



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**INTERACCIONES *IN VIVO* DE LA PROTEÍNA ESCO CON COMPONENTES
CITOPLÁSMICOS DEL INYECTISOMA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Octavio Augusto Ontiveros Vivanco



CDMX

2022



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M EN C. Castellanos Román Luz del Carmen
VOCAL: DR. Escalante Lozada José Adelfo
SECRETARIO: DRA. González Pedrajo Bertha María Josefina
1er. SUPLENTE: DRA. Dimitrova Dinkova Tzvetanka
2° SUPLENTE: DRA. Plett Torres Tanya

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MOLECULAR, DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN BÁSICA,
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, C.U. UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo

SUSTENTANTE:

Octavio Augusto Ontiveros Vivanco

Agradecimientos

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

Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo de los donativos IN212420 de la DGAPA, UNAM y 284081 del CONACyT.

Al bioterio del Instituto de Fisiología Celular y en particular al M.V.Z Héctor Malagón Rivero por el apoyo técnico para la generación de los anticuerpos policlonales.

A la Dra. Laura Ongay Larios, Biól. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por su apoyo técnico.

Al Biól. Gerardo Coello Coutiño, Ing. Juan Barbosa Castillo e Ing. Ivette Rosas Arciniega de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular por su apoyo técnico.

Agradezco la beca que me fue otorgada del donativo DGAPA a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, proyecto IN212420

Índice

Resumen.....	6
Introducción.....	7
➤ Epidemiología.....	7
➤ <i>Escherichia coli</i>	8
➤ <i>Escherichia coli</i> enteropatógena. Descubrimiento y patogénesis.....	10
➤ Locus de eliminación del enterocito (LEE).	14
➤ Sistema de Secreción Tipo III (SST3).	18
➤ Interruptores moleculares.....	27
➤ Chaperonas del sistema de secreción tipo III.....	30
Antecedentes	33
➤ FliJ es el análogo de EscO en el SST3 flagelar en <i>Salmonella</i>	33
➤ Análogos funcionales de EscO en diferentes patógenos.	36
➤ EscO.....	39
Hipótesis.....	42
Objetivos	42
Materiales y métodos	42
➤ Doble híbrido en levadura	46
➤ Inducción de proteínas	48
➤ Purificación de proteínas	49
➤ Diálisis, concentración y cuantificación de proteínas purificadas	50
➤ Transformación y purificación de plásmidos.....	50
➤ Ensayo de secreción	51
➤ Inmunodetección Western Blot.....	53
➤ Esquema de Inmunización.	53

Resultados	54
➤ Purificación de las construcciones para el ensayo de doble híbrido en levadura.....	54
➤ EscO no interacciona con CesT en el ensayo de doble híbrido en levadura.	54
➤ EscO no interacciona con EscK en el ensayo de doble híbrido en levadura.	57
➤ EscO y EscQ interaccionan en el ensayo de doble híbrido en levadura.	59
Herramientas moleculares generadas en este estudio	60
➤ Amplificación de un fragmento del gen <i>espD_C</i>	60
➤ Clonación del fragmento de <i>espD</i> en el vector pMiniT2.	60
➤ Subclonación de <i>espD_C</i> en el vector pTrcHisA.....	61
➤ Predicción del peso molecular del carboxilo terminal de EspD (EspD _C).	63
➤ Purificación de His-EspD _C mediante una cromatografía de afinidad.	64
➤ Inmunodetección de EspD con anticuerpo policlonal anti – EspD.....	66
Discusión.....	67
Conclusiones.....	74
Perspectivas.....	74
Referencias	75

Resumen

El sistema de secreción tipo III (SST3) o inyectisoma es una maquinaria nanomolecular formada por más de veinte proteínas y utilizada exclusivamente por bacterias Gram-negativas, principalmente patogénicas. Estos patógenos utilizan el SST3 para translocar proteínas de virulencia e infectar a sus respectivos hospederos. Uno de estos microorganismos es *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), siendo un patotipo de *E. coli* que coloniza el intestino delgado del humano, en donde infecta a los enterocitos y forma una lesión característica denominada lesión de adherencia y eliminación (lesión A/E). El SST3 está codificado en el Locus de Eliminación del Enterocito (LEE), una isla de patogenicidad cromosomal en donde están codificados todos los componentes necesarios para formar un SST3 funcional. Uno de estos componentes es la proteína EscO, que forma el tallo central de la ATPasa EscN, y tiene la función de activar a esta enzima para energizar correctamente el proceso de secreción de sustratos. Se ha observado en el SST3 de otros patógenos que las proteínas análogas a EscO tienen interacción con componentes citoplasmáticos del inyectisoma y con proteínas del aparato de exportación.

En este estudio se identificó, a través del ensayo de doble híbrido en levadura, que EscO es capaz de interactuar con EscQ, componente principal de la plataforma de clasificación de sustratos en EPEC. También se determinó que en este ensayo EscO y EscK, proteína adaptadora de la plataforma de clasificación, no son capaces de interactuar. La chaperona molecular CesT tampoco fue capaz de interactuar con EscO en el ensayo de doble híbrido en levadura. Estos resultados se deben corroborar mediante ensayos *in vitro* como lo es la co-purificación tipo pull-down.

Con base en nuestros resultados y en lo reportado en la literatura, sugerimos que que la proteína EscO concentra a las chaperonas y probablemente a los complejos chaperona-sustrato en la plataforma de clasificación en la base del inyectisoma.

Introducción

➤ Epidemiología

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2017) la diarrea está definida como la deposición de heces sueltas o líquidas, tres o más veces al día, o con una frecuencia mayor que la normal para la persona. Esto es el resultado de la alteración en la absorción y/o secreción de agua y electrolitos en el tracto gastrointestinal. Aplicando criterios de duración, se clasifica como aguda o crónica; se considera diarrea aguda cuando se presenta con una duración menor a 4 semanas y una duración mayor a 4 semanas es indicativo de una diarrea crónica (Corinaldesi et al., 2012). Además, este padecimiento puede presentar sangre en las heces líquidas. Esto es ocasionado por diferentes razones entre las más importantes se encuentra el cáncer de colon, la enfermedad de Crohn e infecciones bacterianas (ocasionadas por *Shigella*, *E.coli* O157:H7 y *Yersinia*, entre otras) (Corinaldesi et al., 2012).

En 2015 se estimó una morbilidad por enfermedades diarreicas de 2.3 billones y una mortalidad de 1.3 millones de personas mundialmente. Además, se determinó que aproximadamente 499 000 muertes fueron de niños menores a cinco años, siendo este el grupo de edad más afectado (Kotloff, 2017); lo anterior es consistente con datos obtenidos en un estudio realizado en el 2010 donde este grupo de edad también fue el grupo más afectado por enfermedades diarreicas (Croxen et al., 2013) (Figura 1). En México, las enfermedades diarreicas siguen siendo un problema de salud pública nacional. En 2010, se registraron más de 5.5 millones de casos con una incidencia de 5264.24 casos por cada 100 000 habitantes, donde la mayoría se presentaron en niños (Patzí-Vargas et al., 2015). Además, se determinó a los agentes etiológicos más importantes en países de bajos ingresos y son los rotavirus y los diferentes patotipos de *Escherichia coli* (OMS, 2017).

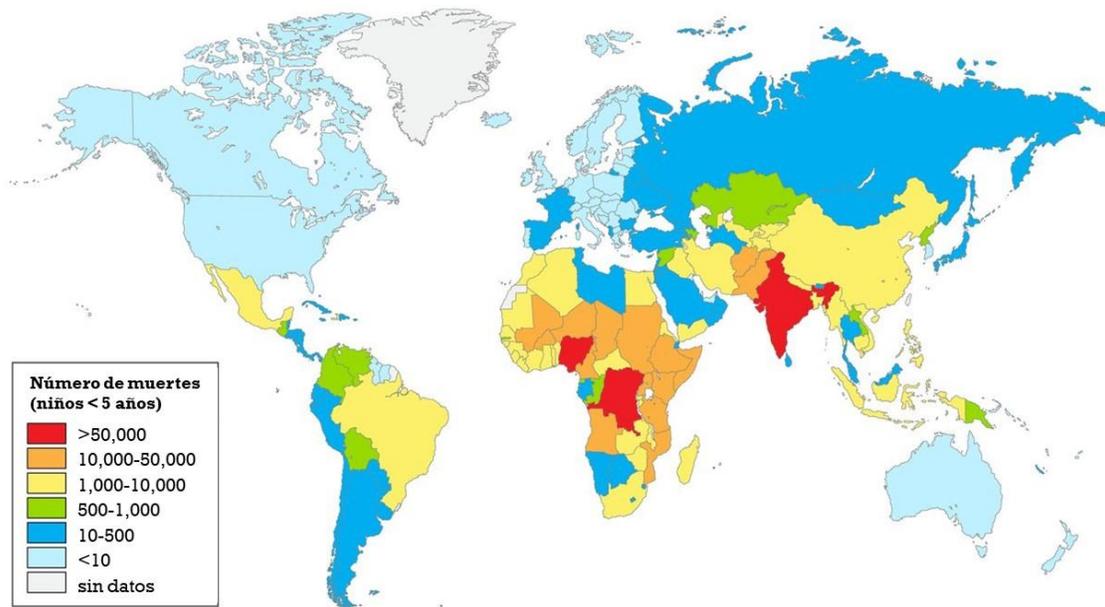


Figura 1. Mortalidad mundial por diarrea en niños menores a 5 años durante el 2010. En colores se representan los estimados de la mortalidad en niños menores a cinco años reflejando una elevada tasa de mortalidad en África y el sur de Asia (Croxen et al., 2013).

➤ *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, localizado taxonómicamente dentro de la subdivisión gamma del filo *Proteobacteria*. *E. coli* es uno de los organismos modelo mejor caracterizados. La cepa de referencia *E. coli* K-12 y sus derivados han sido claves para el avance de la genética, biología molecular, fisiología y bioquímica (Tenailon et al., 2010).

E. coli es una bacteria Gram-negativa anaerobia facultativa que no presenta esporas, además es un habitante común de los intestinos y heces de animales de sangre caliente y reptiles. En el intestino las bacterias anaerobias superan a *E. coli* desde 100 hasta 10000 veces, aun así, *E. coli* es el organismo aerobio predominante del tracto gastrointestinal. Debido a que *E. coli* se puede encontrar en el agua y el sedimento, es comúnmente utilizado como indicador de contaminación

fecal en el agua; se ha estimado que la mitad de la población de *E. coli* se presenta en estos hábitats secundarios. En el tracto digestivo las cepas de *E. coli* se localizan en el intestino grueso, especialmente en el ciego y colon. La relación entre *E. coli* y su hospedero se comprende como comensalismo, puesto que uno de los dos organismos se ve beneficiado por la interacción entre ellos, pero también se ha considerado que se trata de una relación simbiótica, donde *E. coli* explota su habilidad de utilizar eficientemente el gluconato en el colon obteniendo una ventaja metabólica en este nicho (Kaper et al., 2004). También *E. coli* es capaz de producir las vitaminas B y K para el hospedero (Burger et al., 1942). Las cepas de *E. coli* obtienen del hospedero una fuente constante de nutrientes, un ambiente estable y protección contra fuentes de estrés, también a través del hospedero la bacteria es transportada y diseminada (Tenaillon et al., 2010).

Algunas cepas de *E. coli* han evolucionado y se han adaptado a un tipo de vida patogénico, ocasionando diferentes enfermedades. Dependiendo de estas patologías, las cepas patógenas se han dividido en intestinales y extraintestinales. Las dos categorías se han subdividido en diferentes patotipos, donde un patotipo se define como un grupo de cepas de una misma especie con ciertas características patogénicas. La clasificación de cada patotipo está basada en la manifestación clínica de la enfermedad que ocasionan, los factores de virulencia y el antecedente filogenético (Leimbach et al., 2013).

La adquisición de genes a través de transferencia horizontal junto con la recombinación homóloga y eventos de reducción del genoma, son los responsables de gran parte de la flexibilidad genética de la especie. Los elementos móviles son los que permiten la transferencia horizontal de genes. De esta manera, los vectores para la transferencia entre cepas son plásmidos, fagos, islas genómicas o DNA cromosomal a través de la conjugación, transducción o transformación natural, respectivamente. Así, la transferencia horizontal de genes es importante para la propagación de factores de virulencia entre cepas (Leimbach et al., 2013).

De esta manera, las cepas de *E. coli* que ocasionan enfermedades diarreicas en los humanos se han clasificado en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E.*

coli enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Pearson, Giogha, Wong Fok Lung, & Hartland, 2016).

➤ *Escherichia coli* enteropatógena. Descubrimiento y patogénesis.

EPEC fue la primera cepa de *E. coli* que se consideró la responsable de brotes de diarrea infantil (a la cual se le denominó diarrea de verano) en los años 40s y 50s (Bray, 1945). Puesto que *E. coli* es un integrante de la microbiota intestinal, las metodologías bacteriológicas estándar no podían diferenciar entre las cepas patógenas de las comensales en un paciente con diarrea de verano. Usando anticuerpos contra *E. coli* producidos en un infante con diarrea de verano se logró distinguir entre las cepas que ocasionaban la enfermedad y las que eran parte de la microbiota (Bray & Beavan, 1948). En 1955, se acuñó el término *E. coli* enteropatógena (EPEC) para describir a las cepas de *E. coli* que eran patógenos intestinales y raramente se encontraban en pacientes sanos (Neter, E. ; Westphal, O. ; Lüderitz, O. ; Gino, Rosalie M. ; Gorzynski, 1955). Fue en la década de los 80s en la que se reportó una histopatología intestinal distintiva que es caracterizada por la eliminación de las microvellosidades del epitelio intestinal, la cual se asoció directamente con EPEC y se denominó lesión de adherencia y eliminación (lesión A/E) (H W Moon, S C Whipp, R A Argenzio, M M Levine, R A Giannella, 1983). Además, usando un microscopio electrónico se observó como EPEC provoca que la membrana de la célula epitelial se eleve aproximadamente 10 µm en la forma característica de un pedestal, debido a la acumulación de actina (Rosenshine et al., 1996). Otras proteínas del citoesqueleto fueron identificadas en los pedestales mediante inmunofluorescencia, como alfa actinina, talina, VASP, WASP y el complejo Arp 2/3 (Deborah Chen & Frankel, 2005).

Los estudios sobre EPEC se continuaron para determinar las etapas de su patogénesis (Deborah Chen & Frankel, 2005). De esta manera, se estableció que la patogenicidad de este microorganismo se puede dividir en tres etapas. Primero, la bacteria se adhiere y coloniza el intestino delgado; segundo, se lleva a cabo la translocación de efectores de virulencia desde la bacteria a la célula eucarionte, con

la consecuente modificación en las vías de transducción de señales, provocando rearrreglos en el citoesqueleto del enterocito; y, por último, la adherencia íntima entre la bacteria y la célula eucarionte debido a la presencia de la adhesina intimina en la membrana externa de EPEC (codificada por el gen *eae*) (Bardiau et al., 2010).

En la primera etapa, EPEC puede adherirse al huésped de una manera localizada debido a la acción de un pili tipo IV denominado BFP (bundle forming pilus) (Gaytán et al., 2016). El gen *bfpA* codifica para la subunidad principal del BFP, el cual también puede crear una red de fibras que unen bacterias individuales entre ellas. Este gen es parte de un operón de 14 genes ubicado en un plásmido denominado el factor de adherencia de EPEC o, por sus singlas en inglés, EAF. El grupo de genes *bfp* está regulado por señales ambientales como la temperatura y concentraciones de calcio y amonio. La fimbria BFP contribuye a la unión de la bacteria con las células eucariontes, pero no es estrictamente necesaria para causar la enfermedad en humanos. De hecho, cepas de EPEC sin el gen *bfpA* se han visto implicadas en brotes de diarrea en el mundo (Bardiau et al., 2010). De esta manera se ha subdividido a las cepas de EPEC como típicas o atípicas dependiendo de la presencia o ausencia del gen *bfp*, donde las cepas positivas para el gen que codifica a la intimina (*eae*) y el BFP (*bfpA*) y negativas para el gen que codifica la toxina Shiga (*stx*) (la cual define a EHEC) son consideradas EPEC típicas (*eae*⁺, *bfpA*⁺ y *stx*⁻) y las cepas EPEC atípicas son negativas para el gen *bfpA* y *stx*, además de ser positivas para *eae* (*eae*⁺, *bfpA*⁻ y *stx*⁻) (Pearson et al., 2016).

En la segunda etapa, la bacteria interfiere con varias cascadas de señalización en la célula hospedera a través de la inyección de proteínas efectoras de virulencia, las cuales son translocadas al citoplasma de la célula eucarionte mediante la acción del sistema de secreción tipo III (SST3). EPEC inyecta al menos 22 proteínas efectoras las cuales interfieren con funciones del citoesqueleto, inhiben el transporte de iones y afectan la función de la barrera epitelial (Gaytán et al., 2016) (Figura 2A).

