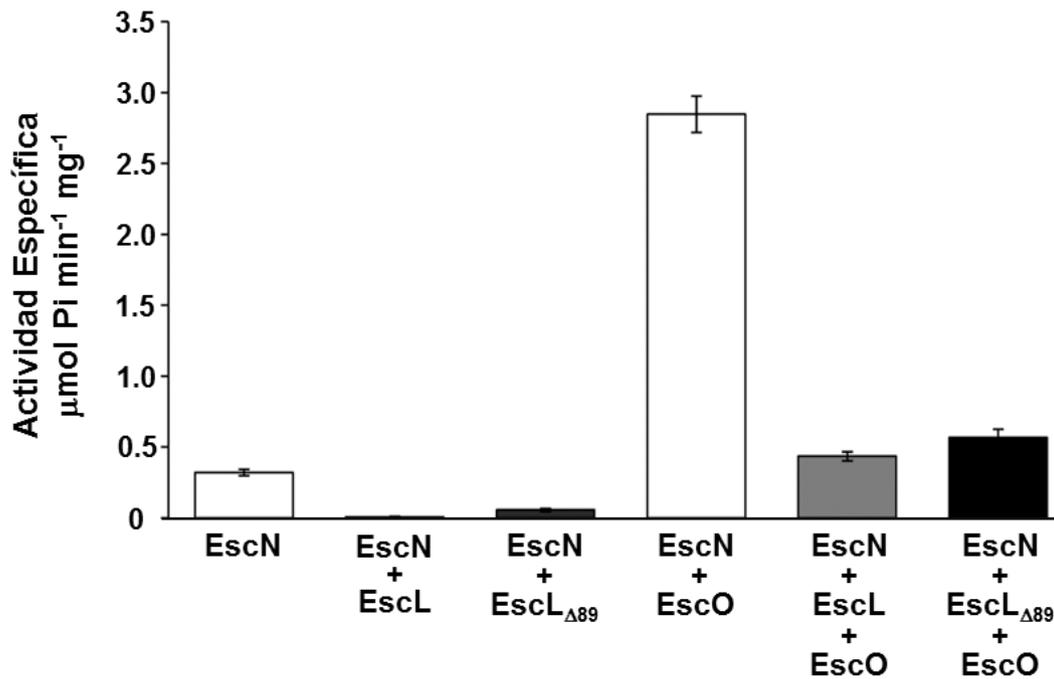


Figura 19. EscL inhibe la sobreactivación de EscN por EscO. Resultados obtenidos a partir de un ensayo de actividad con verde de malaquita de la ATPasa EscN preincubada con EscL/EscL_{Δ89} (relación molar 1:2) y posteriormente incubada con EscO (relación molar 1:2:6).

EscO sustituye parcialmente la función de FliJ

La proteína EscO posee una baja similitud de secuencia con FliJ (32%), sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que estas dos proteínas tienen una función similar interaccionando con las chaperonas, con la ATPasa EscN, incrementando su actividad, y con el regulador negativo de la ATPasa. Estas proteínas comparten otras características como poseer una masa molecular pequeña, un punto isoeléctrico básico y una estructura preferentemente α -helicoidal con una alta tendencia a formar estructuras tipo *coiled-coil*. Por tal motivo, se analizó la posibilidad de intercambiar estas proteínas y restaurar el fenotipo observado en las mutantes $\Delta escO$ y $\Delta fliJ$.

La cepa $\Delta fliJ$ de *Salmonella* (MKM40) al no ser capaz de ensamblar un flagelo, no es mótil, y por lo tanto es incapaz de formar un halo de nado en agar suave (Minamino, Yoshimura et al. 2009). Al complementar la mutante con un plásmido que codifica la proteína FliJ (pACTrcJ), el nado se restaura (Figura 20A). Al complementar la mutante con un plásmido que codifica la proteína EscO (pMATescO) es posible restaurar de forma parcial el nado (Figura 20A). Por otra parte, previamente se reportó que la sobreproducción de FliJ en la cepa silvestre de *Salmonella* produce un efecto multicopia negativo sobre el nado, esto debido a la interacción o el secuestro de proteínas del sistema flagelar que son necesarias para la exportación de los sustratos (Minamino and MacNab 2000). La sobreproducción de la proteína EscO en la cepa silvestre de *Salmonella* mostró un efecto multicopia negativo sobre el nado (Figura 20B). Esto sugiere que EscO es capaz de interactuar con proteínas del sistema flagelar.

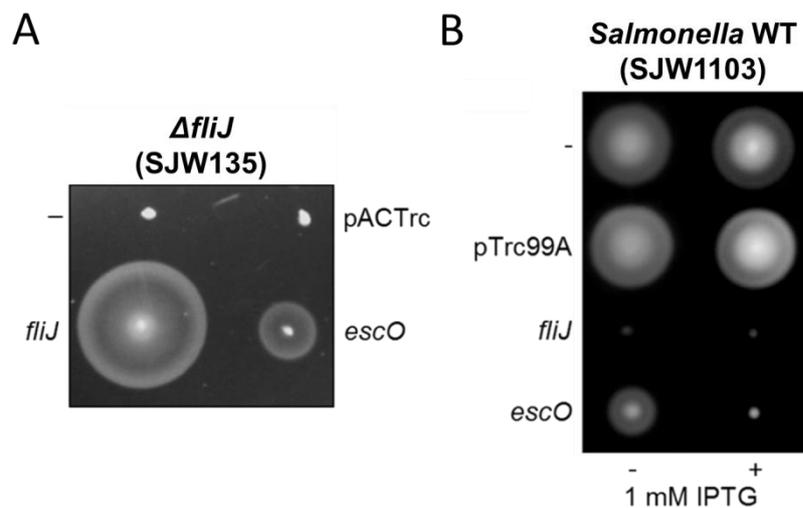


Figura 20. Complementación de la cepa $\Delta fliJ$ y efecto multicopia en la cepa silvestre de *Salmonella* por EscO. A. Ensayo de nado en agar suave de la cepa $\Delta fliJ$ complementada con FliJ y EscO codificadas en el plásmido pACTrc. B. Efecto multicopia de EscO y FliJ en la cepa silvestre de *Salmonella*. Las placas se incubaron a 37°C durante 6 h.

EscO incrementa la actividad de la ATPasa flagelar FliI

Debido a que el resultado anterior sugiere que EscO es capaz de interactuar con componentes del sistema flagelar, y teniendo en cuenta que también interacciona con la ATPasa EscN incrementando su actividad; se analizó la posibilidad de que EscO pudiera incrementar la actividad de la ATPasa flagelar. Previamente se ha reportado que la proteína FliJ incrementa la actividad de la ATPasa flagelar FliI (Ibuki, Imada et al. 2011). Al analizar la actividad de la ATPasa FliI en presencia de EscO, se observó un incremento en su actividad similar al observado con la proteína FliJ (Figura 21). Este resultado sugiere que EscO interacciona con la ATPasa flagelar FliI, y demuestra que igual que FliJ, incrementa su actividad *in vitro*.

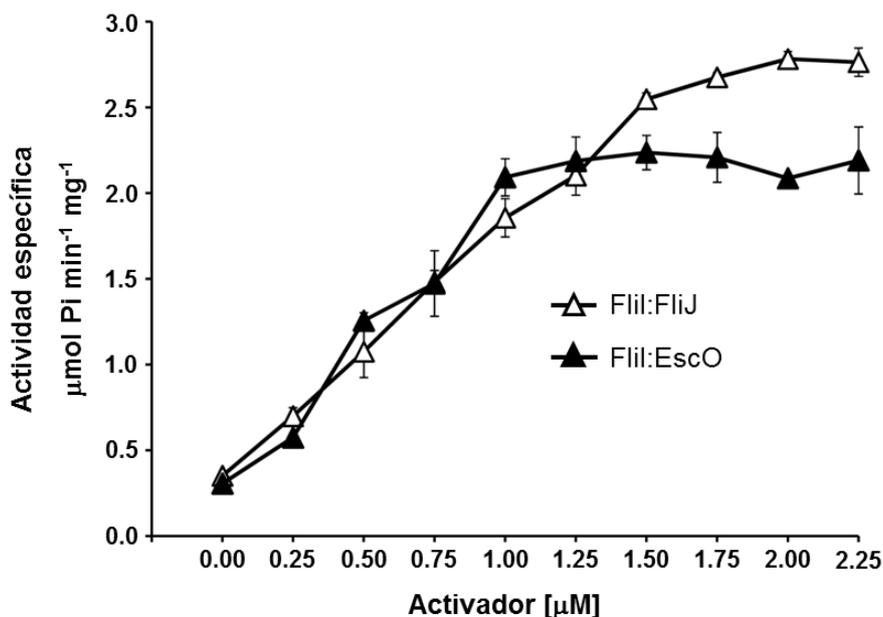


Figura 21. Actividad de la ATPasa flagelar FliI en presencia de FliJ y EscO. Resultados obtenidos a partir de un ensayo de actividad con 0.25 μM FliI en presencia de diferentes concentraciones de FliJ y EscO (0.25- 2.5 μM).

FliJ no sustituye la función de EscO

Los resultados obtenidos previamente sugieren que los miembros de esta familia de proteínas pueden intercambiarse entre los diferentes SST3. Debido a que EscO es capaz de complementar el nado en la cepa $\Delta fliJ$ y de activar a la ATPasa flagelar FliI; se analizó la posibilidad de complementar la cepa $\Delta escO$ de EPEC con la proteína flagelar FliJ. Por medio de ensayos de secreción de proteínas se analizó el fenotipo de la cepa $\Delta escO$ transformada con el plásmido pMM404 (pTrc99A + *fliJ*). Los resultados obtenidos demostraron que FliJ no complementa la deficiencia de secreción de la cepa $\Delta escO$ (Figura 22A). Por otro lado, al analizar la actividad de la ATPasa EscN en presencia de FliJ, se encontró un incremento de la actividad de EscN de su actividad basal ($0.3 \mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) a $0.5 \mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Figura 22B). Estos resultados sugieren que la sobreactivación de EscN es indispensable para que se lleve a cabo el proceso de secreción. Aunque FliJ sea capaz de interactuar con la ATPasa EscN y estimular de forma moderada su actividad, probablemente se necesita una interacción fuerte que sea capaz de sobreactivar a la ATPasa para que el sistema sea funcional y capaz de secretar las proteínas.

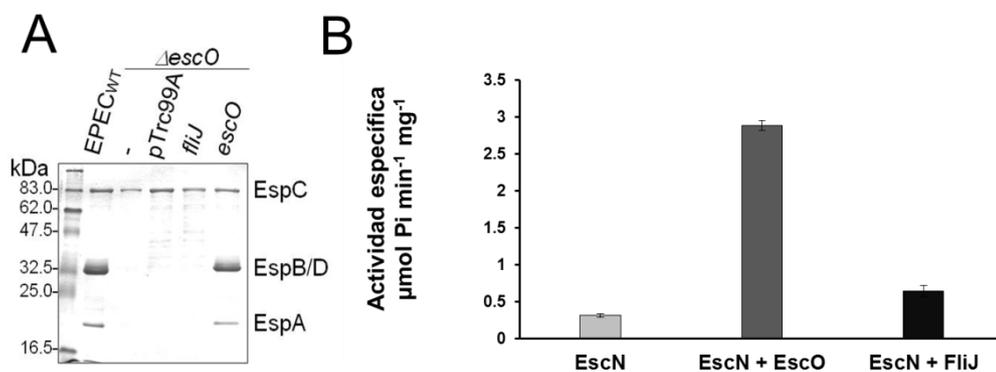


Figura 22. Complementación de la cepa $\Delta escO$ y activación de la ATPasa EscN con FliJ. A. Ensayo de secreción de proteínas de virulencia en DMEM a 37°C con 0.5% de CO₂. Las proteínas secretadas se precipitaron con 10% TCA y posteriormente se analizaron por SDS-PAGE 15%. B. Actividad específica de EscN en presencia de FliJ y EscO. Resultados obtenidos a partir de un ensayo de actividad con verde de malaquita de 0.25 μM EscN en presencia de FliJ o EscO (1.5 μM).

Modelo estructural de EscO

Recientemente se obtuvieron las estructuras cristalográficas de CdsO del sistema de virulencia de *Chlamydia* (Lorenzini, Singer et al. 2010) y de FliJ del sistema flagelar de *Salmonella* (Ibuki, Imada et al. 2011) (Figura 23C y D). En ambos casos se obtuvo una estructura conformada por un dominio *coiled-coil* formado por dos hélices antiparalelas (Figura 23C y D), estas estructuras son comparables con el dominio *coiled-coil* de la subunidad γ (Figura 23E). Para poder comparar la estructura de EscO con la obtenida en los cristales de CdsO y FliJ, se modeló la estructura de EscO utilizando el programa I-TASSER (Figura 23A y B). Los resultados obtenidos arrojan dos modelos con un valor de confianza muy cercano (C-score= -1.64 y -1.71, respectivamente). El primero es un modelo conformado por dos dominios *coiled-coil* mientras que el segundo es un dominio *coiled-coil* conformado por dos alfa hélices antiparalelas (Figura 23A y B). Al comparar las estructuras obtenidas para EscO con las estructuras resueltas para CdsO, FliJ y la subunidad γ (Figura 23C, D y F, respectivamente), podemos observar que el segundo modelo de EscO es el que se ajusta con las estructuras de estas proteínas. Al realizar un alineamiento estructural del modelo 2 de EscO sobre las estructuras de las proteínas CdsO, FliJ y el dominio *coiled-coil* de la subunidad γ de la F₀F₁ ATPsintasa, podemos observar una gran similitud entre estas estructuras (RMSD=3.34 Å) (Figura 23F,G y H).

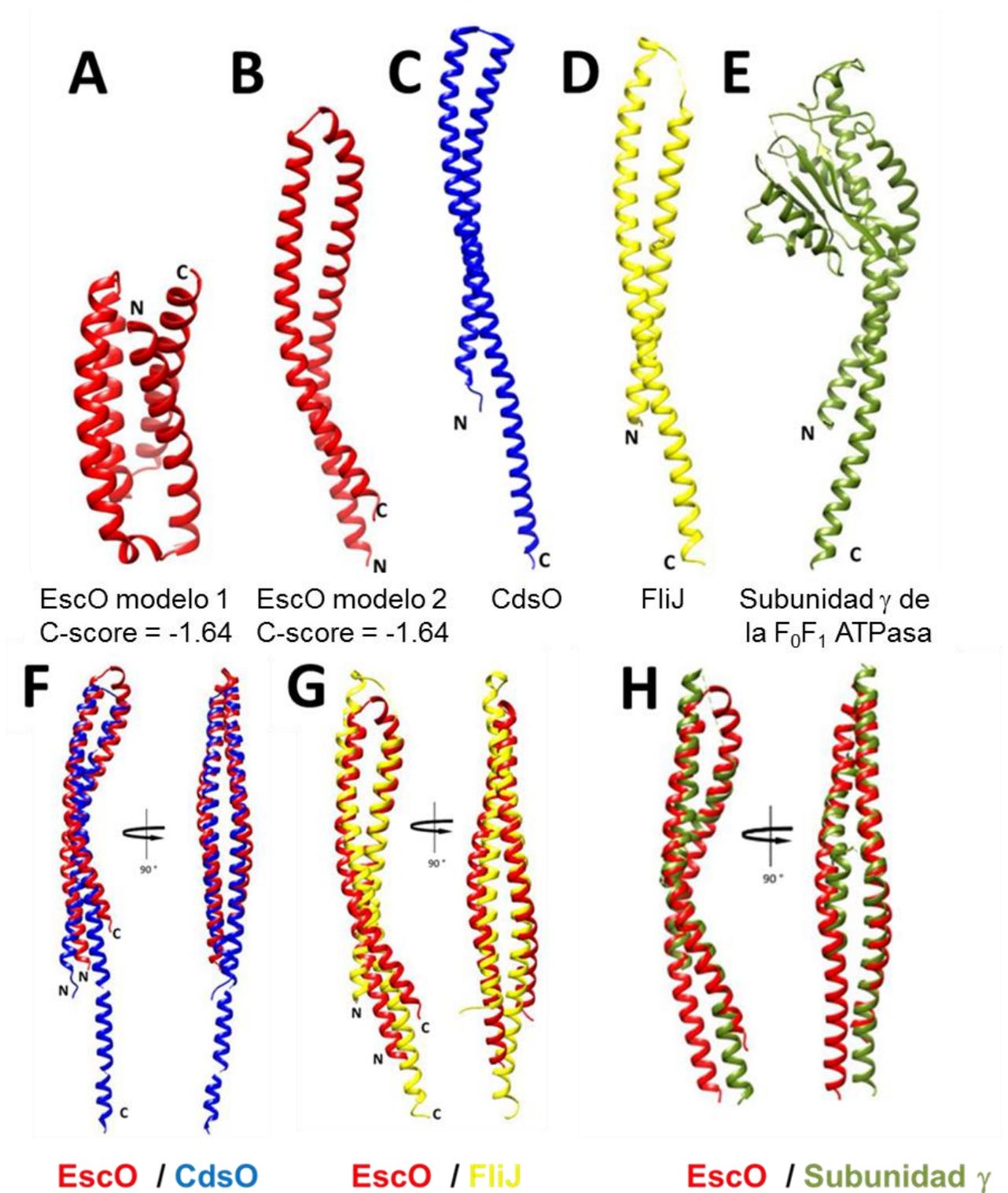


Figura 23. Modelo estructural de EscO. A. y B. Modelo estructural de EscO obtenido de la predicción realizada en I-TASSER. C. Estructura cristalográfica de CdsO de *Chlamydia* (PDB: 3K29A). D: Estructura cristalográfica de la proteína flagelar FliJ de *Salmonella* (PDB: 3ajwA). E. Estructura cristalográfica de la subunidad γ de la F_0F_1 ATPsintasa (PDB:1E79). F. Superposición del modelo de EscO sobre la estructura de CdsO. G. Superposición del modelo de EscO sobre la estructura de FliJ. H. Superposición del modelo de EscO sobre la estructura del dominio *coiled-coil* de la subunidad γ de la F_0F_1 ATPsintasa.

Debido a que los datos estructurales y funcionales obtenidos para EscO sugieren que tiene una función equivalente a la de la proteína flagelar FliJ y la subunidad γ se construyó un modelo *in silico* de un complejo EscN₆-EscO (Figura 24).