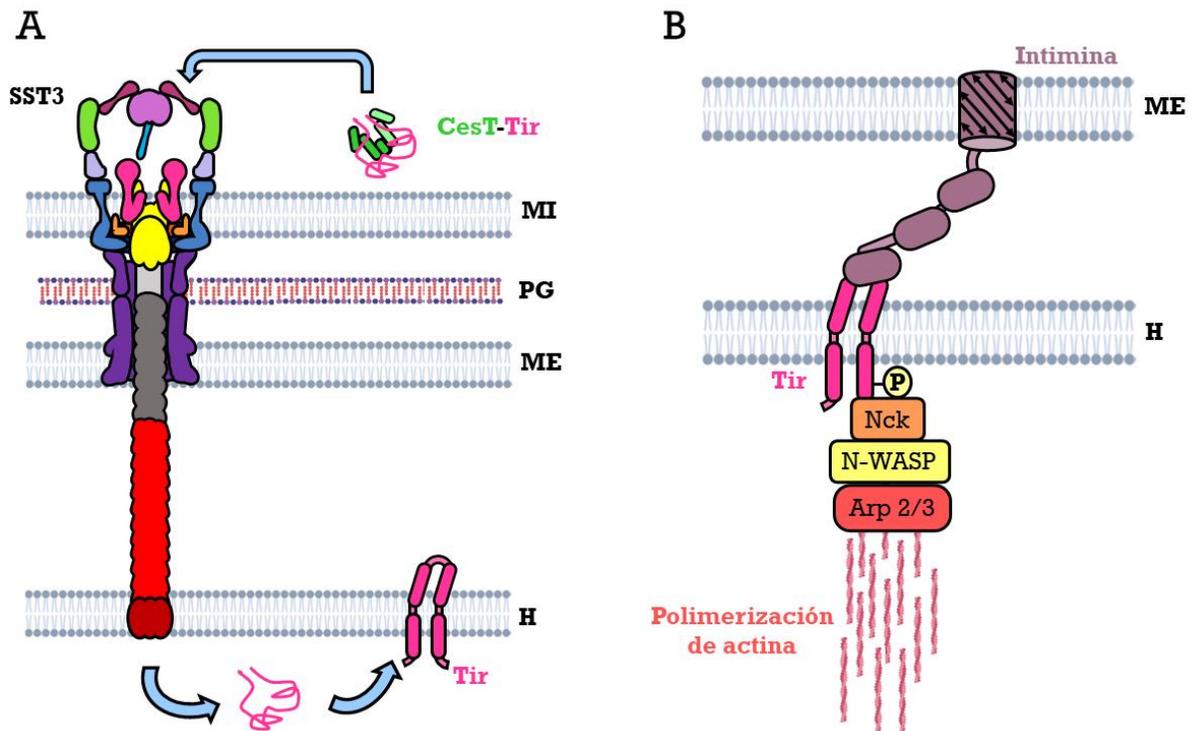


Figura 2. Translocación de efectores y adherencia íntima de *Escherichia coli* enteropatógena. A) En la translocación de efectores, complejos chaperona-sustrato (como CesT-Tir) se dirigen hacia la base del inyectisoma para que los efectores sean secretados. Una vez translocado, Tir se inserta en la membrana citoplasmática de la célula eucarionte. B) La intimina (localizada en la membrana externa de la bacteria) interacciona con la región extracelular de Tir y esta interacción permite la adherencia íntima entre el patógeno y la célula eucarionte. Tir es fosforilado por la acción de tirosin cinasas en el citoplasma de la célula eucarionte, lo que permite el reclutamiento de proteínas como Nck, N-WASP y el complejo proteico Arp 2/3. De esta manera se lleva a cabo la polimerización de actina en el sitio de unión de la bacteria y la formación del pedestal. MI: membrana interna, ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, H: membrana citoplasmática de la célula hospedera.

La tercera y última etapa se lleva a cabo por la interacción de la intimina con su receptor Tir, el cual es el primer efector en ser translocado por el SST3 (Figura 2B). La intimina consiste de una región amino terminal conservada de 700 aminoácidos que contiene un dominio autotransportador barril beta que se ancla a la membrana

externa y de una región variable en su carboxilo terminal de 280 aminoácidos que se encuentra en la superficie exterior de la bacteria (Lai et al., 2013). El efector Tir interacciona con la región carboxilo terminal de la intimina lo que da como resultado la adherencia íntima entre la bacteria y el enterocito. Tir es un ejemplo único de un efector que una vez que es translocado en la célula hospedera se inserta en la membrana citoplasmática en una topología similar a la de un pasador de cabello (hairpin) con las regiones carboxilo y amino terminal localizadas en el citoplasma. Ya translocado, Tir es fosforilado en el residuo 474 (Y474) por la acción de tirosin cinasas del hospedero, esto activa el reclutamiento del complejo de polimerización de actina y la acumulación concentrada de actina debajo del sitio donde se llevó a cabo la adherencia íntima (Figura 2B). La fosforilación del residuo Y474 permite que Tir interaccione con la proteína adaptadora Nck. Esto a su vez provoca que Nck active a la proteína del síndrome neuronal Wiskott-Aldrich (N-WASP) la cual estimula al complejo Arp2/3. De esta manera, este complejo lleva a cabo la nucleación y polimerización de la actina para la formación del pedestal (Pearson et al., 2016) (Figura 3).

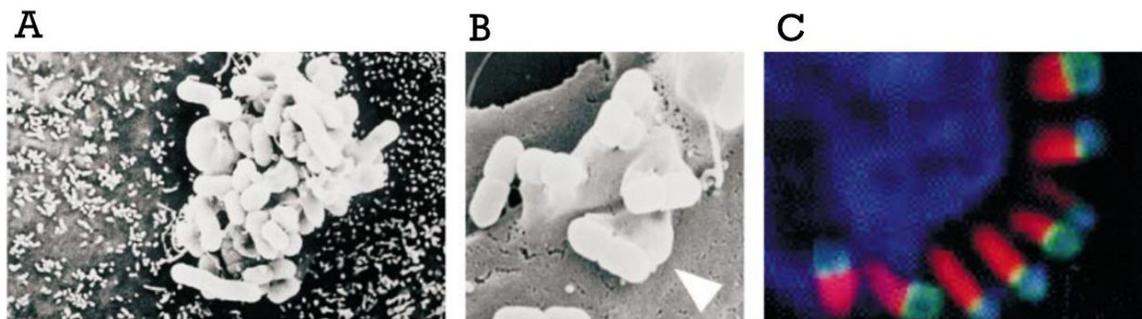


Figura 3. Formación de la estructura tipo pedestal en la línea celular HeLa infectada con *Escherichia coli* enteropatógena. A) Microcolonia de EPEC con un patrón de adherencia localizado. B) Estructura de tipo pedestal (indicada con un triángulo blanco) en la línea celular HeLa. C) Inmunofluorescencia de células HeLa infectadas con EPEC. Los pedestales ricos en actina están en rojo, DNA eucarionte y bacteriano están teñidos en azul, en verde se observa a Tir y en amarillo se observa la superposición de Tir con la actina (Celli et al., 2000).

➤ Locus de eliminación del enterocito (LEE).

Para que EPEC pueda formar la lesión A/E es indispensable el SST3 el cual está codificado en una isla de patogenicidad de 35.62 kb denominada locus de eliminación del enterocito (LEE) (Jarvis et al., 1995). El LEE de la cepa EPEC E2348/69 está constituido por 41 marcos de lectura abiertos (ORFs) ordenados principalmente en 7 operones y cuatro unidades transcripcionales. En el LEE se encuentran los genes que codifican componentes estructurales del SST3, reguladores transcripcionales y de secreción, chaperonas y proteínas efectoras que son secretadas por el SST3 para interrumpir los procesos fisiológicos de la célula hospedera. Los componentes de la membrana interna y externa del SST3 (genes *esc*) están codificados en los operones LEE1, LEE2 y LEE3. Además de la proteína de la aguja *EscF* y la proteína del filamento *EspA*, el LEE4 codifica a los translocadores *EspD* y *EspB*, los cuales ensamblan el translocon (Gaytán et al., 2016; Serapio-Palacios & Finlay, 2020) (Figura 4).

Además de los genes codificados en el LEE, EPEC tiene al menos 17 efectores denominados *Nle* (efectores no codificados en el LEE), los cuales tienen un importante papel en la formación de la lesión A/E. Los efectores *Nle* se encuentran en pequeñas unidades dentro de elementos integrativos y profagos, donde pueden existir múltiples copias de los genes y/o parálogos en diferentes unidades (Serapio-Palacios & Finlay, 2020). El LEE presenta un contenido de GC de 38.3% el cual es menor al contenido GC del cromosoma total de *E. coli* (50.8%), esto es indicativo de que este factor de virulencia se obtuvo originalmente por transferencia horizontal de genes (Furniss & Clements, 2018).

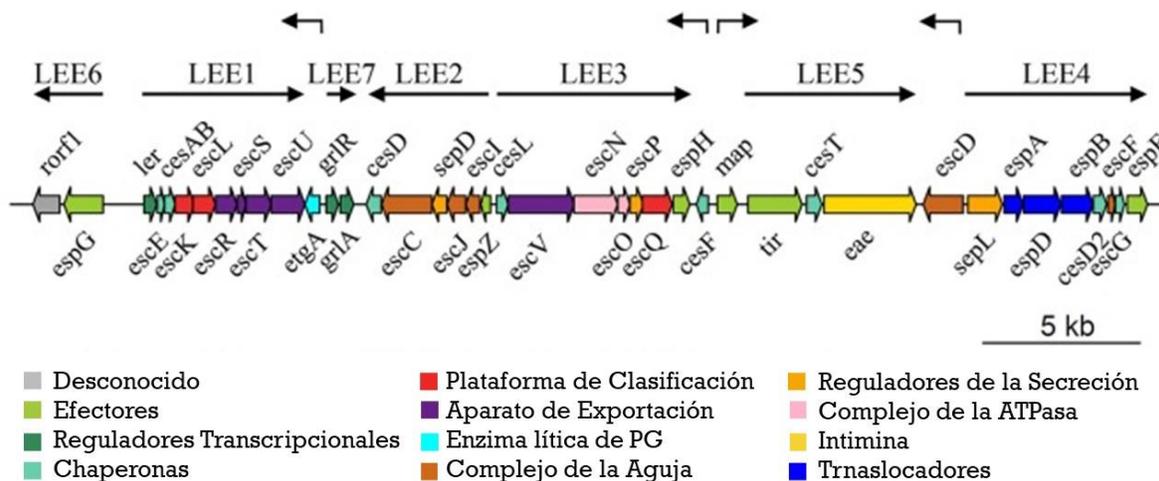


Figura 4. Estructura genética del Locus de Eliminación del Enterocito (LEE) en *Escherichia coli* enteropatógena. Los genes están representados como flechas rellenas con un color asociado a su función. Los operones están indicados mediante flechas negras solidas mientras que las unidades monocistrónicas están indicadas con flechas angulares. El esquema está realizado con una escala de 5 kb. PG: peptidoglicano (Gaytán et al., 2016).

La correcta regulación de la expresión del LEE es crucial para promover la colonización, evitar la formación prematura del SST3 y evadir la respuesta inmune del hospedero. Un buen ejemplo de esto es la regulación en la expresión del LEE1, el primer operón en ser expresado. El primer gen en el LEE1 codifica para la proteína Ler, que es un regulador maestro que regula positivamente la expresión de los otros operones en el LEE, esto lo logra al desplazar al regulador global tipo histona (H-NS) el cual reprime la expresión de todos los operones (Barba et al., 2005; Mellies et al., 1999). Las señales ambientales que activan a Ler son la temperatura corporal del humano, condiciones de crecimiento, autoinductores de la percepción del quórum (quorum sensing), fuentes de estrés, entre otras (Platenkamp & Mellies, 2018). A una temperatura menor de 37 °C, H-NS reprime la transcripción de *ler*, así como la transcripción de todos los operones. Sin embargo, a 37 °C, *ler* es transcrito y se libera de la represión por parte de H-NS para permitir la expresión de los genes del LEE (Figura 5) (Furniss & Clements, 2018).

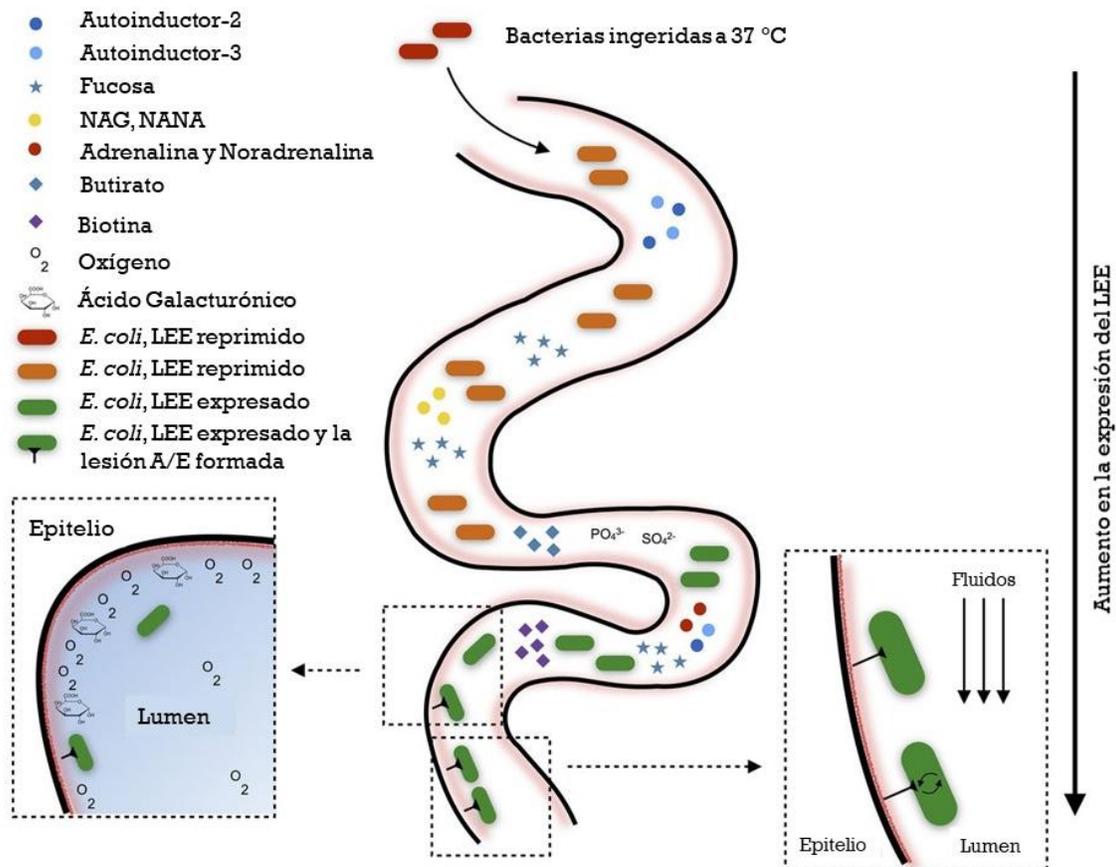


Figura 5. Señales en el intestino que influyen la expresión del LEE. La detección de moléculas derivadas de la microbiota como el autoinductor-2, autoinductor-3 y el butirato inducen la expresión del locus. La fucosa, N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilneuramínico (NANA) son fuertes represores del LEE. Otros estímulos positivos que se van integrando para la inducción del LEE son la presencia de sulfatos, fosfatos, adrenalina, noradrenalina y biotina. Conforme el patógeno se acerca al epitelio detecta el aumento en concentración de oxígeno y la presencia de azúcares derivados de la mucina. Una vez adherido el patógeno al epitelio puede sentir la fuerza del flujo de los fluidos dentro del intestino. Todo en conjunto permite la oportuna infección al hospedero (Furniss & Clements, 2018).

Ler es controlado a su vez por los reguladores GlrA y GlrR, codificados en el LEE7, operón que se encuentra entre el LEE1 y el LEE2 (Figura 4) (Jiménez et al., 2010; Padavannil et al., 2013).

La expresión de Ler y la enfermedad inducida por EPEC es también influenciada por la presencia del plásmido EAF. Este plásmido de 90 kb además del operón *bfp* antes descrito, contiene un operón denominado regulador codificado en el plásmido (*per*). El locus *per* está formado por los genes *perA*, *perB* y *perC*, los cuales se transcriben en un RNAm policistrónico. PerC activa al LEE1 estimulando la expresión de *ler* de manera independiente de GlrA (Serapio-Palacios & Finlay, 2020).

Los reguladores transcripcionales mencionados anteriormente no son los únicos puntos de control que utiliza EPEC para regular la expresión del LEE. Los reguladores transcripcionales tipo LysR son quizás la principal familia de proteínas reguladoras en bacterias. Las proteínas QseA y QseD son importantes reguladores tipo LysR involucrados en la percepción del quórum que actúan sobre el LEE. Existen otras señales que están involucradas en la regulación de la virulencia de los patógenos A/E como es el caso del butirato y de la biotina. La detección del butirato intestinal se da a través de la proteína reguladora Lrp la cual activa al regulador tipo LysR LeuO que induce la expresión de los genes del LEE (Furniss & Clements, 2018).

Otro mecanismo para regular la expresión del LEE es a través de los sistemas de dos componentes (SDC), los cuales consisten en una cinasa de histidinas embebida en la membrana y un regulador de respuesta. Entre los SDC que reprimen los genes del LEE se encuentra el sistema FusKR, el cual responde a la presencia de la fucosa en el hospedero. La proteína FurR reprime directamente la transcripción de *ler* y, de esta manera, la expresión del LEE se inhibe en el lumen intestinal. El sistema CpxAR es otro SDC que reprime la expresión del LEE, el cual es un sistema de respuesta al estrés de la membrana interna y espacio periplásmico. Se ha observado que CpxR interfiere con la actividad de Ler y GrlA. En contraste, los SDC QseCB y QseEF trabajan en conjunto para detectar y responder a la presencia del

autoinductor-3 y de las hormonas del hospedero adrenalina y noradrenalina. Una vez activado este sistema, se activa la transcripción de los genes en el LEE y se permite la colonización en el hospedero (Furniss & Clements, 2018).

➤ Sistema de Secreción Tipo III (SST3).

El SST3 o inyectisoma es un complejo nanomolecular de 3.5 MDa conformado por más de 20 proteínas diferentes (Figura 6) (Gaytán et al., 2016). Este sistema es utilizado por diferentes patógenos Gram-negativos y simbioses para modular su interacción con su hospedero; entre los patógenos de humanos se encuentran *Chlamydia*, EPEC, EHEC, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, entre los patógenos de plantas se encuentran *Erwinia*, *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas*, y entre los simbioses de plantas se encuentra *Rhizobium* (Wagner et al., 2018). El inyectisoma atraviesa tres membranas celulares, la membrana interna bacteriana, la membrana externa bacteriana y la membrana de la célula eucarionte del hospedero (Figura 6). Esto permite a la bacteria introducir proteínas efectoras dentro del citoplasma eucarionte, en donde interfieren en funciones celulares lo que contribuye a la sobrevivencia de la bacteria y su colonización (Deng et al., 2017).

Los patógenos EPEC y EHEC, así como *Citrobacter rodentium*, también conocidos como patógenos de adherencia y eliminación (patógenos A/E) dependen del SST3 para infectar a su hospedero. Una vez adheridos el SST3 introduce al citoplasma eucarionte proteínas efectoras que son capaces de inducir rearrreglos en el citoesqueleto e interfieren con la integridad de la barrera epitelial. Para evitar la activación del sistema inmune, EPEC y EHEC utilizan a algunas de las proteínas efectoras para interrumpir la señalización mediada por el factor nuclear- κ B (NF- κ B) y la proteína cinasa activada por el mitógeno (MAPK), por lo tanto, se evita la activación del inflammasoma (Santos & Finlay, 2015).