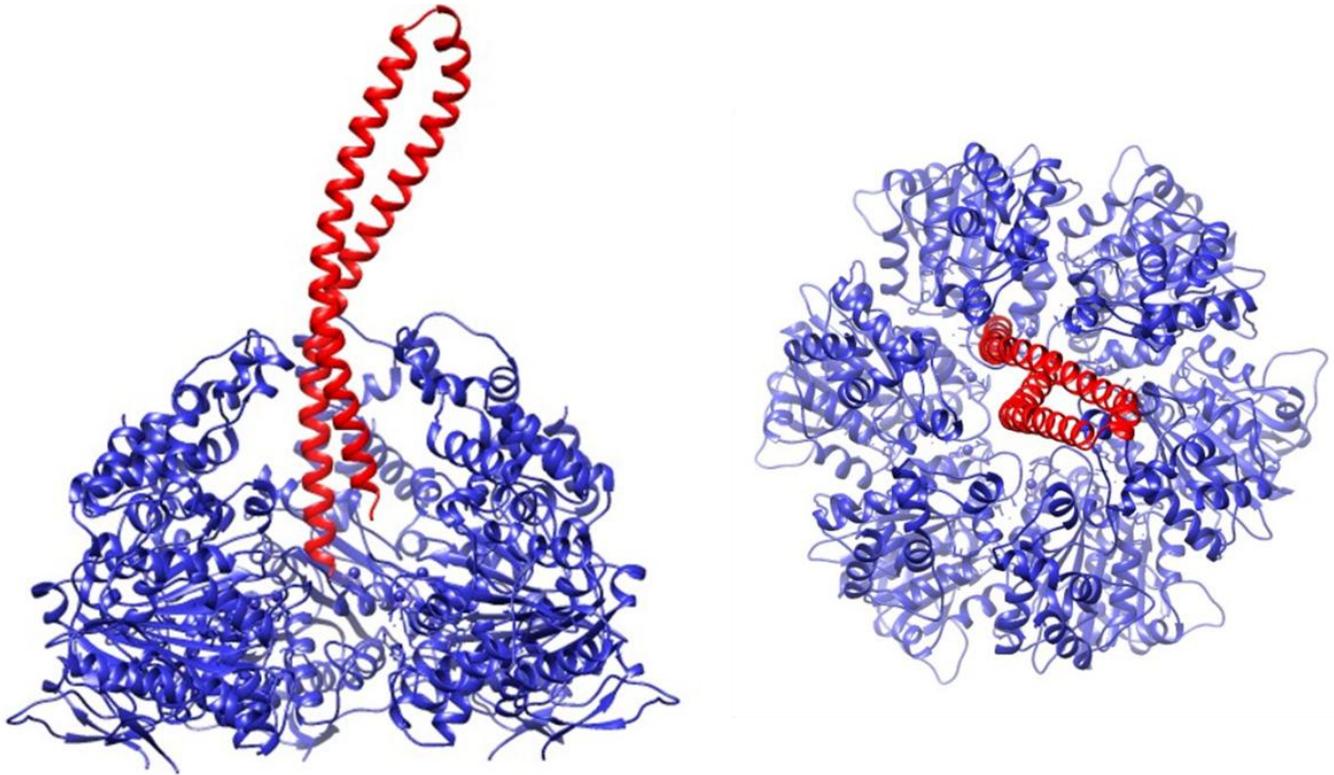


Figura 24. Modelo *in silico* del complejo EscN₆-EscO. El anillo homohexamérico de EscN (azul) se modeló utilizando como templado las coordenadas de anillo heterohexamérico $\alpha_3\beta_3$ de la F₁ ATPsintasa (PDB:1E79). La localización del modelo estructural de EscO (rojo) se ajustó con la región correspondiente de la subunidad γ de la F₁ ATPsintasa.

Las argininas de EscO conservadas con la familia de proteínas YscO, no son indispensables para su función

Debido a la similitud encontrada entre EscO y la proteína YscO de *Yersinia*, se realizó un alineamiento de secuencias de las proteínas para identificar residuos conservados que estuvieran relacionados con la función de estas proteínas. Al alinear la secuencia de EscO con varias de las proteínas de la familia de YscO (Pfam 07321) se identificaron varios residuos conservados

(Figura 25A), entre los que se encuentran dos argininas (Arg12 y Arg 15 en EscO). Para identificar la importancia de estos residuos en la función de EscO, se realizó una versión de EscO mutante en ambas argininas, en la cual ambos residuos se modificaron por alaninas (EscO_{DMRA}). Al complementar la cepa Δ escO con His-EscO_{DMRA} codificada en un plásmido (pMEescO_{DMRA}), la falta de secreción de proteínas se restauró a niveles comparables con los de la cepa complementada con His-EscO (Figura 25C). También se corroboró que los niveles de sobreactivación de la ATPasa EscN por EscO_{DMRA} son iguales a los obtenidos por EscO_{WT} (Figura 25). Estos resultados indican que las argininas no son necesarias para poder sobreactivar a la ATPasa EscN, lo que sugiere que una vez que la ATPasa es sobreactivada por EscO o EscO_{DMRA}, el proceso de secreción de proteínas se puede llevar a cabo. Esto indica que las argininas conservadas no poseen una importancia funcional para EscO, a pesar de estar conservadas con las proteínas de la familia YscO.

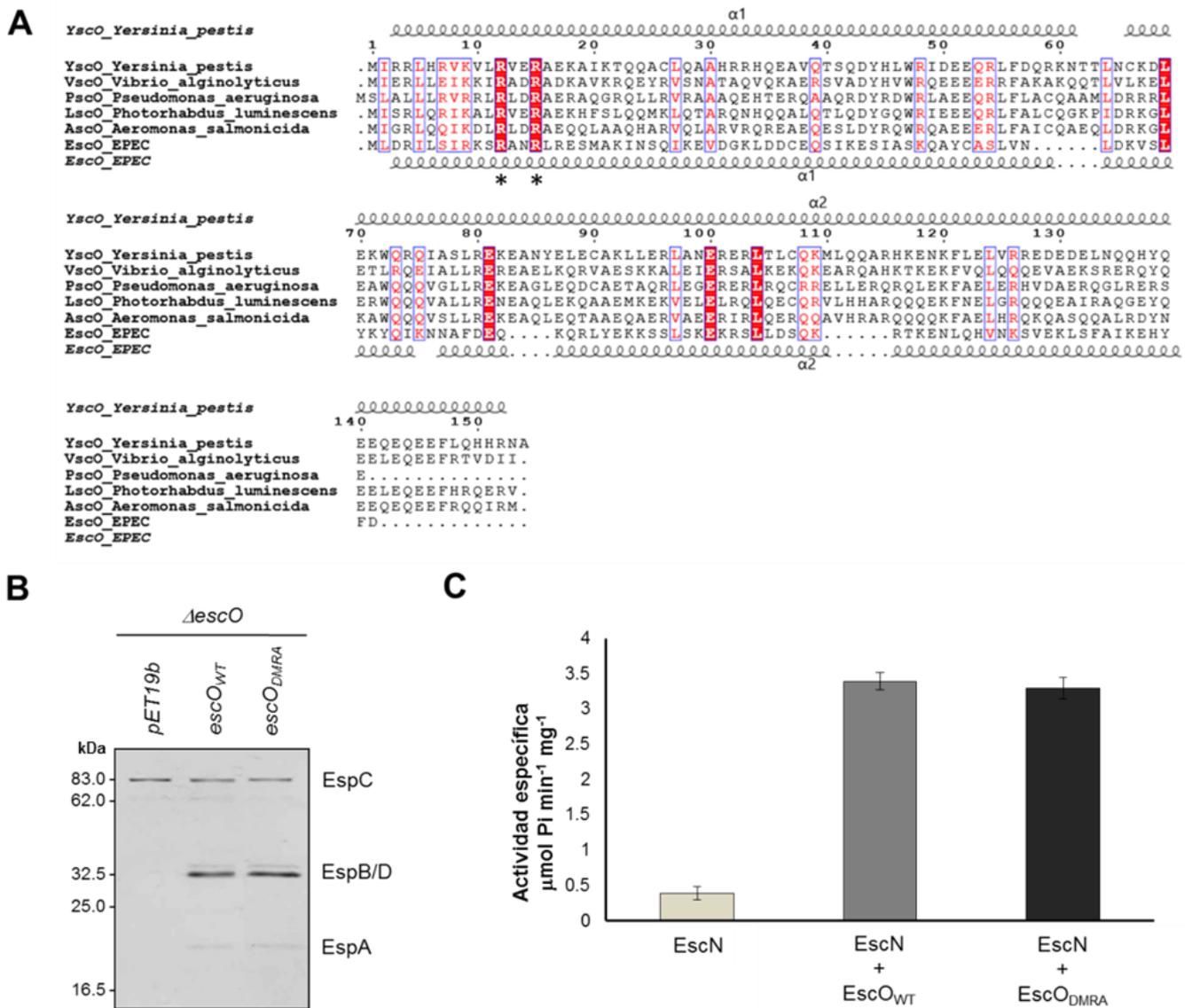


Figura 25. Importancia de las argininas 12 y 15 de EscO conservadas con los miembros de la familia YscO. A. Alineamiento múltiple de la proteína EscO con miembros pertenecientes a la familia YscO (Pfam 07321) en otros SST3. Los residuos de aminoácidos idénticos se encuentran enmarcados en un cuadro rojo mientras que los similares se muestran en letras rojas. La estructura secundaria predicha para EscO de EPEC y para YscO de *Yersinia pestis* (ambas compuestas predominantemente por alfa-hélices) se muestra sobre y por debajo del alineamiento, respectivamente. Las secuencias se alinearon usando el programa Muscle y la figura se generó usando ESPrpt2.2. B. Ensayo de complementación de la cepa *ΔescO* con las versiones *EscO_{WT}* y *EscO_{DMRA}* codificadas en pET19b. C. Actividad específica de EscN en presencia de *EscO_{WT}* y *EscO_{DMRA}*. Resultados obtenidos a partir de un ensayo de actividad con 0.25 μM EscN en presencia de 1.5 μM *EscO_{WT}* o *EscO_{DMRA}*.

La proteína EscO forma dímeros y la cisteína 52 les confiere estabilidad

Durante el proyecto de maestría demostramos que EscO forma dímeros resistentes a SDS (Romo-Castillo 2010). Para analizar la influencia de las cisteínas en la formación del dímero se obtuvieron mutaciones puntuales, sustituyendo la cisteína por serina. Se obtuvieron tanto las mutaciones sencillas (C37S, C52S) como una mutación doble en las dos cisteínas (DMCS). Se analizó la capacidad de estas mutantes de EscO de formar dímeros resistentes a SDS. Las proteínas recombinantes, etiquetadas con 10 histidinas, se purificaron por cromatografía de afinidad y se analizaron en geles de acrilamida con SDS en presencia y ausencia de 10% de β -mercaptoetanol. Los resultados obtenidos muestran que la cisteína 52 (EscO_{C52S}) y la doble mutante (EscO_{DMCS}) no forman dímeros resistentes a SDS, mientras que la mutante en la cisteína 37 (EscO_{C37S}) se comporta igual que la proteína silvestre (EscO_{WT}) (Figura 26). Estos resultados indican que la cisteína 52 es necesaria para la estabilización del dímero.

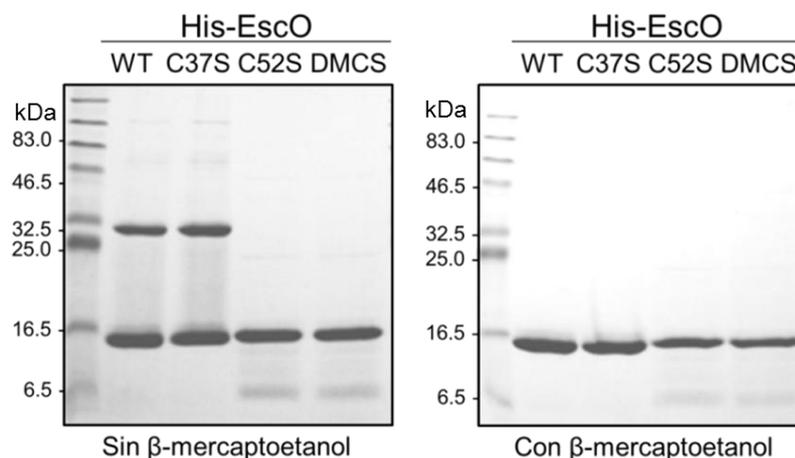


Figura 26. Oligomerización de las versiones de EscO mutantes en las cisteínas. 4.8 μ g de proteína analizados en ausencia y presencia de 10% β -mercaptoetanol. Monómero: 16 kDa, Dímero: 32 kDa. SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie.

Las proteínas mutantes de EscO en las cisteínas complementan la secreción de una cepa $\Delta escO$

Para poder conocer la importancia funcional de la oligomerización de EscO, se analizó la capacidad de las proteínas mutantes en las cisteínas de la proteína EscO en su capacidad de complementar la secreción en una cepa $\Delta escO$. Por medio de ensayos de secreción se analizó el fenotipo de la cepa mutante $\Delta escO$ complementada con los plásmidos pNEescO_{WT}, pMEescO_{C37S}, pMEescO_{C52S} y pMEescO_{DMCS}. Los resultados obtenidos indican que la oligomerización de EscO no tiene ningún efecto relevante sobre la secreción de sustratos, ya que todas las proteínas mutantes en las cisteínas complementan a la cepa $\Delta escO$ (Figura 27). Este resultado sugiere que la forma monomérica de EscO es suficiente para la funcionalidad de la proteína. Este resultado está acorde con la estequiometría sugerida para el complejo ATPasa del sistema flagelar, donde se propone que 6 subunidades de FliI se unen a una subunidad de FliJ (Ibuki, Imada et al. 2011). Esta estequiometría es la misma que posee el complejo $\alpha_3\beta_3\gamma$ en la F₀F₁ ATP-sintetasa.

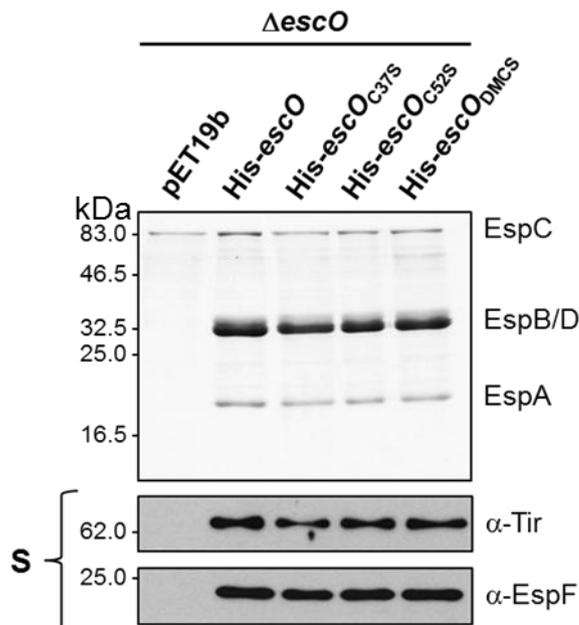


Figura 27. Complementación de la cepa $\Delta escO$ con las versiones de *EscO* mutantes en las cisteínas. Ensayo de secreción de proteínas en DMEM a 37°C con 0.5% de CO₂. Perfil de secreción de la cepa $\Delta escO$ complementada con pET19b, pMEescO_{WT}, pMEescO_{C37S}, pMEescO_{C52S} y pMEescO_{DMCS}. Las proteínas efectoras secretadas (S) se analizaron por inmunodetección tipo Western Blot utilizando anticuerpos policlonales anti-Tir y anti-EspF.

Las versiones mutantes de *EscO* en las cisteínas presentan un retraso sobre la activación de la ATPasa *EscN*

Debido a que las proteínas mutantes de *EscO* en las cisteínas de *EscO* complementan a la cepa $\Delta escO$, se analizó la capacidad tienen para sobreactivar a la ATPasa *EscN*. A través de ensayos de actividad de ATPasa se analizó la sobreactivación de *EscN* por las diferentes versiones de *EscO*. Los resultados muestran que estas proteínas mutantes en las cisteínas incrementaron la actividad específica de la ATPasa *EscN* al mismo nivel que la proteína silvestre (Figura 28A); sin embargo, las versiones mutantes que no forman dímeros (*EscO*_{C52S} y *EscO*_{DMCS}) presentaron un retraso sobre la activación de *EscN* (Figura 28B). Estos datos sugieren que la estabilidad del dímero es útil para la rápida sobreactivación de la ATPasa. Al realizar la mutación de cisteína 52 o al mutar ambas cisteínas, la estabilidad del dímero disminuye drásticamente (Figura 26). A

través del tiempo el dímero de EscO en estas versiones mutantes (EscO_{C52S} y EscO_{DMCS}) se forma, permitiendo una sobreactivación de la ATPasa. Sin embargo, serán necesarios más experimentos para poder definir la importancia de la dimerización de EscO en el proceso de activación de la ATPasa EscN.

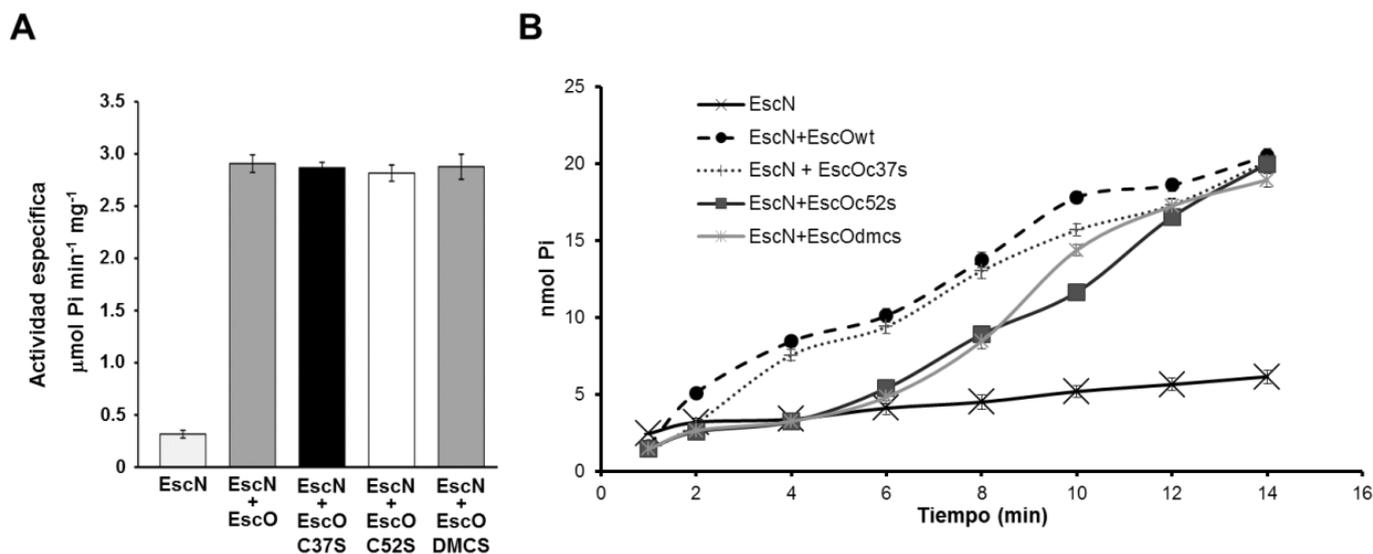


Figura 28. Activación de la ATPasa EscN por las versiones mutantes de EscO en las cisteínas. A. Actividad específica de EscN en presencia de las diferentes versiones mutantes de EscO en las cisteínas. B. Hidrólisis de ATP a través del tiempo de EscN en presencia de las versiones mutantes de EscO.

La cinética de secreción de efectores se modifica en la cepa $\Delta escO$ complementada con versiones de EscO afectadas en su dimerización

Con el fin de analizar si la falta de dimerización de las versiones de EscO mutantes en las cisteínas (EscO_{C52S} y EscO_{DMCS}) tenía algún efecto sobre la cinética de secreción de proteínas; se realizó un ensayo de secreción de la cepa $\Delta escO$ complementada con los plásmidos pNEscO_{WT}, y pMEscO_{C52S} a diferentes densidades ópticas (DO_{600nm} entre 0.4 y 0.8). Los resultados obtenidos mostraron que al complementar la cepa $\Delta escO$ con pMEscO_{C52S} hay un defecto en la jerarquía de secreción de algunas proteínas, ya que los efectores se comienzan a secretar a densidades ópticas

bajas, mientras que en la cepa $\Delta escO$ con $pME_{escO_{WT}}$ la secreción de estas proteínas se da a densidades ópticas altas (Figura 29). Este resultado indica que probablemente el dímero de EscO podría estar participando en la jerarquía de secreción de sustratos al interactuar con algunas de las proteínas de los interruptores moleculares encargados de retener a los efectores como son EspP, SepL o SepD (Deng, Li et al. 2005, Monjaras Feria, Garcia-Gomez et al. 2012).