El SST3 está relacionado evolutivamente con el flagelo y muchas de las estructuras y componentes en estos sistemas están altamente conservados (Abby & Rocha, 2012; Diepold & Armitage, 2015). El prefijo secreción y translocación celular (Sct)

fue sugerido para unificar la nomenclatura de los componentes conservados en el SST3 de diferentes patógenos (Wagner & Diepold, 2020). A lo largo de este escrito cuando se utilice esta nomenclatura se hace referencia a la proteína correspondiente de EPEC en otro patógeno. El SST3 está dividido estructuralmente en apéndices extracelulares, un cuerpo basal, un aparato de exportación y componentes citoplasmáticos (Figura 6).

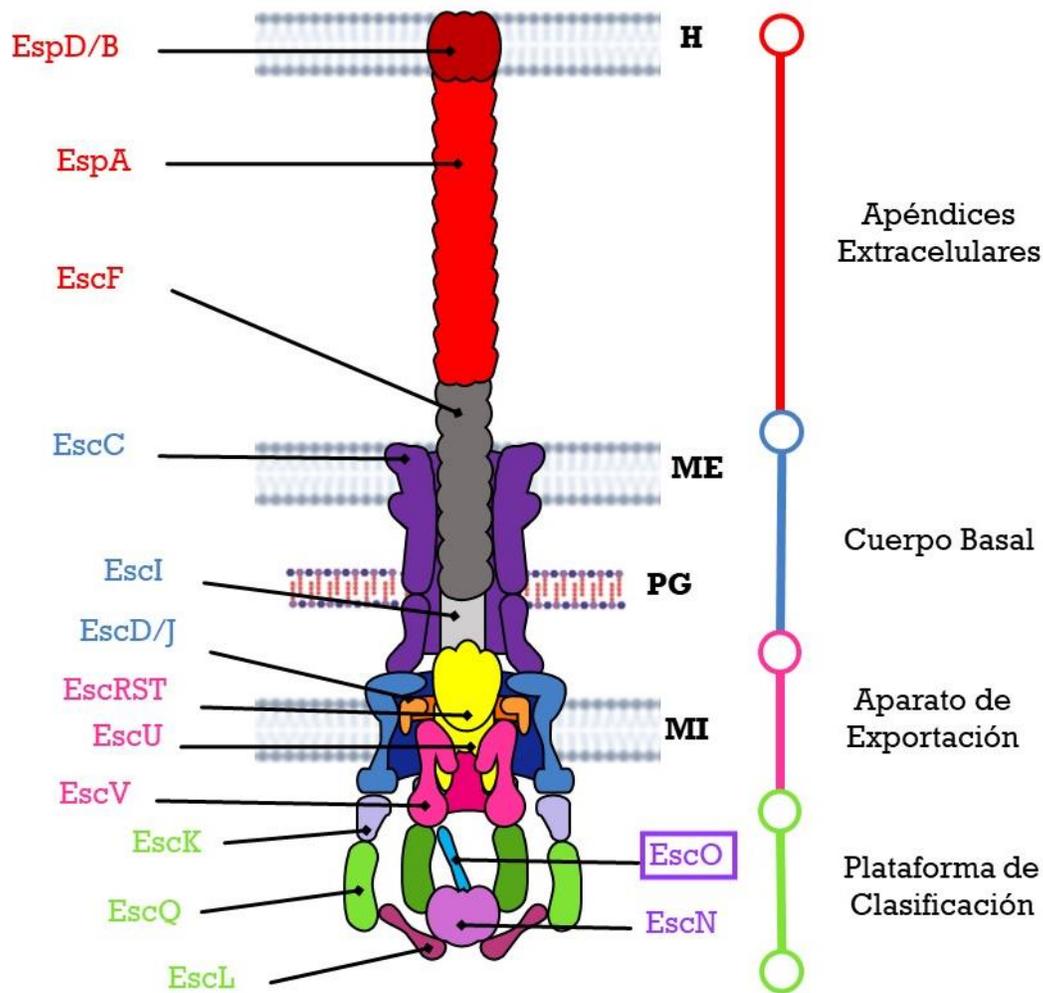


Figura 6. Clasificación estructural del Sistema de Secreción Tipo III en *Escherichia coli* enteropatógena. H: Membrana de la célula hospedera, ME: Membrana externa bacteriana, PG: Peptidoglicano, MI: Membrana interna bacteriana. Dentro de la plataforma de clasificación se encuentra el complejo ATPasa formado por EscO y

EscN (marcado en color morado el nombre de estas proteínas, además en un recuadro se encuentra la proteína en la que se enfoca este estudio).

Dentro de los apéndices extracelulares se encuentra la aguja, la cual es una estructura helicoidal hueca compuesta de múltiples copias de la proteína EscF, es esencial para la secreción de todos los sustratos del SST3 y, por lo tanto, es indispensable para la virulencia (Deng et al., 2004; Wilson et al., 2001). La estructura atómica de SctF presenta un arreglo alfa-hélice de pasador de cabello (hairpin) compuesto por dos alfa-hélices de un tamaño similar separadas por un pequeño giro que, normalmente, presenta dos residuos de prolina separados por dos aminoácidos (motivo PXXP) (Deane et al., 2006; Poyraz et al., 2010; Zhang et al., 2006). En EPEC, EscF se asocia en el citoplasma con dos chaperonas, EscE y EscG, que previenen su temprana polimerización (Sal-Man et al., 2013). La aguja mide 23 nm de largo y entre 8-9 nm de ancho; la longitud de la aguja está controlada por la proteína EscP, esta proteína interacciona con EscU y juntas son importantes para la regulación del cambio de especificidad de sustratos en el aparato de exportación (Feria et al., 2012). El eje es una estructura que une a la aguja con el aparato de exportación en el cuerpo basal. Está constituido de una sola proteína, EscI, y se predice que esta estructura contiene aproximadamente 6 subunidades (Figura 6) (Zilkenat et al., 2016).

El SST3 se encuentra en un estado inactivo antes de su contacto con la célula eucarionte. En el extremo distal de la aguja hay una estructura denominada el complejo de la punta de la aguja, el que en algunas bacterias (como los patógenos A/E) se extiende como un filamento más largo que la aguja misma, el cual le permite al sistema detectar señales ambientales, evitando la secreción temprana de efectores (Maria Lara-Tejero & Galán, 2019).

El filamento es un apéndice extracelular que se encuentra en los SST3 de los patógenos A/E (también en *Bordetella* spp.), que funciona como un adaptador entre la aguja y el poro de traslocación que se forma en la membrana de la célula hospedera (Figura 6). Esta estructura está formada por la polimerización de múltiples subunidades de la proteína EspA con una simetría helicoidal y 11

subunidades por giro (Lyons et al., 2021). Diferente a la aguja, la longitud del filamento es variable, puede alcanzar hasta 600 nm, lo cual parece ser dependiente de la cantidad de EspA, puesto que al aumentar la cantidad de EspA en el citoplasma aumenta la longitud de la estructura. La longitud promedio del filamento es de 90 nm (Sekiya et al., 2001).

La proteína EspA contiene un dominio de hélice superenrollada en su región carboxilo terminal que es necesario para la polimerización de las subunidades y su ensamblaje en el filamento (Lyons et al., 2021). Dado que esta proteína se polimeriza espontáneamente, necesita de la ayuda de una chaperona para evitar la formación de la estructura del filamento en el citoplasma. CesAB es la primera chaperona de EspA que se describió. La estructura cristalizada del complejo CesAB-EspA demostró que la hélice superenrollada está involucrada en la interacción con CesAB (Yip et al., 2004).

La última estructura extracelular es el poro de translocación. Es un complejo formado por la hetero oligomerización de las proteínas EspB y EspD (Figura 6). Estas proteínas interactúan entre sí y se insertan dentro de la membrana citoplasmática del hospedero. EspB y EspD tienen uno y dos cruces transmembranales, respectivamente (Chatterjee et al., 2015; Ide et al., 2001). Una vez formado el poro del SST3 en la membrana de la célula eucarionte, EPEC inicia la translocación de efectores hacia el citoplasma del hospedero. Recientemente, se ha observado que este proceso se puede regular mediante la acción de enterotoxinas, como es el caso de la serin proteasa EspC, que se encuentra tanto en EPEC típica como atípica. EspC puede regular la formación del poro por su acción de proteasa sobre EspA y EspD. Además, esta proteína se ha visto involucrada en un nuevo mecanismo donde EPEC induce la apoptosis de la célula hospedera. EspC corta y activa directamente a la procaspasa-3 usando su actividad de proteasa. De esta manera, parece ser que la regulación en la formación del poro por parte de EspC durante las etapas iniciales de la infección es para favorecer la colonización de EPEC, mientras que la apoptosis inducida por EPEC tiene lugar en etapas tardías de la infección para promover la diseminación del patógeno (Serapio-

Palacios & Finlay, 2020). Además de su papel en el poro de translocación, EspB es translocado hacia las células del hospedero en donde se une a la miosina, inhibiendo su interacción con la actina y, por lo tanto, contribuye con la eliminación de las microvellosidades (Iizumi et al., 2007).

EspD y EspB en el citoplasma bacteriano interactúan con tres chaperonas, CesD, CesD2 y CesAB, las cuales mantienen a estas proteínas en un estado desplegado y evitan su oligomerización prematura (Creasey et al., 2003; Neves et al., 2003; Wainwright & Kaper, 1998).

El cuerpo basal está formado por tres anillos membranales (Figura 6). El anillo de la membrana externa está formado por una proteína que pertenece a la familia de las secretinas, presente en diferentes sistemas de secreción (Gaytán et al., 2016). La secretina del SST3 está formada por una región amino terminal que está constituida por tres dominios (N0, N1 y N3) los cuales se encuentran ubicados dentro del periplasma y una región carboxilo terminal que forma un poro en la membrana externa. La región carboxilo terminal forma una estructura única, un barril beta formado por dos capas. El barril beta externo se extiende hacia la membrana externa donde forma un dominio de asociación a membrana. El barril beta interno se extiende hacia el lumen del poro para formar una compuerta que separa el espacio periplásmico del medio extracelular (Wagner et al., 2018). En el caso de EPEC, la proteína EscC tiene una secuencia señal que se procesa una vez que la proteína se secreta al periplasma a través de la vía Sec. En varios SST3 la oligomerización de la secretina y su inserción en la membrana externa es inducida por una lipoproteína llamada pilotina, pero en EPEC no se ha identificado esta proteína y, de hecho, EscC carece del dominio de unión a la pilotina (Gaytán et al., 2016). En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, se demostró que la estructura de la secretina está compuesta de 15 subunidades de SctC (Worrall et al., 2016).

En la membrana interna se encuentran dos anillos concéntricos formados por las proteínas EscJ y EscD, en donde el anillo formado por EscJ está rodeado por el anillo formado por EscD (Figura 6). EscD contiene solo un segmento transmembranal, un dominio periplásmico compuesto por dos motivos formadores

de anillos, así como un dominio asociado a forkhead (FHA) citoplásmico en su extremo amino terminal. La proteína SctJ presenta un dominio de anclaje a lípidos en el amino terminal y un cruce transmembranal en su carboxilo terminal. El dominio periplásmico de SctJ está compuesto de dos motivos formadores de anillos (Wagner et al., 2018). En EPEC, EscJ es producida como una pre-proteína y es presuntamente translocada al periplasma de una manera dependiente de la vía Sec (Crepin et al., 2005). Análisis cristalográficos de la estructura de la proteína demostraron que forma un anillo de 24 subunidades de 18 nm de ancho y 5.2 nm de altura (Yip et al., 2005). EscJ forma un anillo periplásmico ubicado arriba de la membrana interna, y no dentro de ella. (Crepin et al., 2005; Yip et al., 2005). A diferencia de sus análogos funcionales, EscJ no posee un cruce transmembranal en su extremo carboxilo terminal; en cambio se encuentra anclada en el lado periplásmico de la membrana interna a través de su región amino terminal (Gaytán et al., 2016).

El ensamblaje del inyectisoma se enfrenta a una barrera física; debe atravesar la pared de peptidoglicano (PG). En EPEC esto se logra mediante la acción de una enzima especializada en degradar PG denominada EtgA que se localiza en el periplasma para llevar a cabo su actividad lítica (García-Gómez et al., 2011). La actividad enzimática de EtgA es aumentada en la presencia de Escl, esto sugiere que esta interacción delimita el sitio donde se degrada el PG (Burkinshaw et al., 2015).

Todos los SST3 contienen cinco proteínas de membrana interna altamente conservadas que son esenciales para su función, y son SctV, SctR, SctS, SctT y SctU (Figura 6). En el flagelo se determinó que la estequiometría de las proteínas FliPQR (SctRST) es de 5:4:1, respectivamente (Kuhlen et al., 2018). Además, a pesar de que estas proteínas presentan dominios transmembranales ninguna se encuentra en configuraciones canónicas dentro de la membrana (Butan et al., 2019). De hecho, el complejo SctRST tiene una estructura helicoidal que proporciona una plataforma en donde el eje y la aguja se ensamblan eficazmente (Maria Lara-Tejero & Galán, 2019).

En el caso de las proteínas SctV y SctU, éstas presentan un dominio citoplasmático además de su dominio transmembranal. Se considera que SctV tiene un papel en el reconocimiento de los sustratos antes de su translocación a través del aparato de exportación. Otra función asociada a la familia de proteínas SctV es su función como un canal de protones para energizar el proceso de secreción (Maria Lara-Tejero & Galán, 2019; Minamino et al., 2011). EscV, es el componente mayoritario del aparato de exportación, está compuesto de una región amino terminal con ocho hélices transmembranales y una región carboxilo terminal citoplasmática de 340 aminoácidos. El dominio citoplasmático de varios homólogos de EscV en el inyectisoma y flagelo se ha cristalizado y se ha demostrado que la familia FliA/YscV (SctV) presenta una estructura con cuatro subdominios, algunos de éstos participan en la oligomerización de la proteína para formar un anillo nonamérico (Inoue et al., 2019; Majewski et al., 2020).

EscU (SctU) es una proteína que tiene cuatro dominios transmembranales y un dominio citoplasmático en su región carboxilo terminal, en el que se lleva a cabo un corte auto proteolítico en el motivo conservado NPTH (Gaytán et al., 2016; Maria Lara-Tejero & Galán, 2019).

Los componentes citoplasmáticos incluyen al complejo ATPasa, la plataforma de clasificación de sustratos también denominada anillo citoplasmático (anillo-C), efectores y sus chaperonas y a las proteínas que participan en los interruptores moleculares, complejos proteicos encargados de regular el orden de secreción (Gaytán et al., 2016).

El complejo ATPasa está formado por las proteínas EscN, EscL y EscO (Andrade et al., 2007; Romo-Castillo et al., 2014). La estructura cristalográfica de la ATPasa EscN presenta similitud con las subunidades α y β de la ATPasa-F₀/F₁ (Zarivach et al., 2007). EscL se ha relacionado evolutivamente con las subunidades b y δ de la ATPasa-F₀/F₁ (Pallen et al., 2006). Además, aunque las secuencias presentan una baja similitud, estudios *in silico* y funcionales han demostrado que EscO es la contraparte de la proteína FliJ, la cual ha sido relacionada con la subunidad γ de la ATPasa-F₀/F₁ (Ibuki et al., 2011; Romo-Castillo et al., 2014).

EscN es una proteína periférica membranal localizada en la base del cuerpo basal que energiza el proceso de secreción, posiblemente al liberar a los sustratos de sus respectivas chaperonas y favorecer su desplegamiento para poder ser secretados (Chen et al., 2013; Galán, 2008). Esta enzima se oligomeriza en un anillo hexamérico, conformación que influye en su actividad de hidrólisis del ATP (Andrade et al., 2007). EscN interacciona con EscL, un regulador negativo de la actividad de la ATPasa, y con EscO, un regulador positivo de su actividad enzimática. El complejo EscN-EscL en el citoplasma, se asegura que la actividad de la ATPasa esté inhibida hasta que sea posible acoplar la hidrólisis de ATP con la secreción de proteínas. Una vez que EscO interacciona con EscN, se induce la oligomerización de EscN y, de esta manera, el complejo EscN-EscL-EscO se forma cerca del aparato de exportación a través de interacciones con el anillo C; EscL y EscO interaccionan a su vez con EscV en el aparato de exportación (Romo-Castillo et al., 2014).

En los patógenos A/E el anillo C es una estructura localizada en la base del cuerpo basal, formada principalmente por la proteína EscQ, la cual pertenece a la familia de proteínas YscQ/FliN (SctQ) (Gaytán et al., 2016). En el flagelo, tres diferentes proteínas forman el anillo C, FliM, FliN y FliG, y se ha demostrado que los miembros de la familia SctQ tienen una relación evolutiva con FliM y FliN (Dennis R. Thomas et al., 2006). Se le ha asociado a SctQ la función de reclutador de los complejos chaperona-sustrato en el proceso jerárquico de secreción de sustratos. SctQ junto con las proteínas SctK y SctL son referidas como la plataforma de clasificación de sustratos (María Lara-Tejero et al., 2011). Estas proteínas se encuentran formando un complejo unido a la base del SST3 (plataforma de clasificación) o libres en el citoplasma. Una vez ensambladas en el SST3 la proteína SctK interacciona con el anillo de membrana interna SctD y, simultáneamente, con SctQ. De esta manera se forman seis vainas y en conjunto se obtiene una estructura tipo jaula. En cada una de las vainas hay una subunidad de SctQ y de SctK. Además, un dímero de SctL, el cual interacciona con SctQ, conecta las seis vainas con la ATPasa SctN (Figura 7) (Wagner et al., 2018).