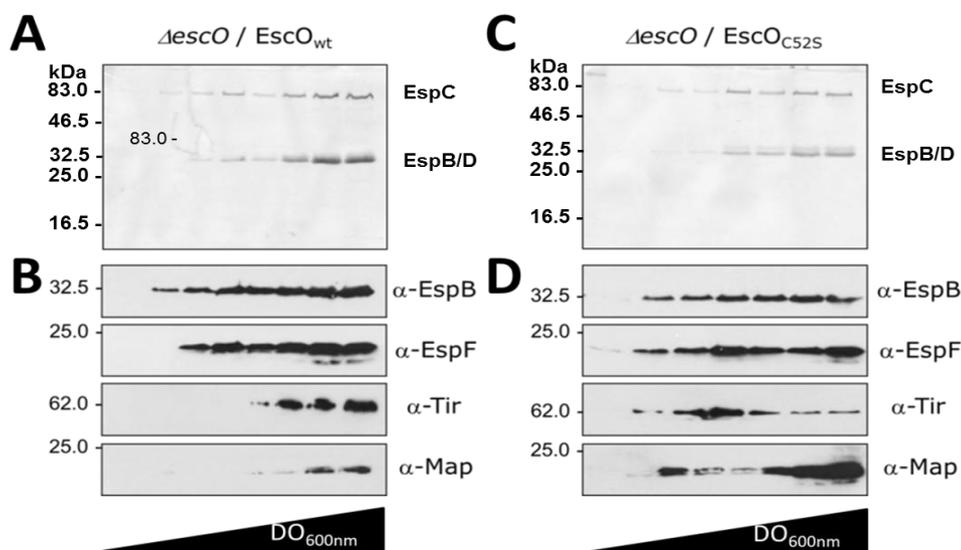


Figura 29. Cinética de secreción en la cepa $\Delta escO$ complementada con los plásmidos $pNE_{escO_{WT}}$, y $pME_{escO_{C52S}}$. A y C. Perfil de secreción analizado en SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. B y D. Inmunodetección tipo Western Blot utilizando como anticuerpo primario anti-EspB 1:35,000, anti-EspF 1:25,000, Anti-Tir 1:2,000 y anti-Map 1:20,000. Como anticuerpo secundario se utilizó GAR 1:10,000.

La proteína EscO no se localiza en el periplasma

Previamente se reportó que EscO se encuentra asociada a membrana, así como en la fracción periplásmica (Sal-Man, Biemans-Oldehinkel et al. 2012). Debido a la presencia de puentes disulfuro que son importantes en la dimerización de EscO, decidimos analizar la presencia de EscO en el periplasma así como la presencia de las diferentes formas de EscO (monómero-dímero) en este compartimento celular. Para realizar este experimento se realizó un

fraccionamiento celular parcial, aislando la fracción periplásmica mediante la formación de esferoplastos con sacarosa-lisozima-EDTA, como se ha reportado previamente (Garcia-Gomez, Espinosa et al. 2011). En la cepa mutante $\Delta escO$, se sobreprodujo tanto la proteína His-EscO como la proteína EscO-His. La presencia de ambas proteínas en las pastillas celulares se determinó por inmunodetección utilizando anticuerpos específicos anti-His. Como control de la pureza de la fracción periplásmica se analizó la ausencia de las proteínas citoplásmicas DnaK y CesT. Como control de la fracción periplásmica se utilizó la proteína de unión a maltosa MBP. Los resultados obtenidos mostraron que ni His-EscO, ni EscO-His se localizan en la fracción periplásmica de EPEC (Figura 30). Cabe mencionar que en el trabajo previamente publicado (Sal-Man, Biemans-Oldehinkel et al. 2012) utilizan a la proteína EscO etiquetada en la región C-terminal con 2 epítopes de Hemaglutinina (2HA), por lo que será necesario analizar la misma versión de EscO (EscO-2HA) para poder identificar si la presencia de esta proteína en la fracción periplásmica no se debe a un efecto producido por la presencia de dicha etiqueta en su región C-terminal. Al no poder identificar la versión silvestre de EscO en el periplasma, no se pudo analizar la presencia de formas oligoméricas.

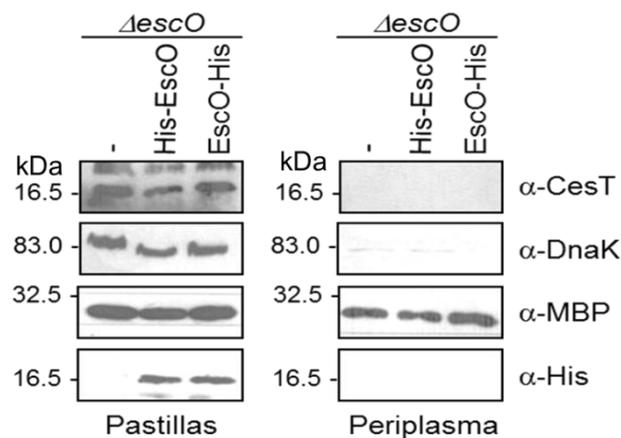


Figura 30. EscO no se localiza en el periplasma de EPEC. Pastillas celulares y fracción periplásmica de la mutante $\Delta escO$ complementada con las proteínas recombinantes His-EscO o EscO-His. Ambas fracciones se analizaron por inmunodetección tipo Western Blot utilizando anticuerpos específicos anti-CesT, anti-DnaK, anti-MBP y anti-His

Modelo de función de EscO

Analizando todos los resultados obtenidos durante este proyecto, en conjunto con los resultados encontrados en el sistema flagelar y los otros sistemas de virulencia, se propone el siguiente modelo sobre la función de EscO (Figura 31). En el citoplasma se forma un complejo entre EscN y EscL, en el cual EscL mantiene a la ATPasa EscN en un estado inactivo, hasta que la secreción de sustratos sea necesaria (Minamino and MacNab 2000, Blaylock, Riordan et al. 2006, Stone, Bulir et al. 2011, Chatterjee, Halder et al. 2013). Es poco probable que EscO interactúe con este complejo en el citoplasma, debido a que la actividad de EscN se des-reprime hasta niveles basales en presencia de EscL y EscO (Figura 19). El complejo EscN-EscL y EscO se reclutan de manera independiente en el anillo C (EscQ) previamente a la localización del complejo EscN-EscL-EscO en la puerta del aparato de exportación (Gonzalez-Pedrajo, Minamino et al. 2006, McMurry, Murphy et al. 2006, Biemans-Oldehinkel, Sal-Man et al. 2011, Cherradi, Hachani et al. 2014). La interacción de EscL con los componentes del aparato de exportación, como EscV (Zhu, Gonzalez-Pedrajo et al. 2002, Hara, Morimoto et al. 2012, Cherradi, Hachani et al. 2014), induce un cambio conformacional en EscL, el cual permite que EscO promueva la oligomerización de EscN y la estimulación de la actividad de ATPasa (Figura 16)(Ibuki, Imada et al. 2011). EscL funciona como el estator lateral de la ATP sintasa F_0F_1 , permitiendo la estable asociación del complejo EscN-EscL-EscO en la plataforma de exportación (Pallen, Bailey et al. 2006, Zarivach, Vuckovic et al. 2007, Ibuki, Imada et al. 2011, Hara, Morimoto et al. 2012, Kawamoto, Morimoto et al. 2013). El complejo sustrato-chaperona también se recluta en la plataforma (EscQ) antes de unirse al complejo ATPasa. Una vez que el complejo chaperona-sustrato se une al complejo ATPasa, la hidrólisis de ATP permite la disociación del complejo y el desplegamiento parcial del

sustrato para que pueda ser secretado a través del sistema (Gauthier and Finlay 2003, Thomas, Stafford et al. 2004, Akeda and Galan 2005, Lara-Tejero, Kato et al. 2011). Durante este proceso, la interacción de EscO con EscV (proteína del aparato de secreción) acopla la hidrólisis de ATP de EscN con la secreción de proteínas dirigida por la fuerza protón motriz (Thomas, Stafford et al. 2004, Minamino, Imada et al. 2011, Abrusci, Vergara-Irigaray et al. 2013, Ibuki, Uchida et al. 2013). Una vez que se lleva a cabo la hidrólisis de ATP, el complejo se disocia liberando a todas las proteínas en el citoplasma donde EscO se une a las chaperonas (Figura 11) para poder reciclarlas y facilitar el proceso de secreción.

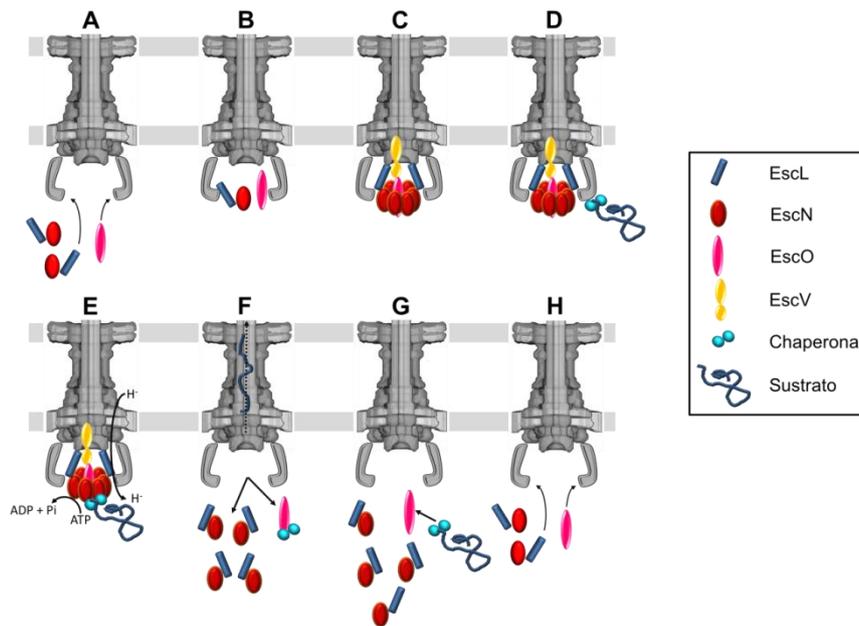


Figura 31. Modelo de la función de la proteína EscO. A. El complejo EscL-EscN se forma en el citoplasma. B. El complejo EscL-EscN y EscO se localizan independientemente en el anillo citoplásmico. C. La interacción de EscL con los componentes del aparato de exportación como EscV permite un cambio conformacional en la ATPasa EscN que posibilita su oligomerización y la interacción con EscO. D. El complejo chaperona-sustrato se localiza en el anillo citoplásmico antes de asociarse al complejo ATPasa (EscL-EscN-EscO). E. El complejo chaperona-sustrato se asocia al complejo, lo cual junto con el acoplamiento de la hidrólisis de ATP y la fuerza protón motriz dan lugar al proceso de secreción. La hidrólisis de ATP produce una disociación del complejo chaperona-sustrato, que permite la secreción del sustrato vía SST3. F. Una vez que la chaperona se encuentra libre es reclutada por EscO, mientras que los monómeros de EscN se asocian de nuevo en el citoplasma con los dímeros de EscL. G. EscO permanece unida a la chaperona hasta que se identifica al sustrato, el cual se encarga de desplazar a EscO, formando un nuevo complejo chaperona-sustrato y dejando a EscO libre en el citoplasma. H. El complejo EscL-EscN y EscO se vuelven a localizar en el anillo citoplásmico para comenzar otro ciclo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante este proyecto indican que EscO pertenece a la familia de proteínas que incluyen a FliJ, YscO, CdsO y Cpn0706. A pesar de no poseer una alta similitud de secuencia, EscO comparte diferentes características con estas proteínas, todas están codificadas por genes sinténicos (genes pequeños codificados río abajo del gen que codifica a la ATPasa y río arriba del gen que codifica a la regla molecular), posee una pequeña masa molecular (16 kDa), un punto isoeléctrico básico (10.1) y una estructura secundaria mayoritariamente alfa helicoidal con una alta predicción de formación de dominios *coiled-coil*. Estas proteínas son indispensables para la secreción ya que son proteínas que forman parte del aparato de exportación, en particular del complejo ATPasa.

A pesar de que la proteína EscO, al igual que sus equivalentes funcionales FliJ y YscO, desempeña múltiples funciones, tiene un papel esencial durante el proceso de secreción. Se ha propuesto que estas proteínas son las encargadas de funcionar como centro de oligomerización para el anillo hexamérico de la ATPasa y mantenerlo estable. En este trabajo se demostró que EscO interacciona con la ATPasa EscN (Figura 12) y produce sobreactivándola (Figura 16). Al complementar la cepa $\Delta escO$ con la proteína FliJ, no se restaura la secreción de proteínas y aunque la actividad de la ATPasa EscN se incrementa al doble en presencia de FliJ, no se sobreactiva como sucede en presencia de EscO (Figura 22). Estos resultados sugieren que la sobreactivación de la ATPasa es indispensable para que se lleve a cabo la secreción de proteínas vía SST3. Sin embargo, estudios posteriores se requerirán para confirmar la importancia de la sobreactivación de la ATPasa durante el proceso de secreción.

La dinámica de interacción entre las proteínas del complejo ATPasa (EscN, EscL y EscO) no se ha podido descifrar. Aparentemente también se requiere de la interacción de un cuarto elemento, que no se ha identificado aún, para poder definir el proceso de inhibición y activación de la ATPasa; ya que EscO es incapaz de sobreactivar a la ATPasa EscN en presencia de su inhibidor EscL (Figura 19).

Adicionalmente, se identificó la interacción de EscO con las proteínas chaperonas CesD, CesD2 y CesT (Figura 11). Este resultado una participación de EscO en el reciclaje de chaperonas, para favorecer la secreción de diversos sustratos durante la biogénesis y la secreción de proteínas vía SST3. Esta función también se ha propuesto para las proteínas FliJ y YscO (Evans, Stafford et al. 2006, Evans and Hughes 2009).

EscO es capaz de interaccionar con proteínas del sistema flagelar, entre las que se encuentra la ATPasa FliI, e incluso sobreactiva a esta ATPasa (Figura 21). A pesar de que se ha propuesto que ambos sistemas no coexisten *in vivo*, la importancia de esta posible intercomunicación entre el sistema flagelar y el de virulencia aún no se conoce.

La oligomerización de EscO no es importante para la sobreactivación de la ATPasa y la secreción de proteínas (Figura 27 y Figura 28). Sin embargo, al analizar el perfil de secreción de la cepa Δ escO complementada con las mutantes en las cisteínas, se observó un defecto en la jerarquía de

secreción de proteínas efectoras (Figura 29). Estos datos sugieren que la transición entre la forma dimérica y monomérica de EscO es importante para la interacción con las proteínas del switch, para que éstas funcionen de manera adecuada. Se requerirán más estudios para identificar la interacción de EscO con estas proteínas del switch para caracterizar la relevancia de la dimerización de la proteína EscO durante el proceso de secreción.

La localización periplásmica de EscO previamente reportada no se pudo corroborar (Figura 30), Por lo tanto, se requerirán más estudios para poder estudiar la importancia de la localización de EscO en el proceso de secreción, y la posible oligomerización de EscO en el periplasma.

Las argininas conservadas entre EscO y las proteínas de la familia YscO no son indispensables para su función (Figura 25). Sin embargo, hay que analizar la importancia de los otros residuos conservados encontrados entre estas proteínas.

APÉNDICE

Proteínas codificadas en LEE, equivalentes en otros SST3 y en la F₀F₁ ATPasa.

Función	EPEC	<i>Salmonella</i> (Flagelo)	<i>Salmonella</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Shigella</i>	F ₀ F ₁ ATPasa
?	Rorf1					
Efector: Altera red microtubulos	EspG				VirA	
Regulador positivo de LEE	Ler					
	Orf2					
Chaperona de EspA y EspB	CesAB					
?	Orf4					
Regulador ATPasa	EscL	FliH		YscL		δ y b
Aparato exportación	EscR	FliP	SpaP	YscR	Spa24	
Aparato exportación	EscS	FliQ	SpaQ	YscS	Spa9	
Aparato exportación	EscT	FliR	SpaR	YscT	Spa29	
Aparato exportación y switch 1	EscU	FlhB	SpaS	YscU	Spa40	
Transglicosilasa lítica	EtgA	FlgJ	IagB		IpgF	
Regulador negativo de Ler	GrlR					
Regulador positivo de Ler	GrlA					
ChaperonaEspA/B	CesD	SicA		SycD/LcrH	IpgC	
Secretina (membrana externa)	EscC		InvG	YscC	MxiD	
Switch 2	SepD					
Anillo membrana interna (lipoproteína)	EscJ	FliF	PrgK	YscJ	MxiJ	
Eje interno	EscI		PrgJ	YscI	MxiI	
Efector	EspZ					
Switch 2	Orf12					
Aparato exportación	EscV	FlhA	InvA	YscV/LrcD	MxiA	
ATPasa	EscN	FliI	InvC	YscN	Spa47	α y β
Complejo ATPasa	EscO	FliJ	InvI	YscO	Spa13	γ
Switch 1 y control longitud	EscP	FliK	InvJ	YscP	Spa32	
Anillo citoplásmico	EscQ	FliN	SpaO	YscQ	Spa33	
Efector	EspH					
Chaperona CesF	CesF					
Efector: Altera uniones estrechas	Map					
Receptor de intimina. Efector:Nucleación de actina.	Tir					
Chaperona : Tir,NleA	CesT					
Intimina	Eae					
Anillo membrana interna	EscD	FliG		YscD		
Switch 2	SepL		InvE	YopN/TyeA	MxiC	
Filamento	EspA	FliC		LcrV		
Translocon	EspD	SipB		YopB	IpaB	
Translocon	EspB	SipC		YopD		
Chaperona EspD	CesD2					
Aguja/gancho/pilus	EscF	FlgE	PrgI	YscF	MxiH	
Chaperona EspA	CesA2					
Efector:Altera filamentos intermedios y uniones estrechas	EspF					

REFERENCIAS

- Abrahams, J. P., A. G. Leslie, R. Lutter and J. E. Walker (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria." *Nature* **370**(6491): 621-628.
- Abrusci, P., M. Vergara-Irigaray, S. Johnson, M. D. Beeby, D. R. Hendrixson, P. Roversi, M. E. Friede, J. E. Deane, G. J. Jensen, C. M. Tang and S. M. Lea (2013). "Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus." *Nat Struct Mol Biol* **20**(1): 99-104.
- Akeda, Y. and J. E. Galan (2004). "Genetic analysis of the Salmonella enterica type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains." *J Bacteriol* **186**(8): 2402-2412.
- Akeda, Y. and J. E. Galan (2005). "Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion." *Nature* **437**(7060): 911-915.
- Alam, N. H. and H. Ashraf (2003). "Treatment of infectious diarrhea in children." *Paediatr Drugs* **5**(3): 151-165.
- Andrade, A., J. P. Pardo, N. Espinosa, G. Perez-Hernandez and B. Gonzalez-Pedrajo (2007). "Enzymatic characterization of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion ATPase EscN." *Arch Biochem Biophys* **468**(1): 121-127.
- Auvray, F., A. J. Ozin, L. Claret and C. Hughes (2002). "Intrinsic membrane targeting of the flagellar export ATPase FliI: interaction with acidic phospholipids and FliH." *J Mol Biol* **318**(4): 941-950.
- Berdichevsky, T., D. Friedberg, C. Nadler, A. Rokney, A. Oppenheim and I. Rosenshine (2005). "Ler is a negative autoregulator of the LEE1 operon in enteropathogenic Escherichia coli." *J Bacteriol* **187**(1): 349-357.
- Biemans-Oldehinkel, E., N. Sal-Man, W. Deng, L. J. Foster and B. B. Finlay (2011). "Quantitative proteomic analysis reveals formation of an EscL-EscQ-EscN type III complex in enteropathogenic Escherichia coli." *J Bacteriol* **193**(19): 5514-5519.
- Blaylock, B., K. E. Riordan, D. M. Missiakas and O. Schneewind (2006). "Characterization of the Yersinia enterocolitica type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL." *J Bacteriol* **188**(10): 3525-3534.
- Blocker, A., K. Komoriya and S. Aizawa (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, A. K. Veenendaal, P. Roversi, J. L. Hodgkinson, S. Johnson and S. M. Lea (2008). "What's the point of the type III secretion system needle?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(18): 6507-6513.
- Borriello, S. P., P. R. Murray and G. Funke (2005). *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections*.
- Boyer, P. D. (1997). "The ATP synthase--a splendid molecular machine." *Annu Rev Biochem* **66**: 717-749.
- Bustamante, V. H., F. J. Santana, E. Calva and J. L. Puente (2001). "Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic Escherichia coli: Ler antagonizes H-NS-dependent repression." *Mol Microbiol* **39**(3): 664-678.
- Caron, E., V. F. Crepin, N. Simpson, S. Knutton, J. Garmendia and G. Frankel (2006). "Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC." *Curr Opin Microbiol* **9**(1): 40-45.
- Claret, L., S. R. Calder, M. Higgins and C. Hughes (2003). "Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly." *Mol Microbiol* **48**(5): 1349-1355.
- Clarke, S. C., R. D. Haigh, P. P. Freestone and P. H. Williams (2002). "Enteropathogenic Escherichia coli infection: history and clinical aspects." *Br J Biomed Sci* **59**(2): 123-127.
- Cooper, C. A., K. Zhang, S. N. Andres, Y. Fang, N. A. Kaniuk, M. Hannemann, J. H. Brumell, L. J. Foster, M. S. Junop and B. K. Coombes (2010). "Structural and biochemical characterization of SrcA, a multi-cargo type III secretion chaperone in Salmonella required for pathogenic association with a host." *PLoS Pathog* **6**(2): e1000751.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." *Nat Rev Microbiol* **4**(11): 811-825.
- Creasey, E. A., D. Friedberg, R. K. Shaw, T. Umanski, S. Knutton, I. Rosenshine and G. Frankel (2003). "CesAB is an enteropathogenic Escherichia coli chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB." *Microbiology* **149**(Pt 12): 3639-3647.
- Chami, M., I. Guilvout, M. Gregorini, H. W. Remigy, S. A. Muller, M. Valerio, A. Engel, A. P. Pugsley and N. Bayan (2005). "Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core." *J Biol Chem* **280**(45): 37732-37741.