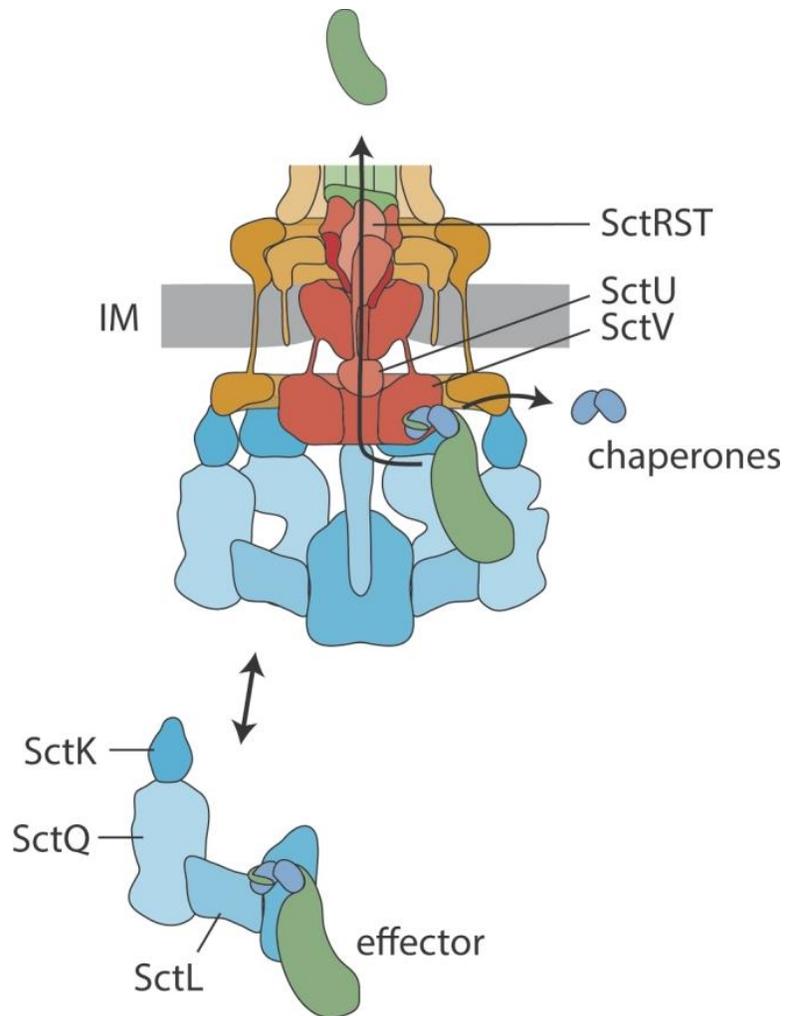


Figura 7. Entrega de sustratos a la base del SST3. Los complejos chaperona-sustrato son cargados a complejos citoplásmicos (SctK, SctQ y SctL). Se entiende que estos complejos sirven como acarreadores de sustratos dinámicos que entregan los sustratos a la base del sistema, y forman la estructura denominada como la plataforma de clasificación. Así, los sustratos llegan al aparato de exportación (SctRSTUV) y son secretados. IM: membrana interna (Wagner et al., 2018).

Los patógenos translocan a la célula eucarionte decenas de efectores en una cantidad y orden específico. Los efectores codificados en el LEE son Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ y EspB. Estos sustratos son secretados en un orden jerárquico hacia la célula hospedera, en donde Tir es el primero en ser translocado, le siguen EspZ, EspF, EspH, EspG y Map. Algunos de los efectores Nle, como NleA/EspI,

NleB, NleE, NleF, NleG, NleH, EspJ y EspL, son comunes en las especies que contienen el LEE. En otro estudio que incluyó todos los efectores conocidos, se encontró nuevamente que Tir es el primer sustrato en ser inyectado a la célula hospedera seguido de EspZ, NleA, NleH1, EspF, EspH, NleH2, EspJ, Map, EspG, NleD, NleF, NleB1, NleE1, NleB2, NleC, NleG, NleE2, EspG2 y EspL2 (Mills et al., 2013). En general, los efectores contienen un dominio catalítico en su región carboxilo terminal con el que manipulan funciones de la célula hospedera, mientras que en su región amino terminal contienen el dominio de unión a chaperona, el cual permite el reconocimiento del sustrato por su chaperona para dirigirlo al SST3 (Gaytán et al., 2016).

➤ Interruptores moleculares

El ensamblaje y funcionamiento del SST3 depende de que la secreción de sustratos se lleve a cabo en un orden jerárquico y con un control temporal de la secreción. El ensamblaje del sistema inicia con la secreción secuencial de las proteínas que forman los anillos de membrana externa e interna, dependiente del sistema de secreción Sec, así como de las proteínas que integran al aparato de exportación. Así, el anillo de membrana interna SctD interacciona con el anillo de membrana externa para formar un complejo que después se ensambla con el anillo de membrana interna SctJ que está interaccionando con el aparato de exportación, una vez que estas proteínas forman un cuerpo basal funcional los componentes del complejo de la ATPasa y del anillo citoplasmático son ensamblados en la base del inyectisoma, de esta manera se completa un SST3 funcional (Deng et al., 2017; Wagner et al., 2018).

Los sustratos se clasifican en tres categorías de acuerdo con el momento en el que son secretados: sustratos tempranos (eje y aguja), intermedios (translocadores) y tardíos (efectores) (Gaytán et al., 2016). Cuando la aguja alcanza una longitud definida se lleva a cabo un evento donde se cambia la especificidad de la secreción de sustratos tempranos a intermedios, a este evento se le denomina el primer interruptor molecular. Una vez formado el poro de translocación en la membrana de la célula hospedera, se lleva a cabo el segundo interruptor molecular, donde se

detiene la secreción de translocadores e inicia la secreción de efectores (Deng et al., 2017).

El primer interruptor molecular involucra a las proteínas EscP y EscU, donde EscP mide la longitud de la aguja mediante su secreción intermitente durante el ensamblaje de esta estructura. Una vez que la aguja alcanza su longitud final, todos los subdominios de EscP pueden hacer contacto con la aguja, promoviendo una pausa en la secreción que permite que EscP interactúe con EscU, induciendo un cambio conformacional en el aparato de exportación que modifica su especificidad de sustratos tempranos hacia sustratos intermedios y tardíos (Figura 8) (Feria et al., 2012).

El segundo interruptor molecular lleva a cabo el cambio de especificidad de sustratos intermedios a tardíos, y está formado por las proteínas SepL, SepD y CesL (Younis et al., 2010). SepL es parte de una familia de proteínas conocidas como portero (gatekeepers; SctW), las cuales previenen la secreción prematura de efectores antes de que se establezca el contacto con la célula hospedera. Conforme se secretan los translocadores, el complejo SepL-SepD-CesL se encuentra interaccionando con la región citoplasmática del aparato de exportación permitiendo la secreción de los sustratos intermedios y evitando la secreción de los efectores. Como se mencionó anteriormente, una vez que se completa la formación del poro de translocación en la membrana del hospedero el SST3 detecta una señal proveniente del hospedero y esta señal es transmitida al aparato de exportación donde el complejo SepL-SepD-CesL se va a disociar del aparato de exportación y esto permite la secreción de efectores y detiene la secreción de translocadores (Figura 8) (Díaz-Guerrero et al., 2021; Gaytán et al., 2018; Portaliou et al., 2017).

En concreto, la secreción oportuna de sustratos depende de la actividad coordinada de las proteínas EscP, EscU, SepL, SepD, CesL y EscV, además, de la correcta detección de las señales ambientales otorgadas por el hospedero (Figura 8).

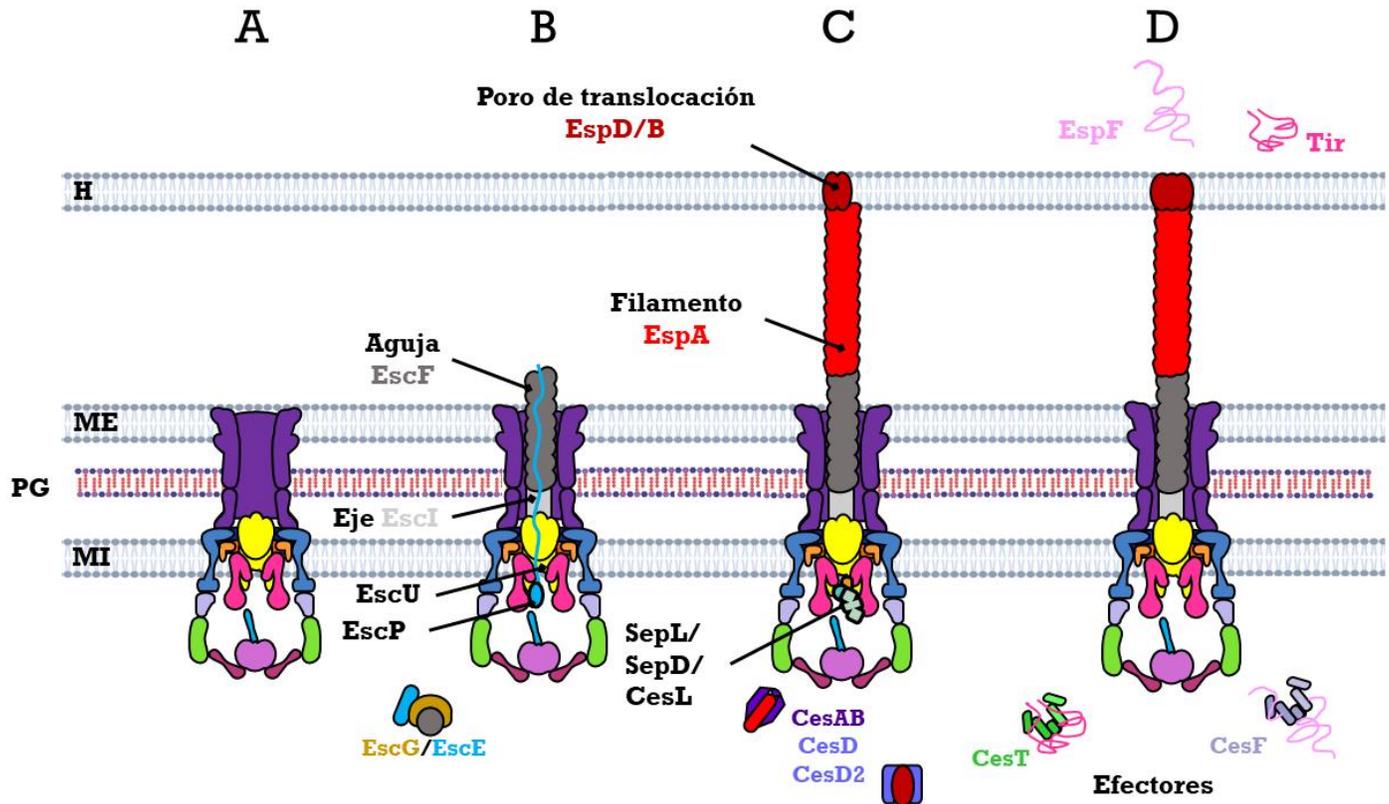


Figura 8. Secreción de sustratos del sistema de secreción tipo III en *Escherichia coli* enteropatógena. A) Cuerpo basal, aparato de exportación y anillo-C correctamente ensamblados. B) Secreción de sustratos tempranos, EscF (gris) y EscI (gris claro). La secreción de EscF se ve facilitada por las chaperonas EscG (dorado) y EscE (azul). EscP (azul claro) actúa como regla molecular, cuando la aguja alcanza una longitud específica interacciona productivamente con EscU (amarillo). C) Secreción de sustratos intermedios, EspA, EspD y EspB. La chaperona CesAB escolta a EspA, y CesD y CesD2 actúan como chaperonas de EspD y EspB. El complejo SepL-SepD-CesL bloquea la secreción de efectores y permite la secreción de translocadores mediante su interacción con EscV (rosa) y EscU. D) Secreción de efectores (sustratos tardíos). CesT (verde) actúa como

chaperona del efector Tir (rosa claro) siendo éste el primero en secretarse, después se continúa la secreción de los demás efectores como lo es el caso de EspF. La chaperona CesF escolta a EspF a la base del sistema.

➤ Chaperonas del sistema de secreción tipo III

Las chaperonas moleculares son proteínas que se asocian transitoriamente con uno o varios componentes, previniendo su plegamiento prematuro o incorrecto, también evitan las interacciones intramoleculares o intermoleculares no deseadas, sin participar directamente en la función final de sus sustratos (Page & Parsot, 2002).

En el SST3 existen chaperonas moleculares específicas para las proteínas involucradas en el ensamblaje y función del sistema. Aunque las chaperonas no comparten similitud en sus secuencias, sí comparten características bioquímicas como lo es un peso molecular bajo (menor a 15 kDa), un punto isoeléctrico ácido ($pI < 5$) y una hélice anfipática predicha en el extremo carboxilo terminal (Izoré et al., 2011; Page & Parsot, 2002; Parsot et al., 2003).

Las chaperonas del SST3 están clasificadas en tres categorías dependiendo del tipo de sustratos al que se unen. Las chaperonas clase I se unen a los sustratos tardíos (la subclase IA se une solo a un efector mientras que la subclase IB se une a varios efectores), la clase II se une a los sustratos intermedios y la clase III se une a los sustratos tempranos (Gaytán et al., 2016; Izoré et al., 2011). Las dos subclases de las chaperonas clase I comparten la misma estructura dimérica, la cual tiene forma de corazón, con dos hojas beta y 2 ó 3 alfa hélices laterales (Figura 9) (Izoré et al., 2011). En EPEC, se han identificado dos chaperonas clase I, la chaperona CesT primero se identificó que interacciona con la proteína Tir por lo que se clasificó como clase IA, pero después se determinó que CesT interacciona con otros 10 sustratos, de esta manera, ahora se considera una chaperona multicargo clase IB de los efectores Tir, Map, NleA, NleF, NleH, NleH2, EspH, EspZ, EspF, NleG, y EspG (Elliott et al., 1999; Gaytán et al., 2016; N. A. Thomas et al., 2005). La segunda chaperona que se identificó es de clase IA, la chaperona CesF la cual es indispensable para translocar a EspF (Elliott et al., 2002).

Las chaperonas de la clase II y III interactúan con diferentes tipos de sustratos, pero su estructura es muy similar. Los dos tipos de chaperonas presentan en su estructura secundaria el plegamiento tetratricopéptido (TPR), el cual es un motivo que está caracterizado por dos hélices antiparalelas. La estructura terciaria de las chaperonas consta del motivo TPR repetido tres veces. Proteínas con el motivo TPR se encuentran ampliamente distribuidas entre los organismos eucariontes y éstos están involucrados en establecer interacciones proteína/proteína (Izoré et al., 2011). Las chaperonas clase II se unen y estabilizan a las proteínas translocadoras que participan en la formación del poro de translocación y el filamento (Izoré et al., 2011; Page & Parsot, 2002; Parsot et al., 2003). En el caso de las chaperonas clase III que se unen a la proteína que forma la aguja se presenta un comportamiento interesante, donde la chaperona se une a su sustrato y una segunda proteína estabiliza el complejo chaperona/sustrato al interactuar con la chaperona y no con la subunidad de la aguja. Este mecanismo se ha observado en *Pseudomonas*, *Yersinia* y EPEC (Figura 9) (Quinaud et al., 2007; Sal-Man et al., 2013; Sun et al., 2008).

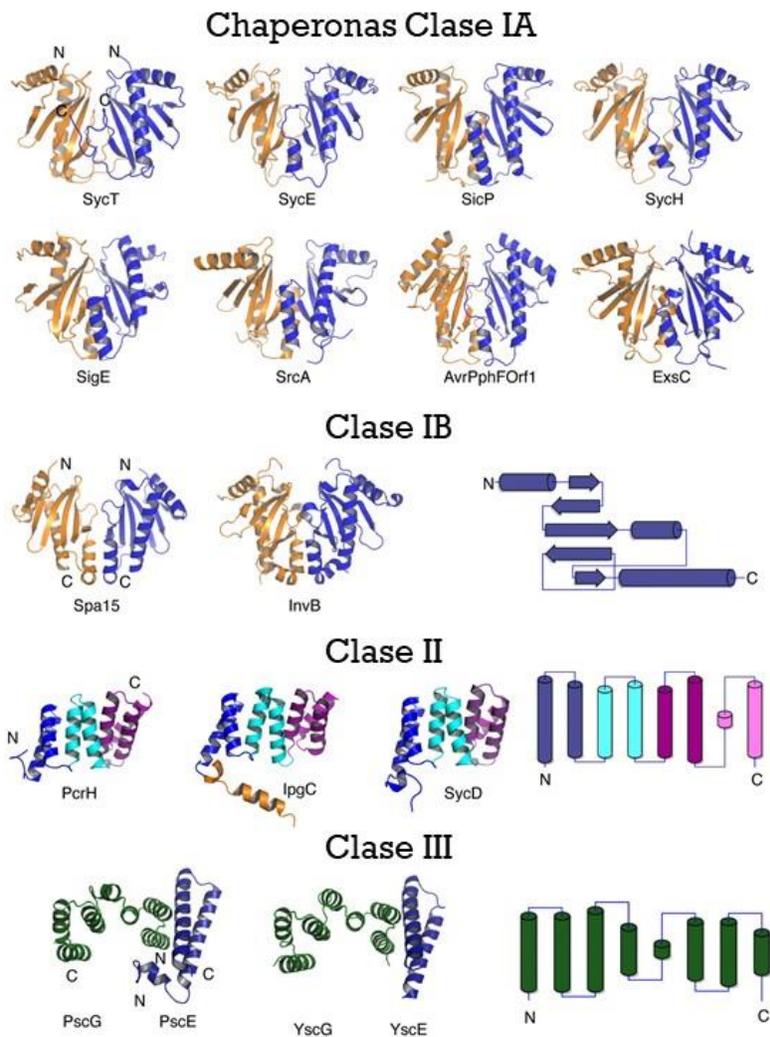


Figura 9. Estructuras de las chaperonas del Sistema de Secreción Tipo III de diferentes patógenos. Las chaperonas clase IA y IB presentan una estructura común en forma de corazón, las chaperonas II y III presentan un plegamiento tipo TPR. En la última clasificación se requiere de una proteína pequeña (azul oscuro) para estabilizar a la chaperona principal (verde). PDB: SycT (2BSJ), SycE (1JYA), SicP (1JYO), SycH (1TTW), SigE (1K3S), SrcA, (3EPU), AvrPphF (1S28), ExsC (3KXY), Spa15 (1RY9), InvB (2FM8), PcrH (2XCB), IpgC (4GZ2), SycD (2VGX), PscG-PscE (2UWJ), and YscG-YscE (2P58) (Izoré et al., 2011).

Antecedentes

- FliJ es el análogo de EscO en el SST3 flagelar en *Salmonella*.

La proteína FliJ se consideró como una chaperona general debido a que se observó que era capaz de interactuar con los sustratos tipo gancho y tipo filamento. Asimismo, FliJ (SctO) comparte características bioquímicas con las chaperonas citoplasmáticas del SST3 como el bajo peso molecular y un contenido predicho de α -hélices. Además, se considera esencial para el proceso de exportación de sustratos por sus interacciones reportadas con FliH (SctL), FliI (SctN) y FliA (SctV) (Minamino et al., 2000; Minamino & Macnab, 2000).