Chatterjee, R., P. K. Halder and S. Datta (2013). "Identification and molecular characterization of YsaL (Ye3555): a novel negative regulator of YsaN ATPase in type three secretion system of enteropathogenic bacteria *Yersinia enterocolitica*." PLoS One **8**(10): e75028.

Cherradi, Y., A. Hachani and A. Allaoui (2014). "Spa13 of *Shigella flexneri* has a dual role: chaperone escort and export gate-activator switch of the type III secretion system." Microbiology **160**(Pt 1): 130-141.

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.

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.

Deng, W., Y. Li, P. R. Hardwidge, E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, S. Lee, S. Gruenheid, N. C. Strynacka, J. L. Puente and B. B. Finlay (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., B. A. Vallance, Y. Li, J. L. Puente and B. B. Finlay (2003). "*Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice." Mol Microbiol **48**(1): 95-115.

DeVinney, R., D. G. Knochel and B. B. Finlay (1999). "Enteropathogenic *Escherichia coli*: cellular harassment." Curr Opin Microbiol **2**(1): 83-88.

Diepold, A., M. Amstutz, S. Abel, I. Sorg, U. Jenal and G. R. Cornelis (2010). "Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome." EMBO J **29**(11): 1928-1940.

Elliott, S. J., C. B. O'Connell, A. Koutsouris, C. Brinkley, M. S. Sonnenberg, G. Hecht and J. B. Kaper (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, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Melliss, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel and J. B. Kaper (2000). "The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*." Infect Immun **68**(11): 6115-6126.

Evans, L. D. and C. Hughes (2009). "Selective binding of virulence type III export chaperones by FliJ escort orthologues Invl and YscO." FEMS Microbiol Lett **293**(2): 292-297.

Evans, L. D., G. P. Stafford, S. Ahmed, G. M. Fraser and C. Hughes (2006). "An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17474-17479.

Evans, L. D. B., G. P. Stafford, S. Ahmed, G. M. Fraser and C. Hughes (2006). "An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(46): 17474-17479.

Fillingame, R. H., C. M. Angevine and O. Y. Dmitriev (2003). "Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase." FEBS Lett **555**(1): 29-34.

Fraser, G. M., B. Gonzalez-Pedrajo, J. R. Tame and R. M. Macnab (2003). "Interactions of FliJ with the *Salmonella* type III flagellar export apparatus." J Bacteriol **185**(18): 5546-5554.

Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang and I. Rosenshine (1999). "Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **34**(5): 941-952.

Galan, J. E. (2009). "Common themes in the design and function of bacterial effectors." Cell Host Microbe **5**(6): 571-579.

Garcia-Gomez, E., N. Espinosa, J. de la Mora, G. Dreyfus and B. Gonzalez-Pedrajo (2011). "The muramidase EtgA from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion." Microbiology **157**(Pt 4): 1145-1160.

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 and B. B. Finlay (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.

Gazi, A. D., M. Bastaki, S. N. Charova, E. A. Gkoukoulia, E. A. Kapellios, N. J. Panopoulos and M. Kokkinidis (2008). "Evidence for a coiled-coil interaction mode of disordered proteins from bacterial type III secretion systems." J Biol Chem **283**(49): 34062-34068.

Gendrin, C., S. Sarrazin, D. Bonnaffe, J. M. Jault, H. Lortat-Jacob and A. Dessen (2010). "Hijacking of the pleiotropic cytokine interferon-gamma by the type III secretion system of *Yersinia pestis*." PLoS One **5**(12): e15242.

Gibbons, C., M. G. Montgomery, A. G. Leslie and J. E. Walker (2000). "The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution." Nat Struct Biol **7**(11): 1055-1061.

Gietz, R. D. and R. H. Schiestl (1995). "Transforming yeast with DNA." Methods in Molecular and Cellular Biology **5**(5): 255-269.

Gonzalez-Pedrajo, B., G. M. Fraser, T. Minamino and R. M. Macnab (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.

Gonzalez-Pedrajo, B., T. Minamino, M. Kihara and K. Namba (2006). "Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export." Mol Microbiol **60**(4): 984-998.

Hara, N., Y. V. Morimoto, A. Kawamoto, K. Namba and T. Minamino (2012). "Interaction of the extreme N-terminal region of FliH with FliA is required for efficient bacterial flagellar protein export." J Bacteriol **194**(19): 5353-5360.

Hodgkinson, J. L., A. Horsley, D. Stabat, M. Simon, S. Johnson, P. C. da Fonseca, E. P. Morris, J. S. Wall, S. M. Lea and A. J. Blocker (2009). "Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout." Nat Struct Mol Biol **16**(5): 477-485.

Ibuki, T., K. Imada, T. Minamino, T. Kato, T. Miyata and K. Namba (2011). "Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases." Nat Struct Mol Biol **18**(3): 277-282.

Ibuki, T., M. Shimada, T. Minamino, K. Namba and K. Imada (2009). "Crystallization and preliminary X-ray analysis of FliJ, a cytoplasmic component of the flagellar type III protein-export apparatus from *Salmonella* sp." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **65**(Pt 1): 47-50.

Ibuki, T., Y. Uchida, Y. Hironaka, K. Namba, K. Imada and T. Minamino (2013). "Interaction between FliJ and FliA, components of the bacterial flagellar type III export apparatus." J Bacteriol **195**(3): 466-473.

Imada, K., T. Minamino, A. Tahara and K. Namba (2007). "Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1-ATPase subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(2): 485-490.

Iyoda, S., N. Koizumi, H. Satou, Y. Lu, T. Saitoh, M. Ohnishi and H. Watanabe (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.

Izore, T., V. Job and A. Dessen (2011). "Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system." Structure **19**(5): 603-612.

James, P., J. Halladay and E. A. Craig (1996). "Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast." Genetics **144**(4): 1425-1436.

Jarvis, K. G., J. A. Giron, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper (1995). "Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7996-8000.

Johnson, S. and A. Blocker (2008). "Characterization of soluble complexes of the *Shigella flexneri* type III secretion system ATPase." FEMS Microbiol Lett **286**(2): 274-278.

Jouihri, N., M. P. Sory, A. L. Page, P. Gounon, C. Parsot and A. Allaoui (2003). "MxiK and MxiN interact with the Spa47 ATPase and are required for transit of the needle components MxiH and MxiI, but not of Ipa proteins, through the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*." Mol Microbiol **49**(3): 755-767.

Kaper, J. B., J. P. Nataro and H. L. Mobley (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **2**(2): 123-140.

Kawamoto, A., Y. V. Morimoto, T. Miyata, T. Minamino, K. T. Hughes, T. Kato and K. Namba (2013). "Common and distinct structural features of *Salmonella* injectisome and flagellar basal body." Sci Rep **3**: 3369.

Kazetani, K., T. Minamino, T. Miyata, T. Kato and K. Namba (2009). "ATP-induced FliI hexamerization facilitates bacterial flagellar protein export." Biochem Biophys Res Commun **388**(2): 323-327.

Kinosita, K., Jr. (2012). "F(1)-ATPase: a prototypical rotary molecular motor." Adv Exp Med Biol **726**: 5-16.

Kishikawa, J., T. Ibuki, S. Nakamura, A. Nakanishi, T. Minamino, T. Miyata, K. Namba, H. Konno, H. Ueno, K. Imada and K. Yokoyama (2013). "Common evolutionary origin for the rotor domain of rotary ATPases and flagellar protein export apparatus." PLoS One **8**(5): e64695.

Kosek, M., C. Bern and R. L. Guerrant (2003). "The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000." Bull World Health Organ **81**(3): 197-204.

Kubori, T., S. Yamaguchi and S. Aizawa (1997). "Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins." *J Bacteriol* **179**(3): 813-817.

Lara-Tejero, M., J. Kato, S. Wagner, X. Liu and J. E. Galan (2011). "A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems." *Science* **331**(6021): 1188-1191.

Lee, P. C., S. E. Zmina, C. M. Stopford, J. Toska and A. Rietsch (2014). "Control of type III secretion activity and substrate specificity by the cytoplasmic regulator PcrG." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(19): E2027-2036.

Levine, M. M., E. S. Caplan, D. Waterman, R. A. Cash, R. B. Hornick and M. J. Snyder (1977). "Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin." *Infect Immun* **17**(1): 78-82.

Levine, M. M. and R. Edelman (1984). "Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis." *Epidemiol Rev* **6**: 31-51.

Lopez, A. D., C. D. Mathers, M. Ezzati, D. T. Jamison and C. J. Murray (2006). "Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data." *Lancet* **367**(9524): 1747-1757.

Lorenzini, E., A. Singer, B. Singh, R. Lam, T. Skarina, N. Y. Chirgadze, A. Savchenko and R. S. Gupta (2010). "Structure and protein-protein interaction studies on *Chlamydia trachomatis* protein CT670 (YscO Homolog)." *J Bacteriol* **192**(11): 2746-2756.