Para conocer a profundidad como FliJ (SctO) lleva a cabo su función se realizó un estudio en el que se determinó que esta proteína no es capaz de interactuar con los sustratos del flagelo, sino que interactúa con las chaperonas flagelares FlgN y FliT y no con la chaperona FliS de la flagelina (FliC). Además, se observó que FliJ (SctO) interactúa con la chaperona vacía y no así con el complejo chaperona/sustrato. Debido a que FliJ (SctO) interactúa con las chaperonas no cargadas de las subunidades minoritarias del flagelo y no con las mayoritarias como lo es el caso de la flagelina se propuso que la función de FliJ no era la de una chaperona general sino la de una escolta de chaperonas que generaba un ciclo entre la chaperona y el complejo chaperona/sustrato y, de esta manera, favorecer la secreción de estas subunidades minoritarias antes de que se secretara la flagelina (Evans et al., 2006).

Otra interacción importante relacionada con la función de FliJ (SctO) en el flagelo que se determinó fue la de FliH con FliI (Minamino et al., 2001), que son los análogos funcionales de EscL y EscN respectivamente. Para conocer el funcionamiento de FliH (SctL) se realizó una disección molecular de la proteína en la que se determinó que FliH (SctL) interactúa con FliI (SctN), formando el complejo citoplasmático FliH₂-FliI (SctL₂-SctN). Además, se observó que FliH (SctL) regula negativamente la actividad ATPasa de FliI (SctN). También se determinó que FliH (SctL) interactúa con FliJ (SctO) y se propuso un modelo en el que FliJ interactúa con el complejo FliH₂-FliI (Gonzalez-Pedrajo et al., 2002). Adicionalmente, se determinó que FliJ

(SctO) interacciona con la región citoplasmática de la proteína del aparato de exportación FlhA (análogo funcional de EscV; SctV), de esta manera, se propuso la formación del complejo FliH₂-FliI-FliJ-FlhA en la biogénesis flagelar (Fraser et al., 2003). Se determinó la importancia de la interacción de FliJ (SctO) con FlhA (SctV) cuando se observó que la presencia de FliJ (SctO) aumenta la afinidad de FlhA (SctV) por el complejo chaperona/sustrato FliT-FliD. Por lo tanto se planteó un modelo en el que el complejo chaperona/sustrato se une al complejo citoplasmático FliH₂-FliI a través de las interacciones específicas de FliJ (SctO) y FliI (SctN) con la chaperona FliT, así todo el complejo se une a la plataforma del aparato de exportación formada por las regiones citoplasmáticas de FlhA (SctV) y FlhB (SctU) (Figura 10) (Bange et al., 2010; Imada et al., 2010).

En el sistema flagelar se ha reportado que el proceso de energización en la exportación de sustratos depende de la hidrólisis de ATP y de la fuerza protón-motriz (FPM, Figura 10) (Galán, 2008; Terashima & Imada, 2018). En los estudios en los que se propuso que el aparato de exportación flagelar es intrínsecamente un antiportador proteína-protón el cual depende de la diferencia del potencial eléctrico ($\Delta\psi$) y de la diferencia en la concentración de protones (ΔpH), también se determinó que la interacción de FliJ (SctO) con la región *linker* de FlhA (SctV) (Bange et al., 2010) es necesaria para que el aparato de exportación realice un cambio conformacional que le permite utilizar la FPM dependiente de la $\Delta\psi$ de una manera más eficiente (Minamino et al., 2011). Para que FliJ (SctO) llegue al aparato de exportación necesita de la presencia de FliH (SctL) y FliI (SctN) (Figura 10) (Minamino et al., 2011, 2016; Terashima & Imada, 2018)

Una vez que se logró resolver la estructura cristalográfica de FliJ (SctO) fue cuando se determinó que esta proteína presenta una similitud estructural con la subunidad γ de las ATPasas-F₀/F₁, por lo que se evaluó su capacidad de interactuar con FliI (SctN). Se determinó que las dos proteínas sí interactúan y que la presencia de FliJ (SctO) fomenta la formación del anillo hexamérico de FliI (SctN), además se observó el aumento de la actividad hidrolítica de la enzima en presencia de FliJ

(SctO). De esta manera se la asignó a FliJ (SctO) la función principal de regulador positivo de la ATPasa (Ibuki et al., 2011).

En un estudio sobre la secreción de sustratos en el flagelo se determinó que el mecanismo por el que el complejo FliT-FliD llega al aparato de exportación es similar para el complejo FlgN-FlgK y FlgN-FlgL, donde el complejo citoplasmático FliH₂-FliI-FliJ es el encargado de escoltarlos eficazmente al aparato de exportación (Figura 10). Además, se determinó que el complejo chaperona/sustrato interacciona en una región hidrofóbica conservada en el dominio citoplasmático de FlhA (Minamino et al., 2012). En un estudio que profundizó en la interacción de FliJ con FlhA, se determinó que interaccionan de una manera similar a la que la subunidad ϵ de la ATPasa-F₀/F₁ (Ibuki et al., 2013).

Por lo tanto, actualmente se sabe que FliJ actúa de una manera conjunta con FliH, FliI, FlhA y las chaperonas FlgN y FliT para eficientizar el proceso de exportación de sustratos en el flagelo. Esto lo logra a través de un mecanismo que permite la correcta energización del proceso mediante la hidrólisis de ATP y el acoplamiento eficiente de la FPM, además de su participación en la escolta de los sustratos a través del complejo dinámico citoplasmático FliH₂-FliI-FliJ (Figura 10) (Bai et al., 2014; Minamino et al., 2016; Terashima & Imada, 2018).

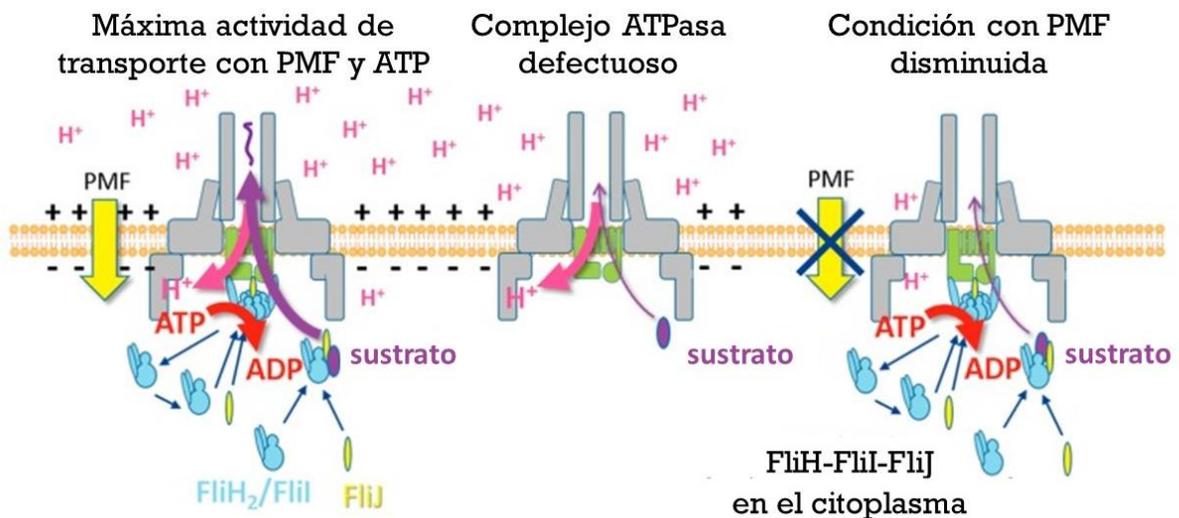


Figura 10. Tres posibles modos de transducción de energía en el SST3. En el primer panel se utiliza cooperativamente la hidrólisis de ATP y la FPM en la cepa silvestre, en el segundo se observa la exportación de proteínas utilizando la FPM en una mutante doble $\Delta fliH-fliI$ y en el último panel está representada la exportación de proteínas mediante la hidrólisis de ATP en ausencia de la FPM (Terashima & Imada, 2018).

➤ Análogos funcionales de EscO en diferentes patógenos.

En *Yersinia pestis* se caracterizó por primera vez al gen *yscO* (*sctO*) y se determinó que es fundamental para la secreción de las proteínas Yop y del antígeno V (Payne & Straley, 1998). En otro estudio, se encontró la interacción de YscO con YscP (análogo de funcional de EscP en EPEC) (Payne & Straley, 1999). En *Y. enterocolitica* se encontró que al realizar una cromatografía de afinidad con YscP-GST, esta versión de la proteína co-purificaba con los componentes citoplasmáticos YscN, YscL, YscO y YscQ (Riordan et al., 2008). En esta misma especie de *Yersinia* se encontró la interacción de YscO con YscU (análogo funcional de EscU) (Riordan & Schneewind, 2008).

Como FliJ, YscO también presenta una estructura de hélice super enrollada con forma de pasador de cabello (hairpin) pero a diferencia de FliJ, no se ha observado la capacidad de YscO de fomentar la formación del anillo hexamérico formado por YscN, de hecho se considera que YscO es dispensable para este proceso (Diepold et al., 2012; Mukerjea & Ghosh, 2013). Otra característica que YscO y FliJ comparten es su capacidad de interaccionar con chaperonas citoplasmáticas del SST3, se determinó en *Y. enterocolitica* que YscO interacciona con la chaperona de translocadores SycD (chaperona de los sustratos YopB y YopD) y con la chaperona SycT (chaperona del efector YopT) (Evans & Hughes, 2009).

Mediante mutagénesis dirigida se caracterizó la interacción entre YscO con YscP y SycD en *Y. pseudotuberculosis*. Se confirmó la interacción entre YscO y SycD y se determinó que ninguna de las mutaciones realizadas afectaba esta interacción por lo que se concluyó que esta unión es estable. En el caso de YscP, las mutaciones

que no complementaban la secreción tipo III también eran las versiones de YscO que perdían su capacidad de interaccionar con YscP (Mukerjea & Ghosh, 2013).

Salmonella enterica presenta dos SST3 donde el primero está codificado en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella enterica* (SPI-1) donde se encuentra codificada la proteína InvI (SctO), la cual es integrante de la familia de proteínas HrpO/FliJ/YscO. Debido a su homología con FliJ se buscó determinar si también tenía la capacidad de interaccionar con chaperonas moleculares del SST3 y se determinó que efectivamente InvI interacciona con la chaperona SicA, la cual es la chaperona de los translocadores SipC y SipB (Evans & Hughes, 2009).

En *Shigella flexneri* se caracterizó a la proteína Spa13 (SctO) donde se determinó su capacidad de interaccionar con la chaperona de translocadores IpgC, esto en concordancia con lo observado para sus análogos funcionales en *Yersinia* y *Salmonella*, por lo que también se propone que Spa13 presenta la función de escoltar chaperonas en la secreción de sustratos. También, se encontró que Spa13 interacciona con la ATPasa (SctN), el aparato de exportación (SctU y SctV) y la plataforma de clasificación (SctQ) (Cherradi et al., 2014).

En *Chlamydia trachomatis* se caracterizó la proteína CT670 a la cual se le denominó CdsO (SctO) puesto que presentaba características similares con YscO. A partir del cristal de CdsO se determinó que presenta una estructura de dos hélices elongadas super enrolladas, que coincide con la estructura de los integrantes de la familia HrpO/FliJ/YscO (SctO) (Lorenzini et al., 2010).

Recientemente se resolvió la estructura del anillo nonamérico del aparato de exportación formado por la proteína CdsV (SctV) en *C. pneumoniae*. En este estudio se determinó la estructura del complejo CdsV-CdsO, se observó que CdsO interacciona con CdsV en la interfase de dos subunidades. La unión de CdsO con CdsV ocasiona ligeros cambios conformacionales en CdsV para estabilizar la interacción con CdsO. El cambio conformacional que genera CdsO en CdsV se asemeja al estado que presenta FliA (SctV) cuando está unido a los complejos chaperona/sustrato (Inoue et al., 2019; Jensen et al., 2020).

En *Pseudomonas aeruginosa*, a través de un ensayo de doble híbrido en bacteria, se detectó la interacción entre PcrG (chaperona de la proteína PcrV (SctA) localizada en el extremo distal de la aguja) y PscO. Mediante el uso de inhibidores de la FPM se determinó que PcrG y PscO modulan la FPM en la secreción de sustratos del SST3. También, se determinó que PscO y PcrD (SctV) interactúan y que su interacción no depende del estado de secreción en el que se encuentre el aparato de exportación debido a que PscO no se disocia del aparato de exportación una vez que se inicia la secreción de efectores, se propuso que el papel regulatorio de PscO sobre PcrD se lleva a cabo a través de cambios conformacionales en el transcurso de la secreción de sustratos (Lee et al., 2014).

El gen *hrpO* en *Pseudomonas syringae* tiene sintenia con el gen *fliJ* flagelar y se determinó que HrpO tiene un tamaño similar al de FliJ y una estructura predicha de hélice super enrollada. Además, se encontró que HrpO interactúa con HrpE (SctL). Estos resultados están en concordancia con lo reportado para FliJ y se concluyó que se trata de proteínas análogas (Gazi et al., 2008).

Otro análogo funcional de EscO es la proteína HrpB7 la cual es una pequeña proteína de 169 aminoácidos codificada río abajo del gen de la ATPasa *hrcN* en el operón *hrpB* de *Xanthomonas campestris* patovariedad *vesicatoria* (*Xcv*). HrpB7 (SctO) tiene una estructura de hélice super enrollada. A través de ensayos de translocación de efectores en la planta *N. benthamiana* se determinó que HrpB7 es esencial para este proceso, además, se determinó que HrpB7 no se secreta. También se encontró que HrpB7 interactúa con la ATPasa HrcN, la proteína del anillo de membrana interna HrcD, la proteína del anillo-C (plataforma de clasificación) HrcQ y con la chaperona HpaB. Mutaciones puntuales en un motivo de leucinas repetidas en HrpB7 afectaron su capacidad de interactuar con HrcD, HrcQ y HpaB indicando que la estructura de hélice super enrollada es importante para las interacciones proteína-proteína (Drehkopf et al., 2020).

Con los resultados obtenidos se consideró que HrpB7 es un integrante de la familia de proteínas HrpO/FliJ/YscO. Se observó mediante ensayos de fluorescencia que la presencia o ausencia de HrpB7 no afecta la formación del anillo-C en el

citoplasma. Sin embargo, la formación del anillo-C es dependiente de la formación de la ATPasa (Diepold et al., 2012), por lo que sugieren que el papel de SctO en la formación de la ATPasa no es una característica general de la familia de proteínas HrpO/FliJ/YscO, debido a que la ausencia de YscO y CdsO no afecta la formación del anillo-C (Diepold et al., 2012; Drehkopf et al., 2020).

➤ EscO

En *C. rodentium* se determinó que el gen *orf15* (*escO*) es esencial para la secreción de translocadores y efectores (Deng et al., 2004). Posterior a este estudio, se realizó la primera caracterización de Orf15 en EPEC, donde se confirmó que es esencial para la secreción tipo III y se observó que la proteína no se secreta. También se determinó que se localiza en la fracción de la membrana interna y en periplasma. Debido a que no se encontraron homólogos para esta proteína, se le denominó EscA. Mediante estudios de espectrometría de masas y co-inmunoprecipitación se encontró interacción de EscA (SctO) con la secretina EscC. Debido a esto, en este estudio se planteó que el papel de EscA (SctO) en el SST3 era estructural y se lleva a cabo en el periplasma (Sal-Man et al., 2012). En un trabajo posterior en EHEC se determinó que EscA interacciona con la proteína del filamento EspA, con la chaperona de sustrato temprano CesA2 (EscG), con los componentes del complejo ATPasa EscL y EscN, pero no con la chaperona CesAB ni con el complejo CesAB-EspA (Lin et al., 2014).

En el estudio en el que se comprobó que Orf15 es el análogo funcional de FliJ se denominó a la proteína como EscO. En este estudio también se determinó que la presencia de EscO incrementa la actividad catalítica de la ATPasa EscN, por lo tanto, se concluyó que EscO funciona como regulador positivo de la ATPasa. Se determinó también que EscO interacciona con EscL, el regulador negativo de la ATPasa debido a que su presencia inhibe la actividad catalítica de la ATPasa. También se determinó que EscO es una proteína citoplasmática y no periplásmica. De esta manera, se planteó un modelo para la función de EscO, en el que EscN se ancla a la base del inyector por acción de EscL después de esto EscO se une a EscN promoviendo su oligomerización, así el complejo chaperona/sustrato se une

al complejo de la ATPasa y en un proceso que coordina la hidrólisis de ATP con la fuerza protón-motriz se secretan las proteínas y, como acto final, EscO se encarga de reciclar a las chaperonas para eficientizar el proceso de secreción (Romo-Castillo et al., 2014).

Recientemente se resolvió la estructura del anillo hexamérico de EscN en EPEC. Se determinó que el anillo formado por EscN es asimétrico, esta asimetría se encuentra conservada en sus homólogos de las F/V-ATPasas. Además, se resolvió la estructura del complejo EscN-EscO donde se observó que el extremo carboxilo y amino terminal de EscO penetran alrededor de 30 Å al poro formado por el extremo carboxilo terminal de seis monómeros de EscN (Figura 11); en las F/V-ATPasas la subunidad gamma penetra el poro de la ATPasa alrededor de 70 Å. El residuo Glu401 en EscN interacciona directamente con los residuos Lys110 y Lys114 de EscO (Majewski et al., 2019). Con base en los resultados estructurales del complejo EscN-EscO, se planteó que la hidrólisis de ATP provoca una fuerza suficiente para que EscO rote en contra de las manecillas del reloj dentro del poro de la ATPasa (Figura 11), la interacción entre las lisinas de EscO y el glutamato de EscN estabilizan el torque de EscO. Además, se propone que este ciclo catalítico le permite a EscN generar diferentes cambios conformacionales donde uno de estos eventos le permitiría disociar la interacción entre una chaperona y su sustrato (Majewski et al., 2019).