Mattei, P. J., E. Faudry, V. Job, T. Izore, I. Attree and A. Dessen (2011). "Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon." *FEBS J* **278**(3): 414-426.

McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper (1995). "A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5): 1664-1668.

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.

McMurry, J. L., J. W. Murphy and B. Gonzalez-Pedrajo (2006). "The FliN-FliH interaction mediates localization of flagellar export ATPase FliI to the C ring complex." *Biochemistry* **45**(39): 11790-11798.

Mellies, J. L., S. J. Elliott, V. Sperandio, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper (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., K. R. Haack and D. C. Galligan (2007). "SOS regulation of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **189**(7): 2863-2872.

Minamino, T. (2013). "Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway." *Biochim Biophys Acta*.

Minamino, T., R. Chu, S. Yamaguchi and R. M. Macnab (2000). "Role of FliJ in flagellar protein export in *Salmonella*." *J Bacteriol* **182**(15): 4207-4215.

Minamino, T., B. Gonzalez-Pedrajo, M. Kihara, K. Namba and R. M. Macnab (2003). "The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH." *J Bacteriol* **185**(13): 3983-3988.

Minamino, T., K. Imada, M. Kinoshita, S. Nakamura, Y. V. Morimoto and K. Namba (2011). "Structural insight into the rotational switching mechanism of the bacterial flagellar motor." *PLoS Biol* **9**(5): e1000616.

Minamino, T., K. Kazetani, A. Tahara, H. Suzuki, Y. Furukawa, M. Kihara and K. Namba (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., M. Kinoshita, K. Imada and K. Namba (2012). "Interaction between FliI ATPase and a flagellar chaperone FliT during bacterial flagellar protein export." *Mol Microbiol* **83**(1): 168-178.

Minamino, T. and R. M. MacNab (2000). "FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity." *Mol Microbiol* **37**(6): 1494-1503.

Minamino, T. and R. M. MacNab (2000). "Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates." *Mol Microbiol* **35**(5): 1052-1064.

Minamino, T., Y. V. Morimoto, N. Hara and K. Namba (2011). "An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export." *Nat Commun* **2**: 475.

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., S. D. Yoshimura, Y. V. Morimoto, B. Gonzalez-Pedrajo, N. Kami-Ike and K. Namba (2009). "Roles of the extreme N-terminal region of FliH for efficient localization of the FliH-FliI complex to the bacterial flagellar type III export apparatus." *Mol Microbiol* **74**(6): 1471-1483.

Mnatsakanyan, N., J. A. Hook, L. Quisenberry and J. Weber (2009). "ATP synthase with its gamma subunit reduced to the N-terminal helix can still catalyze ATP synthesis." *J Biol Chem* **284**(39): 26519-26525.

Monjaras Feria, J., E. Garcia-Gomez, N. Espinosa, T. Minamino, K. Namba and B. Gonzalez-Pedrajo (2012). "Role of EscP (Orf16) in injectisome biogenesis and regulation of type III protein secretion in enteropathogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **194**(22): 6029-6045.

Moore, W. E. and L. V. Holdeman (1974). "Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians." *Appl Microbiol* **27**(5): 961-979.

Mueller, C. A., P. Broz and G. R. Cornelis (2008). "The type III secretion system tip complex and translocon." *Mol Microbiol* **68**(5): 1085-1095.

Muller, S. A., C. Pozidis, R. Stone, C. Meesters, M. Chami, A. Engel, A. Economou and H. Stahlberg (2006). "Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN." *Mol Microbiol* **61**(1): 119-125.

Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." *Clin Microbiol Rev* **11**(1): 142-201.

Nataro, J. P. and J. Martinez (1998). "Diagnosis and Investigation of Diarrheagenic *Escherichia coli*." *Methods Mol Med* **15**: 387-406.

Neter, E., O. Westphal, O. Luderitz, R. M. Gino and E. A. Gorzynski (1955). "Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages." *Pediatrics* **16**(6): 801-808.

Noji, H., R. Yasuda, M. Yoshida and K. Kinosita, Jr. (1997). "Direct observation of the rotation of F1-ATPase." *Nature* **386**(6622): 299-302.

Ohnishi, K., F. Fan, G. J. Schoenhals, M. Kihara and R. M. Macnab (1997). "The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly." *J Bacteriol* **179**(19): 6092-6099.

Ohnishi, K., Y. Ohto, S. Aizawa, R. M. Macnab and T. Iino (1994). "FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **176**(8): 2272-2281.

Omote, H., N. Sambonmatsu, K. Saito, Y. Sambongi, A. Iwamoto-Kihara, T. Yanagida, Y. Wada and M. Futai (1999). "The gamma-subunit rotation and torque generation in F1-ATPase from wild-type or uncoupled mutant *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 7780-7784.

Pallen, M. J., C. M. Bailey and S. A. Beatson (2006). "Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases." *Protein Sci* **15**(4): 935-941.

Pozidis, C., A. Chalkiadaki, A. Gomez-Serrano, H. Stahlberg, I. Brown, A. P. Tampakaki, A. Lustig, G. Sianidis, A. S. Politou, A. Engel, N. J. Panopoulos, J. Mansfield, A. P. Pugsley, S. Karamanou and A. Economou (2003). "Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization." *J Biol Chem* **278**(28): 25816-25824.

Radics, J., L. Konigsmaier and T. C. Marlovits (2014). "Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action." *Nat Struct Mol Biol* **21**(1): 82-87.

Rodriguez-Angeles, G. (2002). "[Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*]." *Salud Publica Mex* **44**(5): 464-475.

Romo-Castillo, M. (2010). Estudio del papel de la proteína Orf15 codificada en la isla de patogenicidad LEE de *Escherichia coli* enteropatógena. Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental), Universidad Nacional Autónoma de México.

Ryu, J. and R. J. Hartin (1990). "Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2." *Biotechniques* **8**(1): 43-45.

Sal-Man, N., E. Biemans-Oldehinkel, D. Sharon, M. A. Croxen, R. Scholz, L. J. Foster and B. B. Finlay (2012). "EscA is a crucial component of the type III secretion system of enteropathogenic *E. coli*." *J Bacteriol*.

Sal-Man, N., E. Biemans-Oldehinkel, D. Sharon, M. A. Croxen, R. Scholz, L. J. Foster and B. B. Finlay (2012). "EscA is a crucial component of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **194**(11): 2819-2828.

Sambrook, J. R., David W.; (2001). Molecular cloning : a laboratory manual New York, USA.

Schraedt, O., M. D. Lefebvre, M. J. Brunner, W. H. Schmied, A. Schmidt, J. Radics, K. Mechtler, J. E. Galan and T. C. Marlovits (2010). "Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components." *PLoS Pathog* **6**(4): e1000824.

Sockett, H., S. Yamaguchi, M. Kihara, V. M. Irikura and R. M. Macnab (1992). "Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **174**(3): 793-806.

Sperandio, V., J. L. Mellies, R. M. Delahay, G. Frankel, J. A. Crawford, W. Nguyen and J. B. Kaper (2000). "Activation of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler." Mol Microbiol **38**(4): 781-793.

Sperandio, V., J. L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin and J. B. Kaper (1999). "Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15196-15201.

Spreter, T., C. K. Yip, S. Sanowar, I. Andre, T. G. Kimbrough, M. Vuckovic, R. A. Pfuetzner, W. Deng, A. C. Yu, B. B. Finlay, D. Baker, S. I. Miller and N. C. Strynadka (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.

Stone, C. B., D. C. Bulir, C. A. Emdin, R. M. Pirie, E. A. Porfilio, J. W. Sloatstra and J. B. Mahony (2011). "Chlamydia Pneumoniae CdsL Regulates CdsN ATPase Activity, and Disruption with a Peptide Mimetic Prevents Bacterial Invasion." Front Microbiol **2**: 21.

Stone, C. B., D. L. Johnson, D. C. Bulir, J. D. Gilchrist and J. B. Mahony (2008). "Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN (Cpn0707) of Chlamydomydia pneumoniae." J Bacteriol **190**(20): 6580-6588.

Su, M. S., H. C. Kao, C. N. Lin and W. J. Syu (2008). "Gene l0017 encodes a second chaperone for EspA of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157 : H7." Microbiology **154**(Pt 4): 1094-1103.

Thomas, J., G. P. Stafford and C. Hughes (2004). "Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(11): 3945-3950.

Uchihashi, T., R. Iino, T. Ando and H. Noji (2011). "High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F(1)-ATPase." Science **333**(6043): 755-758.

Vidal, J. E., A. Canizalez-Roman, J. Gutierrez-Jimenez and F. Navarro-Garcia (2007). "[Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic Escherichia coli]." Salud Publica Mex **49**(5): 376-386.

Wagner, S., L. Konigsmair, M. Lara-Tejero, M. Lefebvre, T. C. Marlovits and J. E. Galan (2010). "Organization and coordinated assembly of the type III secretion export apparatus." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(41): 17745-17750.

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, H. and G. Oster (1998). "Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase." Nature **396**(6708): 279-282.

WHO (2005). The treatment of Diarrhoea: a manual for physicians and other senior health workers. Geneva, World Health Organization.

Wong, A. R., J. S. Pearson, M. D. Bright, D. Munera, K. S. Robinson, S. F. Lee, G. Frankel and E. L. Hartland (2011). "Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli: even more subversive elements." Mol Microbiol **80**(6): 1420-1438.

Yamaguchi, S., H. Fujita, K. Sugata, T. Taira and T. Iino (1984). "Genetic analysis of H2, the structural gene for phase-2 flagellin in Salmonella." J Gen Microbiol **130**(2): 255-265.

Yona-Nadler, C., T. Umanski, S. Aizawa, D. Friedberg and I. Rosenshine (2003). "Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli." Microbiology **149**(Pt 4): 877-884.

Zarivach, R., M. Vuckovic, W. Deng, B. B. Finlay and N. C. Strynadka (2007). "Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system." Nat Struct Mol Biol **14**(2): 131-137.

Zhang, Y. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction." BMC Bioinformatics **9**: 40.

Zhu, K., B. Gonzalez-Pedrajo and R. M. Macnab (2002). "Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of Salmonella." Biochemistry **41**(30): 9516-9524.