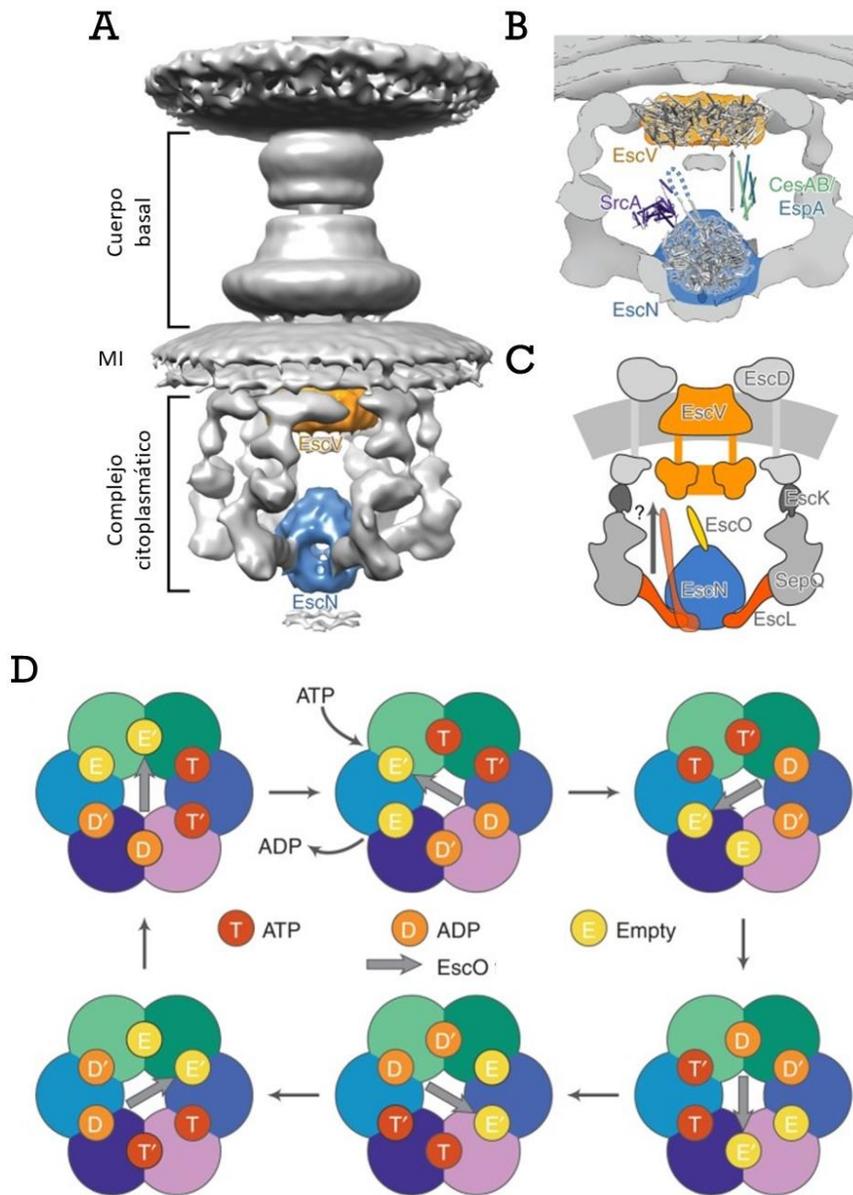


Figura 11. Funcionamiento del complejo EscN-EscO en el inyectisoma. A) Representación de la ubicación de la puerta de exportación EscV y la ATPasa EscN en el contexto del SST3 completo. B) Posibles sitios de unión para los complejos chaperona/sustrato, por ejemplo, SrcA-SsaN y CseAB-EspA-EscV. La región de EscO sin resolver en este estudio se encuentra representada con una línea punteada. C) Modelo de los componentes citoplasmáticos del SST3 en EPEC. Se

ha hipotetizado que el complejo ATPasa completo podría elevarse hacia la membrana interna e interactuar con el aparato de exportación. D) Catálisis de EscN. Se propone que el hexámero realiza diferentes cambios conformacionales conforme EscO (flecha gris) en el centro del complejo gira en contra de las manecillas del reloj. Estos cambios en EscN le permiten a la enzima pasar de un estado vacío (E y E'), unido a ATP (T y T') o unido a ADP (D y D') (Majewski et al., 2019).

Hipótesis

La proteína EscO interactúa con la plataforma de clasificación y con las chaperonas del SST3 para eficientizar el proceso de secreción de sustratos.

Objetivos

- Determinar la interacción de EscO con los componentes de la plataforma de clasificación EscQ y EscK mediante el ensayo de doble-híbrido en levadura.
- Determinar la interacción de EscO con la chaperona multicargo de efectores CesT mediante el ensayo de doble-híbrido en levadura.

Materiales y métodos

Tabla 1. Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Descripción
EPEC E2348/69 – O127:H6	Cepa prototipo de <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC). Resistente a estreptomicina (Sm ^R).
EPEC Δ escN	Cepa mutante en el gen <i>escN</i> . Sm ^R .
EPEC Δ espD	Cepa mutante en el gen <i>espD</i> . Posee un casete de resistencia a kanamicina (Km) insertado por recombinación homóloga en el sitio del gen <i>espD</i> . Km ^R y Sm ^R .
EPEC Δ sepL	Cepa mutante en el gen <i>sepL</i> . Posee un casete de resistencia a kanamicina (Km) insertado por recombinación homóloga en el sitio del gen <i>sepL</i> . Km ^R y Sm ^R .

<i>Salmonella</i> JR501	Cepa utilizada para convertir plásmidos a compatibilidad con <i>Salmonella</i> .
<i>Salmonella</i> SJW1368	Cepa mutante en el operón maestro ($\Delta cheW-flhD$), utilizada para producir proteínas codificadas en el vector pTrcHisA.
<i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS (BDP)	Cepa derivada de <i>E. coli</i> B, carece de las proteasas Lon y OmpT esto ayuda a una mejor expresión de los 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 es resistente a cloranfenicol (Cm ^R).
<i>S. cerevisiae</i> PJ69-4 a/ α	Cepa reportera utilizada en el ensayo de doble híbrido (MATa/ α <i>trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>).
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Cepa derivada de <i>E. coli</i> K-12. Mutante en la endonucleasa I, esto 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. Cepa eficiente para las transformaciones. Resistente a tetraciclina (Tc ^R).
<i>E. coli</i> Top 10	Cepa eficiente para las transformaciones. Posee una eliminación parcial del gen <i>lacZ</i> ; lo que permite la α - complementación. Sm ^R .

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmidos	Descripción
pTrcHisA	Vector de expresión. Permite la producción de proteínas recombinantes con una etiqueta de 6 histidinas en el amino terminal. Resistencia a Ampicilina (Amp ^R).

pNTHisespDCt	Construcción en pTrcHisA para la expresión de la versión del extremo carboxilo terminal de EspD con una etiqueta de 6 histidinas (His-EspD _C).
pGADT7	Vector para el ensayo de doble híbrido. Contiene el dominio de activación de GAL4. <i>LEU2</i> .
pGBKT7	Vector para el ensayo de doble híbrido. Contiene el dominio de unión a DNA de GAL4. <i>TRP1</i> .
pGBKT7-Lam	Construcción en pGBKT7 la cual codifica una fusión del dominio de unión a DNA de GAL4 con la proteína lamin C de humano.
pGBKT7-53	Construcción en pGBKT7 la cual codifica una fusión del dominio de unión a DNA de GAL4 con la proteína p53 de roedor.
pGADT7-T	Construcción en pGADT7 la cual codifica una fusión del dominio de activación de GAL4 con el antígeno T largo del virus 40 de simio (SV40).
pGADescQ	Construcción en pGADT7 la cual codifica una fusión del dominio de activación de GAL4 con la proteína del anillo citoplasmático EscQ.
pGADcesT	Construcción en pGADT7 la cual codifica una fusión del dominio de activación de GAL4 con la chaperona molecular CesT.
pGADescK	Construcción en pGADT7 la cual codifica una fusión del dominio de activación de GAL4 con la proteína adaptadora EscK.
pGBKescO	Construcción en pGBKT7 la cual codifica una fusión del dominio de unión a DNA de GAL4 con el regulador positivo de la ATPasa EscO.
pGBKcesT	Construcción en pGBKT7 la cual codifica una fusión del dominio de unión de GAL4 con la chaperona molecular CesT.
pGBKescK	Construcción en pGBKT7 la cual codifica una fusión del dominio de unión de GAL4 con la proteína adaptadora EscK.
pGADescO	Construcción en pGADT7 la cual codifica una fusión del dominio de activación a DNA de GAL4 con el regulador positivo de la ATPasa EscO.

Los plásmidos descritos en la Tabla 2 se transformaron en la cepa XL1 – Blue o JR501, según el caso, y se purificaron mediante el uso del kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Se realizó el procedimiento descrito por el proveedor.

Tabla 3. Medios de cultivo utilizados en este estudio.

Medio de cultivo	Descripción
Luria Bertani (LB)	Medio enriquecido para el crecimiento de bacterias.
SOB	Medio enriquecido para la preparación y transformación de bacterias competentes.
SOC	Medio SOB más Glucosa (en un proporción 1/50). Utilizado para la recuperación de células transformadas.
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Medio utilizado en el ensayo de secreción de EPEC, este medio tiene la capacidad de inducir el SST3 de EPEC (Kenny et al., 1997).
YPD	Medio con extracto de levadura, peptona y dextrosa. Utilizado para el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> PJ69-4 a/ α
YPD + Glucosa	Medio YPD más glucosa a una concentración final de 2%. Utilizado en el ensayo de doble híbrido.
Medio sintético definido (SD)	Medio para cultivar levaduras, el cual no contiene aminoácidos específicos para poder seleccionar fenotipos auxótrofos de las levaduras transformadas.
Medio SD -L	Medio SD sin leucina. Para seleccionar levaduras transformadas con pGADT7.
Medio SD -W	Medio SD sin triptófano. Para seleccionar levaduras transformadas con pGBKT7
Medio SD -L -W	Medio SD sin leucina y triptófano. Para seleccionar levaduras que contengan los plásmidos pGADT7 y pGBKT7.

Medio SD -L -W -H	Medio SD sin leucina, triptófano e histidina. Para determinar si hubo una interacción de proteínas en el ensayo de doble híbrido.
-------------------	---

➤ Doble híbrido en levadura

Transformación de levaduras. Se estrió a las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4a/ α en cajas con medio YPD (extracto de levadura-peptona-dextrosa) y se incubó los medios a 30 °C durante 3 días. A partir de colonias aisladas de las cepas α y α se sembró para cada una, 4 mL de YPD más glucosa (YPD+Glu) y se incubó los cultivos por aproximadamente 20 horas a 30°C en una gradilla giratoria. Al día siguiente, se inoculó un cultivo para cada cepa de 15 mL de YPD+Glu con 1.5 mL del precultivo correspondiente, se incubó a 30 °C durante 6 horas con agitación constante. Después de este tiempo se midió la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de los cultivos, una vez alcanzada una DO_{600nm} de 0.8 a 1.0 se continuó con el protocolo. Los cultivos se centrifugaron 6 minutos a 6000 rpm, la pastilla celular de cada cepa se resuspendió en 15 mL de agua estéril Milli-Q. Se centrifugó de la misma manera, se resuspendió las pastillas celulares en 15 mL de acetato de Litio 0.1 M y se incubó las células 10 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se tomó 6 alícuotas de 1 mL de la cepa PJ69-4a para transformar pGADescQ, pGADcesT, pGADescK, pGADescO, pGADT7-T y pGADT7. Al mismo tiempo se tomó 5 alícuotas de 1 mL de la cepa PJ69-4 α para transformar pGBKcesT, pGBKescK, pGBKescO, pGBKT7-Lam y pGBKT7-53. Cada alícuota se centrifugó a velocidad máxima por 2 minutos y se retiró el sobrenadante. A cada pastilla celular se le adicionó los siguientes reactivos, en este orden: 78 μ L agua estéril Milli-Q, 36 μ L acetato de Litio 1 M, 5 μ L DNA de cadena sencilla de esperma de salmón (ssDNA de salmón, previamente hervido), 2 μ L de plásmido y 240 μ L polietilenglicol 4000 (PEG 4000) al 50%. Una vez adicionados todos los reactivos se dio un choque térmico a 42 °C durante 45 minutos, cada 10 minutos se agitó las mezclas con un vórtex. Después del choque térmico se centrifugó los tubos a velocidad máxima durante 2 minutos. Se resuspendió las pastillas celulares en 1 mL de agua estéril Milli-Q. A partir de estas suspensiones se tomaron las alícuotas

correspondientes para sembrar las levaduras. Para seleccionar a las levaduras transformadas se sembró la cepa PJ69-4a en medio sintético definido (SD) sin leucina (SD-Leu) y la cepa PJ69-4 α en medio SD-Trp (sin triptófano), se incubó a 30 °C durante 3 – 4 días. A partir de las colonias aisladas de las levaduras ya transformadas se seleccionaron 4 colonias por cada plásmido transformado y se realizaron con cada colonia un parche en su medio SD respectivo. Se incubaron a 30 °C durante 2 días.

Apareamiento de levaduras. A partir de los parches de las levaduras transformadas se sembraron 2 mL de medio YPD+Glu por cada pareja de proteínas que se va a evaluar su interacción. También se sembró los tubos con los controles, donde el control positivo es la interacción entre p53 y el antígeno T largo del virus 40 de simio (SV40), el control negativo es la ausencia de una interacción entre el antígeno T largo del SV40 y la proteína lamin C de humano y, por último, el control de autoactivación para cada interacción. Este último control consta de evaluar si el dominio de unión unido a una proteína de interés por si sola induce la expresión de los genes reporteros. De esta manera, se aparean la levadura transformada con la construcción que contiene la proteína de interés clonada en pGBKT7 junto con la levadura transformada con el vector pGADT7.

Después de colocar en cada tubo la pareja de levaduras correspondiente, se agitó los tubos en un vórtex y se incubó a 30 °C con agitación constante durante aproximadamente 6 horas. Después de este tiempo se tomaron 100 μ L del medio y se diluyeron con 900 μ L de agua estéril. A partir de esta dilución se sembró las levaduras apareadas en medio SD -L -W y se incubó a 30 °C durante 3 – 4 días.

Ensayo de interacción de proteínas. A partir de las colonias aisladas del apareamiento se estrió en cajas con medio SD -L -W y SD sin leucina, triptófano ni histidina (SD -L -W -H). De esta manera, por cada interacción se sembraron dos cajas la primera SD -L -W y la segunda SD -L -W -H, donde la primera sirve para comprobar el crecimiento de las levaduras y la segunda determina si se llevó a cabo la interacción entre proteínas. En cada caja se sembró, en este orden, el control positivo, control negativo, control de autoactivación correspondiente, y cinco

colonias aisladas del apareamiento (Figura 14). Se incubaron las cajas 30 °C durante 3 – 9 días.

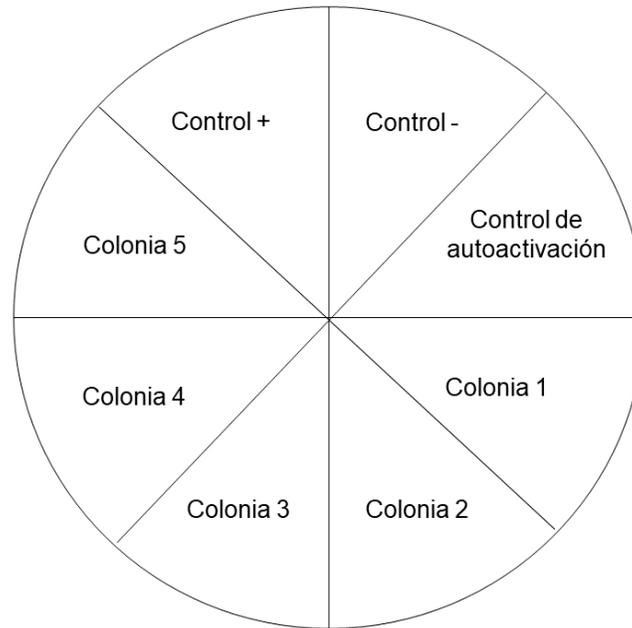


Figura 12. Esquema de las estrías realizadas para el ensayo de doble híbrido en levadura. El control + es la interacción entre p53 y el antígeno T largo del virus 40 de simio (SV40), el control - es la ausencia de una interacción entre el antígeno T largo del SV40 y lamin C de humano y el control de autoactivación es la proteína de interés unida al dominio de unión de GAL4 con el vector pGADT7.

➤ Inducción de proteínas

Inducción de proteínas. Se transformó a la cepa *Salmonella* SJW1368 con el plásmido pNTHisespDCt, esta construcción produce la versión del extremo carboxilo terminal de EspD con una etiqueta de 10 histidinas (His-EspD_C). Se tomó una colonia transformada y se inoculó en 15 mL de medio Luria Bertani (LB) con ampicilina (100 µg/mL). Se incubó el cultivo durante toda la noche (overnight; o/n) a 37 °C con agitación constante. A partir de este cultivo se inoculó 2 cultivos de 250 mL de LB más ampicilina (100 µg/mL) con 5 mL, se incubó a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0.6 a 0.8. Una vez alcanzado este valor se adicionó al cultivo IPTG (isopropil-β-D-1-

tiogalactopiranosido) para una concentración final de 0.5 mM. Después de esto se incubó el cultivo durante 4 horas a 30 °C. Al terminar este tiempo se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente (T_{amb}), se retiró el sobrenadante y se congeló la pastilla celular. Este mismo procedimiento se realizó para la inducción de His-EspD_C en la cepa *E. coli* BL21 DE3 pLysS (BDP).

➤ Purificación de proteínas

Purificación de His-EspD_C. Se descongeló la pastilla celular con His-EspD_C inducido y se adicionó 25 mL de *Binding Buffer* 1x (BB 1x; contiene TRIS 20 mM y NaCl 500 mM) también se agregó el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1 mM. Después de 10 min se resuspendió la pastilla celular en la disolución. Para lisar a las células se sonicó durante 1:30 min mediante pulsos de 15 segundos con un intervalo de un minuto entre cada pulso. Después se centrifugó a 4 °C durante 30 minutos a 11000 rpm. Se desechó la pastilla y del sobrenadante se tomaron 100 µL, esta alícuota se denominó la fracción soluble (FS).

A 150 µL de la resina de Níquel (Ni-NTA, Marca QIAGEN) se adicionó 2 mL de BB 1x. Después se centrifugó la resina a 3500 rpm durante 5 min a T_{amb} , se retiró el amortiguador y se repitió el procedimiento. Una vez realizado el segundo lavado de la resina, ésta se resuspendió en 300 µL de BB 1x.

Se adicionó la resina al sobrenadante de donde se tomó la FS y se incubó a 4 °C con agitación constante durante 2 horas. Después de este tiempo el sobrenadante con la resina se pasó a través de una columna previamente lavada con 5 mL de BB 1x. La resina se retuvo por la columna permitiendo que pasaran solamente las proteínas que no se unieron a la resina, a esta disolución se le denominó fracción no unida (FNU). Posteriormente, se realizaron 3 lavados, el primer lavado (L1) se realizó con BB 1x, el segundo (L2) se realizó con BB 1x más imidazol al 20 mM y, por último, el tercer lavado (L3) se realizó con BB 1x más imidazol al 40 mM. En los tres lavados se utilizaron 20 mL del amortiguador respectivo, además se tomaron alícuotas de 1.5 mL de cada lavado. Una vez que se retiró todo el amortiguador restante de la columna se eluyó a las proteínas, donde se adicionó BB 1x con concentraciones crecientes de imidazol. De esta manera, se adicionó alícuotas de

500 μ L de BB 1x con imidazol al 100 mM, 200 mM, 300 mM y 500 mM. Después se evaluó la purificación de la proteína mediante una electroforesis (SDS-PAGE).

➤ Diálisis, concentración y cuantificación de proteínas purificadas

Diálisis. Se juntó las eluciones obtenidas a través de la columna de afinidad con mayor cantidad de proteína y se introdujo las muestras en una membrana que retiene proteínas con un peso molecular mayor a 6 – 8 000 Da (Molecular Weight Cut Off (MWCO): 6 – 8 000). De esta manera, se realizó 3 lavados de aproximadamente con 500 mL del amortiguador PBS 1x a 4 °C durante 3 horas cada uno.

Concentración de proteínas. La muestra ya dializada se trasladó a un flitro Amicon Ultra – 15 con un MWCO: 10 000. Se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 7500 x g. Con amortiguador PBS 1x se recuperó la proteína que fue retenida por el filtro, de esta manera, se concentró la muestra en aproximadamente 500 μ L. Se realizó un SDS – PAGE para determinar la presencia de la proteína de interés en el concentrado.

Cuantificación de proteínas por el método TCA – Lowry. A las muestras de proteína se les adicionó 100 μ L de ácido deoxílico al 0.15% y 100 μ L de TCA al 72% para precipitarlas. Después se centrifugó 10 min a 10 000 rpm para separarlas del sobrenadante. A continuación, se adicionó a cada muestra 1 mL de una disolución que contiene CuSO_4 , citrato de sodio, Na_2CO_3 y NaOH. Después de 10 min, se adicionó 100 μ L del reactivo de Folin a cada muestra. La reacción se llevó a cabo durante 20 minutos, después de esto se determinó la absorbancia a cada tubo a 750 nm. Con estos datos se calculó la cantidad de proteína. La curva patrón para este ensayo se realizó con la albumina sérica bovina (BSA).

➤ Transformación y purificación de plásmidos

Preparación de células competentes por el método de cloruro de calcio (CaCl_2). Este procedimiento se utilizó para preparar células competentes de las cepas *E. coli* Top 10, XL1-Blue y BDP, así como de *Salmonella* JR501 y SJW1368. A partir de una colonia aislada de la cepa se sembró un precultivo de 2 mL el cual se incubó durante la noche (overnight, o/n) a 37 °C con agitación constante. Después, se inoculó un

cultivo de 20 mL de LB con 200 μ L del precultivo, se incubó a 37 °C con agitación constante durante aproximadamente 2 horas o hasta que el valor de la DO_{650} esté dentro del intervalo 0.3 – 0.5. De esta manera, se centrifugó el cultivo a 4 °C durante 5 minutos a 8000 rpm. Una vez terminado este tiempo se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular con 20 mL de $CaCl_2$ 100 mM. Después de esto, se volvió a centrifugar de la misma manera. La pastilla celular se resuspendió en 2 mL de $CaCl_2$ 100 mM y se dejó a las células a 4 °C durante mínimo 2 horas (Se puede dejar a las células en estas condiciones hasta 24 horas para aumentar la eficiencia de transformación). Después de este tiempo las células ya están listas para utilizarse.

Transformación por choque térmico. Se tomó una alícuota de 200 μ L de las células competentes y se adicionó el volumen correspondiente del plásmido que se desea transformar. Se incubó las células con el plásmido una hora a 4 °C. A continuación, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos, al terminar este tiempo se dejaron las células 3 minutos en hielo y después se adicionaron 800 μ L de medio LB o medio SOC. Se incubó a 37 °C durante una hora y, posteriormente, se sembró las células en medio LB más el antibiótico necesario para seleccionar a las células transformadas con el plásmido de interés.

Purificación de plásmidos. A partir de las colonias seleccionadas en el medio con el antibiótico correspondiente se inocula un cultivo de 5 mL con los antibióticos necesarios y se incuba a 37 °C con agitación constante durante toda la noche. Después de este tiempo se utiliza el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo del proveedor se purifican los plásmidos. Se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar la purificación de los plásmidos.

➤ Ensayo de secreción

En este ensayo se evalúa la secreción de proteínas dependiente del sistema de secreción tipo III en EPEC y sus mutantes. Se preparó cultivos para cada cepa que se deseé evaluar de 3 mL del medio LB más estreptomycin a una concentración final de 50 μ g/mL. Se adicionó kanamicina como un segundo antibiótico a una

concentración final de 50 µg/mL, esto para las cepas *ΔespD* y *ΔsepL*. Se incubó los cultivos o/n a 37 °C con agitación constante, además se preincubó o/n 6 mL de medio DMEM para cada cepa a 37 °C con 5% de CO₂. Al día siguiente, se inoculó los medios DMEM con 120 µL del precultivo (proporción 1/50) y con 60 µL de medio LB (proporción 1/100). Se incubó los medios a 37 °C con 5% de CO₂ durante aproximadamente 4 horas o hasta que se obtuvo una DO₆₀₀ dentro del rango 0.8 – 1.0.

Después, se marcó 3 tubos Eppendorf de 1.5 mL para cada cepa (p. ej. 1 a 3) también se marcó un tubo de ensayo para cada cepa. A partir del cultivo DMEM, se colocó 1 mL en los tubos Eppendorf denominados como **1** y **3**. Se centrifugó los tubos marcados como **1** a 10 °C durante 2 minutos a 15000 rpm. El sobrenadante se retiró del tubo **1** y se colocó en el tubo marcado como **2**. Las pastillas celulares en el tubo **1** de cada cepa se guardó a 4 °C. Se centrifugó los tubos **2** y **3** de la misma manera. Se retiró el sobrenadante del tubo **2** y se colocó en el tubo de ensayo, además el sobrenadante del tubo **3** se colocó en el tubo **2**. A continuación, se adicionó 1 mL del medio DMEM de cada cepa al tubo **3** correspondiente y se centrifugó los tubos **2** y **3** como se describió anteriormente. De esta manera, estos pasos se repiten hasta que el medio DMEM de cada cepa se termine.

Una vez centrifugado todo el medio DMEM se prosiguió a precipitar las proteínas presentes en el sobrenadante. Así, a cada tubo de ensayo se adicionó 600 µL de ácido tricloro acético (TCA), esto es en una proporción 1/10. Estos tubos se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Después, se centrifugó las proteínas a 4 °C durante 30 min a 15000 rpm. El sobrenadante se retiró con vacío y se desechó.

Las pastillas celulares y las proteínas precipitadas se resuspendieron con amortiguador de carga. A continuación, se adicionó a cada muestra 3 µL de TRIS saturado y β-mercaptoetanol (3 µL para las proteínas precipitadas y 5 µL para las pastillas celulares). Después, se hirvió las muestras por 5 minutos y se mezcló en un vórtex. Por último, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% a 90 V durante aproximadamente 2 horas. De esta manera, una vez

que el gel se tiñó con azul de Coomassie y se destiñó con un tratamiento de metanol y ácido acético, se pudo observar el perfil de secreción de la cepa.

➤ Inmunodetección Western Blot.

Para la detección de proteínas, las muestras se separaron por un SDS – PAGE al 15 % de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 4 °C durante 2 horas a 70 V. Después, se bloqueó las membranas con una solución TBS–Tween–leche (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Tween 20 y 5% leche). A continuación, se analizó las membranas con el anticuerpo policlonal anti-EspD (α -EspD) a una dilución 1:12 500, esta dilución contiene 20 mM de Tris, 250 mM NaCl y 2.4% de leche. Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*horseradish peroxidase*) detectan anticuerpos provenientes de conejo (*goat anti-rabbit*, GAR), estos anticuerpos secundarios son generados en cabra.

➤ Esquema de Inmunización.

Se realizó la producción de un anticuerpo policlonal anti-EspD en conejo. Esto se llevó a cabo mediante dos inmunizaciones vía subcutánea con His-EspD_c purificada, dializada y concentrada (Tabla 4).

Tabla 4. Esquema de inmunización en conejo con His-EspD_c.

Fecha	Cantidad de proteína	Sangrados
7/Febrero/2020	100 μ g de His-EspD _c más 400 μ L de adyuvante completo de Freud.	Se tomó la sangría de prueba.
28/Febrero/2020	100 μ g de His-EspD _c más 500 μ L de adyuvante incompleto de Freud.	-
21/Marzo/2020	-	Se sangró a blanco.

Resultados

- Purificación de las construcciones para el ensayo de doble híbrido en levadura.

Las construcciones en los plásmidos pGBKT7 y pGADT7 (Tabla 2) necesarios para el ensayo de doble híbrido en levadura se transformaron mediante el método de cloruro de calcio y se purificaron mediante el uso del kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) (Figura 13).

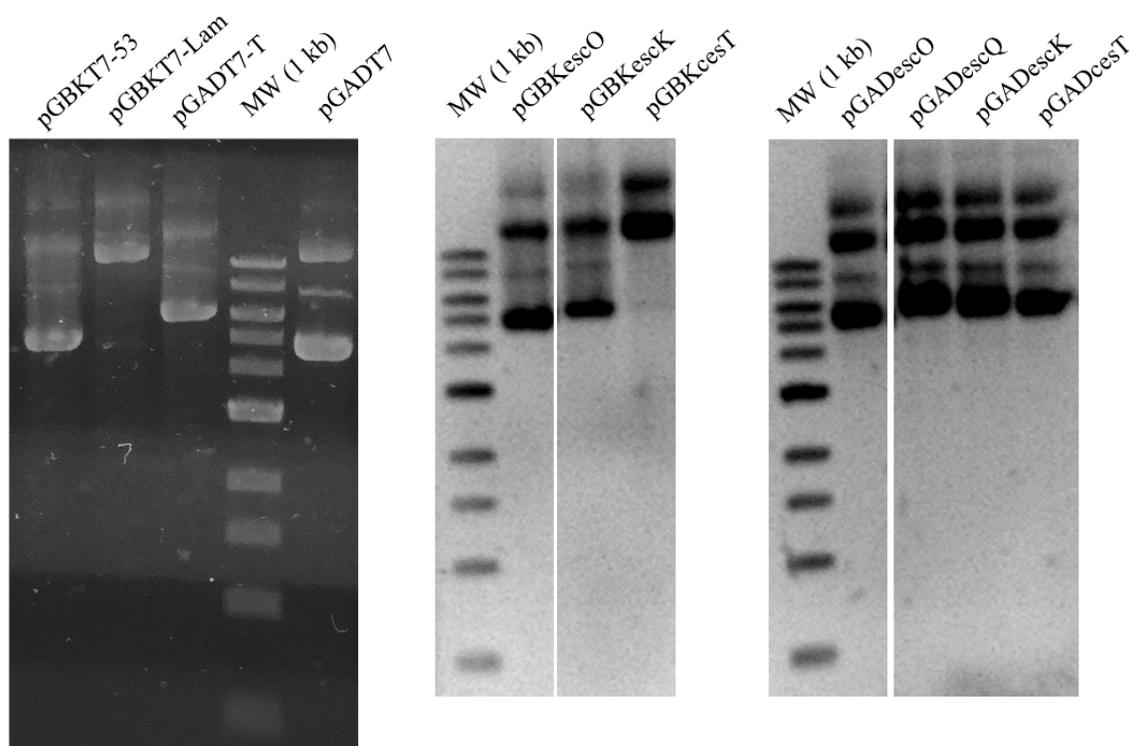


Figura 13. Purificación de los plásmidos necesarios para el ensayo de doble híbrido de levadura. Se cargaron en el gel de agarosa al 1%, 5 μ L de cada muestra.

- EscO no interacciona con CesT en el ensayo de doble híbrido en levadura. Para determinar con qué componentes citoplasmáticos del SST3 interacciona EscO se utilizó el ensayo de doble híbrido en levadura el cual permite determinar interacciones entre proteínas *in vivo* en la cepa de la levadura *S. cerevisiae* PJ69-4a/ α . De esta manera primero se determinó si EscO era capaz de interaccionar con la chaperona de efectores CesT. Para descartar la posibilidad de que una de las versiones de EscO o CesT unida con uno de los dominios de GAL4 estuviera

afectando la posible interacción entre proteínas se probó la interacción con las proteínas unidas a cada dominio de GAL4. Esto quiere decir que se trabajó con dos versiones de EscO, una versión unida al dominio de activación y otra al dominio de unión de GAL4; lo mismo para CesT.

En las dos orientaciones no se observó crecimiento de la levadura en el medio SD -L -W -H después de ocho días (Figura 14). Esto quiere decir que EscO y CesT no interaccionan *in vivo* o que la interacción de estas proteínas es débil y no se observan en éste.

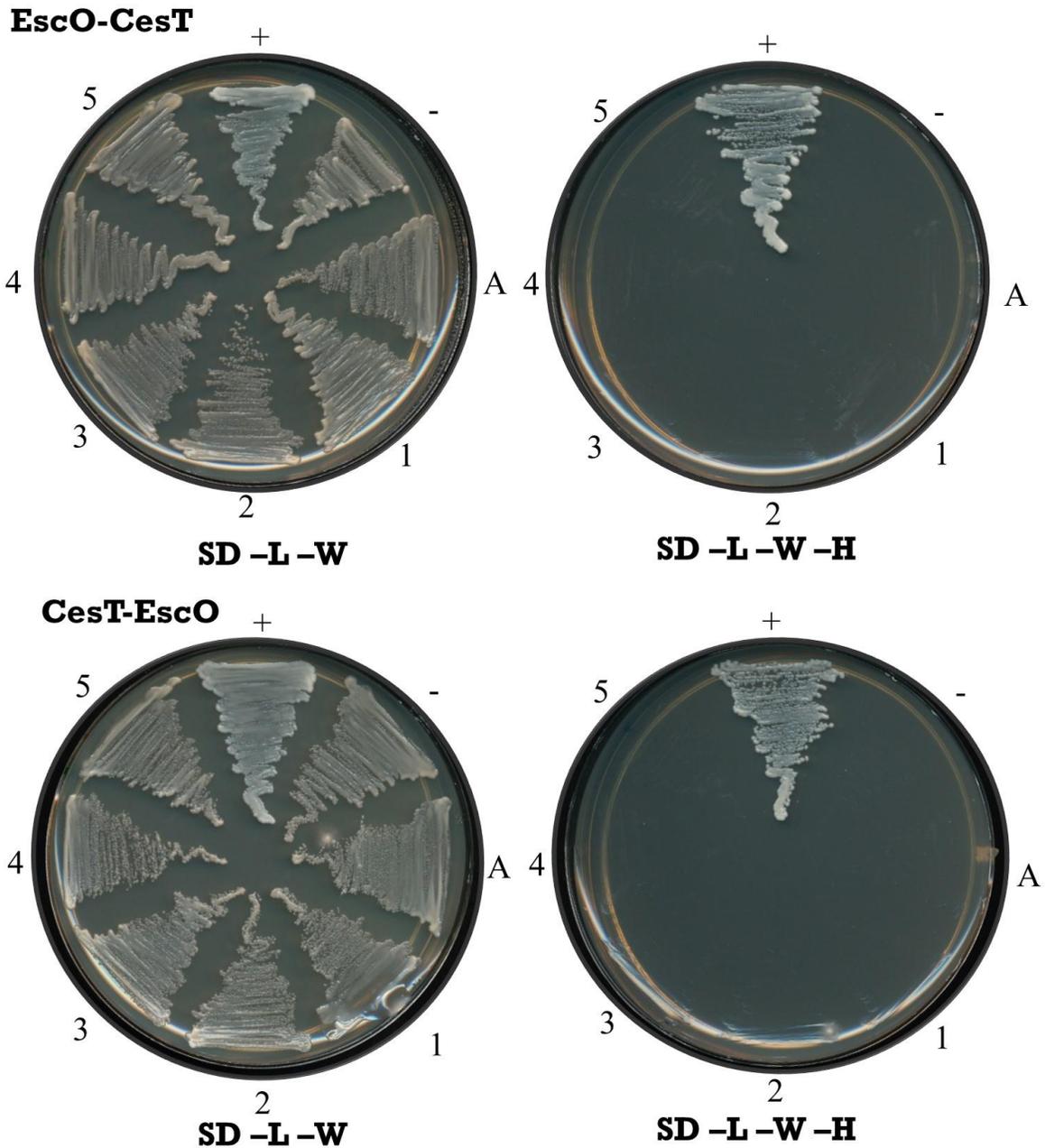


Figura 14. EscO no interacciona con CesT en el ensayo de doble híbrido en levadura. EscO-CesT indica que se realizó el ensayo con la levadura que contiene las construcciones pGBKescO y pGADcesT. De la misma manera, CesT-EscO indica que la levadura contiene las construcciones pGBKcesT y pGADescO. En el medio SD -L -W se estriaron las levaduras como control de crecimiento y en el medio SD -L -W -H se estriaron para determinar la presencia de una interacción. +: control positivo, -: control negativo, A: control de autoactivación y 1 – 5: número de colonia

con la que se determinó la presencia o ausencia de la interacción entre proteínas. El ensayo se repitió tres veces.

➤ EscO no interacciona con EscK en el ensayo de doble híbrido en levadura. También se buscó determinar si EscO es capaz de interactuar con componentes de la plataforma de clasificación como lo es EscK. De la misma manera que para CesT, se trabajó con las dos orientaciones para la interacción entre EscO y EscK. En este caso tampoco se observó crecimiento en el medio SD -L -W -H de ninguna de las colonias probadas, por lo tanto, la interacción entre EscO y EscK es una interacción débil o no se pudo determinar la presencia de esta en el ensayo de doble híbrido en levadura (Figura 15).

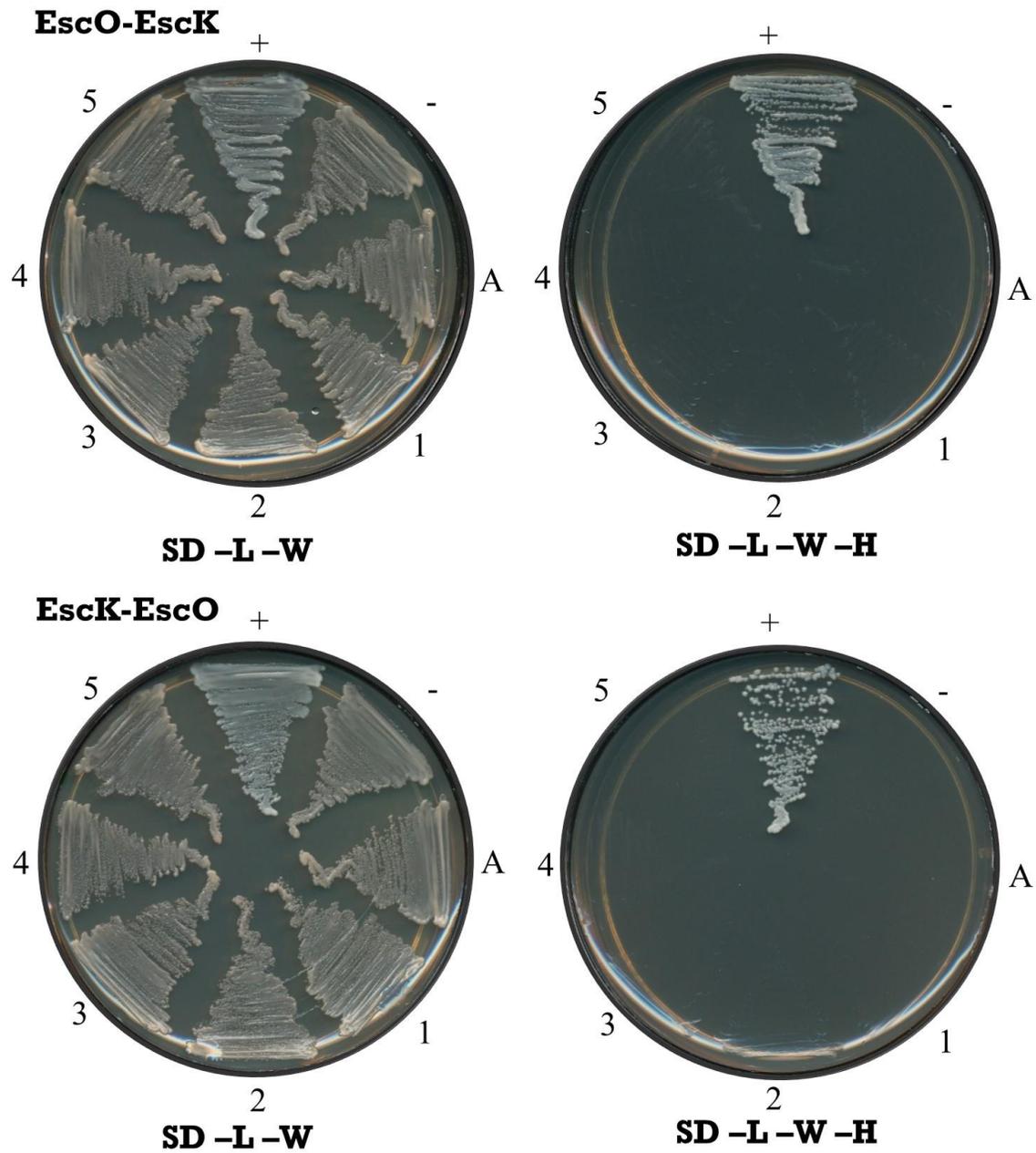


Figura 15. EscO no interacciona con EscK en el ensayo de doble híbrido en levadura. EscO-EscK indica que se realizó el ensayo con la levadura que contiene las construcciones pGBKescO y pGADescK. De la misma manera, EscK-EscO indica que la levadura contiene las construcciones pGBKescK y pGADescO. En el medio SD -L -W se estriaron las levaduras como control de crecimiento y en el medio SD -L -W -H se estriaron para determinar la presencia de una interacción. +: control positivo, -: control negativo, A: control de autoactivación y 1 – 5: número de colonia

con la que se determinó la presencia o ausencia de la interacción entre proteínas. El ensayo se repitió tres veces.

➤ EscO y EscQ interaccionan en el ensayo de doble híbrido en levadura.

Otro componente importante de la plataforma de clasificación es la proteína que forma el anillo-C, EscQ. Para determinar si es capaz de interaccionar con EscO se utilizó una versión de EscQ unida al dominio de activación de GAL4 y una versión de EscO unida al dominio de unión de GAL4.

En este caso, EscO y EscQ si interaccionan en el ensayo de doble híbrido en levadura (Figura 16). Esto es cierto debido a que en el medio SD -L -W -H sí se observa crecimiento de las cinco colonias probadas de la levadura que contiene las versiones de EscQ y EscO. Este crecimiento se pudo observar desde los dos días de incubación, esto indica que la interacción en *S. cerevisiae* es una interacción fuerte. El ensayo permite determinar esto debido a que la interacción en el control positivo (ver materiales y métodos) es una interacción fuerte que presenta crecimiento en 3 días.

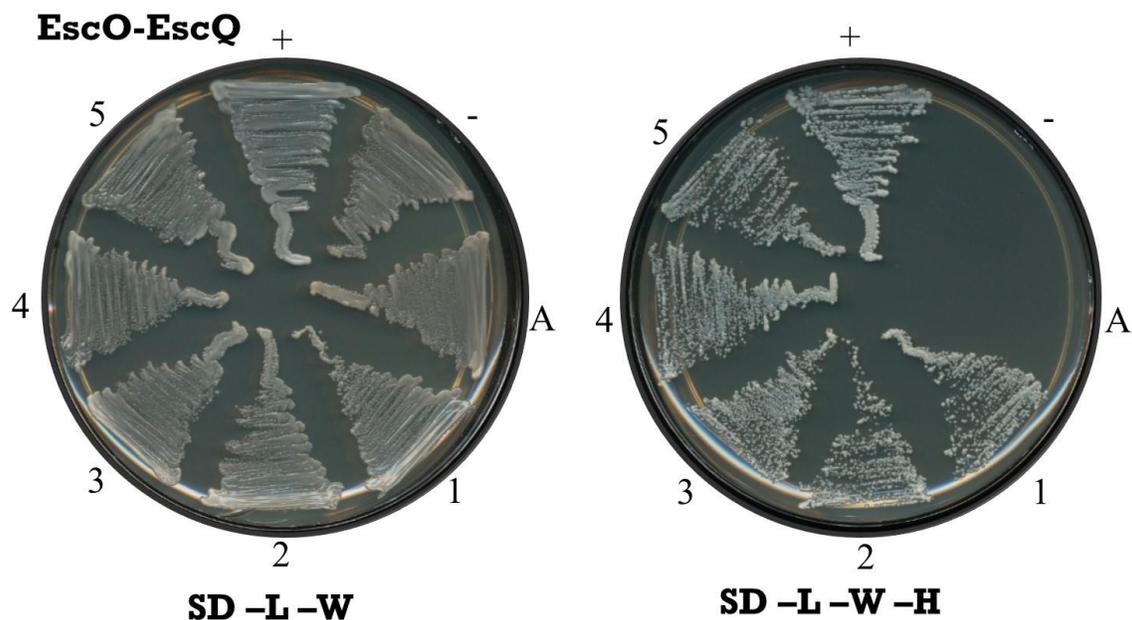


Figura 16. EscO interacciona con EscQ en el ensayo de doble híbrido en levadura. EscO-EscQ indica que se realizó el ensayo con la levadura que contiene las construcciones pGBKescO y pGADescQ. En el medio SD -L -W se estriaron las

levaduras como control de crecimiento y en el medio SD -L -W -H se estriaron para determinar la presencia de una interacción. +: control positivo, -: control negativo, A: control de autoactivación y 1 – 5: número de colonia con la que se determinó la presencia o ausencia de la interacción entre proteínas. El ensayo se repitió tres veces.

Herramientas moleculares generadas en este estudio

- Amplificación de un fragmento del gen *espD_C*.

Se amplificó a través de una PCR la región del gen *espD* que codifica para el carboxilo terminal de la proteína a partir del cromosoma de EPEC E2348/69 usando los oligonucleótidos *EspDCtBam* (5'– ggcgatcctcttcacttatct–3') y *EspDCtEco* (5'– cgctctgaattcttaaactcga–3'). Se obtuvo un producto del PCR el cual migra por arriba de las 400 pb esto en concordancia con el tamaño esperado de 410 pb (Figura 17).

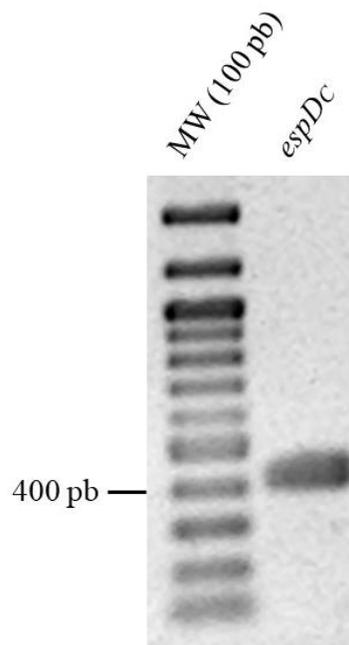


Figura 17. Amplificación de la región carboxilo terminal del gen *espD* (*espD_C*). MW: marcador molecular.

- Clonación del fragmento de *espD* en el vector pMiniT2.

Se utilizó el kit Quick Ligation™ (New England Biolabs) para ligar el producto de PCR purificado al vector pMiniT2 siguiendo las indicaciones del proveedor. Después

se transformó en las células *E. coli* Top10 el vector pMiniT2 con *espD_C* por el método de cloruro de calcio. A partir de las colonias obtenidas se seleccionaron tres y se purificó el DNA plasmídico a partir de cada colonia usando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Mediante una reacción de digestión y secuenciación se corroboró la presencia de *espD_C* en el vector pMiniT2 (Figura 18).

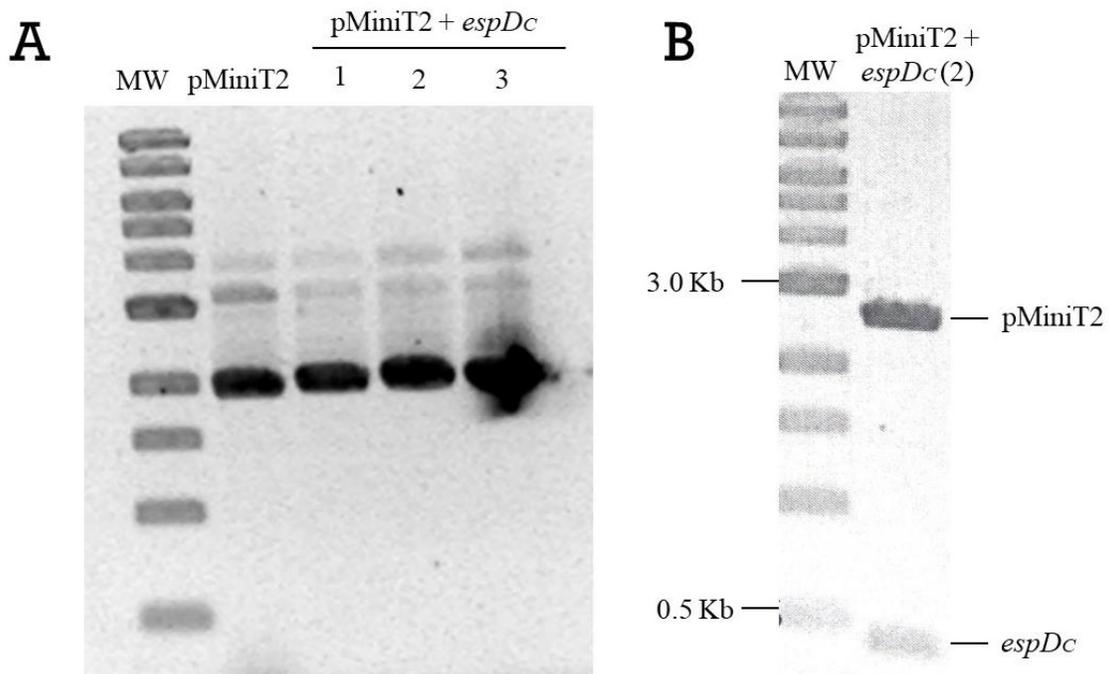


Figura 18. Clonación de *espD_C* en el vector pMiniT2. A) Purificación del DNA plasmídico de las colonias (1 – 3) transformadas con la ligación (pMiniT2 + *espD_C*). B) Digestión para confirmar la presencia del inserto, se utilizó el segundo plásmido purificado para esta reacción (pMiniT2 + *espD_C* (2)). MW: marcador molecular.

➤ Subclonación de *espD_C* en el vector pTrcHisA.

A partir de la versión de pMiniT2 con *espD_C* (pMini + *espD_C*) y del vector pTrcHisA, el cual contiene una etiqueta de seis histidinas, se realizó una reacción de digestión durante toda la noche a 37 °C con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI-HF. Después de esto se corrieron las digestiones en un gel de agarosa al 0.8% durante 2 horas a 60 V (Figura 19), posteriormente se cortó del gel las bandas correspondientes a pTrcHisA linearizado y *espD_C* y se purificaron con el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), en la Figura 20 se observan las muestras purificadas.

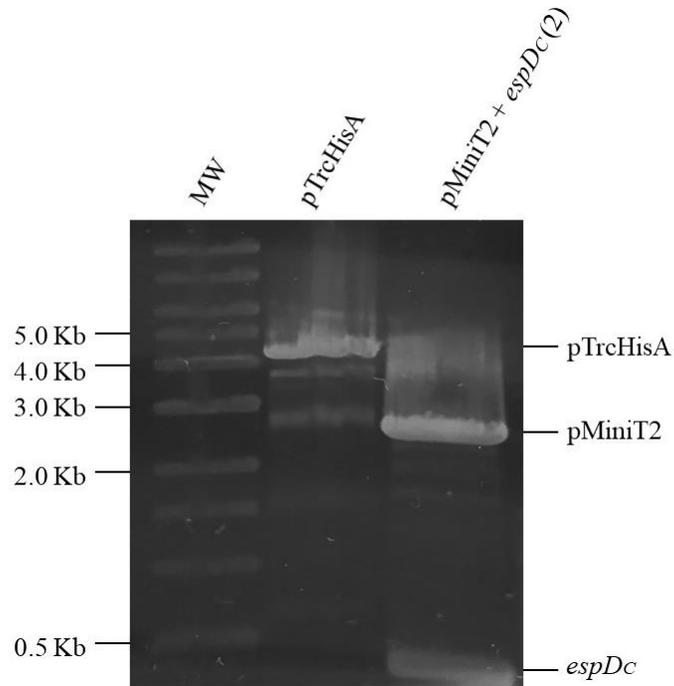


Figura 19. Digestión del vector pTrcHisA y pMini + *espD_C*. Este último es el segundo plásmido purificado a partir de la primera clonación (Figura 18). En los carriles con las digestiones se cargó en el gel la reacción completa (40 μ L). MW: marcador molecular.

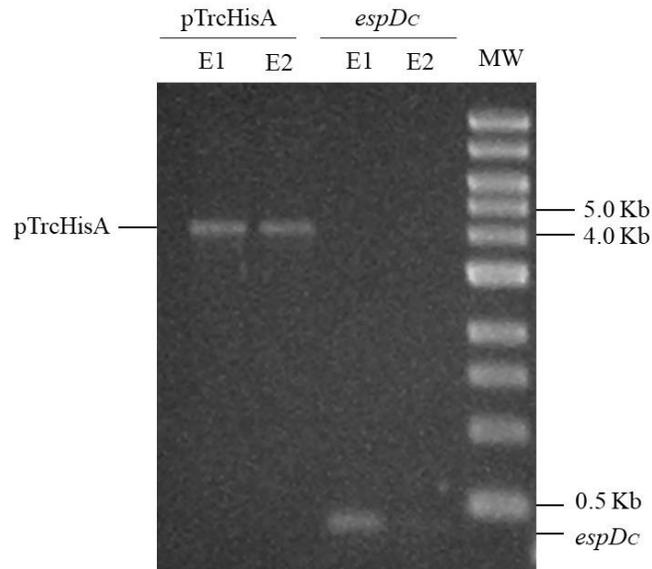


Figura 20. Purificación de pTrcHisA linearizado y *espD_C*. Siguiendo las indicaciones del proveedor (QIAGEN) se realizaron dos eluciones (E1 y E2) en cada purificación. MW: marcador molecular.

Se prosiguió con la ligación de *espD_C* en pTrcHisA, donde se utilizaron las fracciones E1 de cada muestra. La reacción de ligación se llevó a cabo a 16 °C durante 18 horas, después el volumen completo de la reacción se transformó en células competentes *E. coli* Top 10 y se tomaron tres colonias de las cuales se purificó su DNA plasmídico y se compararon con el vector vacío (pTrcHisA, Figura 21A), donde se observa que las tres colonias contienen una versión del vector con un mayor peso molecular. A través de una reacción de digestión se comprobó la presencia del gen *espD_C* (Figura 21B), además esto se confirmó con la secuenciación del plásmido.

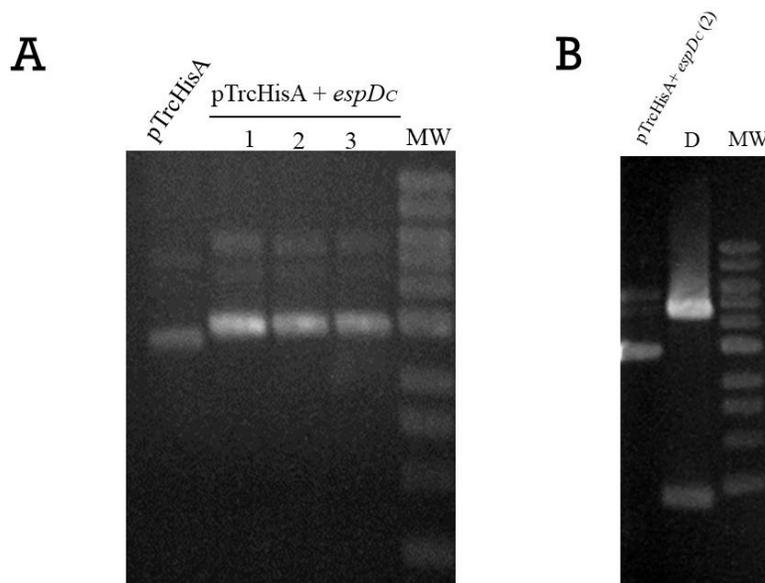


Figura 21. Subclonación de *espD_C* en pTrcHisA. A) Purificación del DNA plasmídico de las colonias (1 – 3) transformadas con la ligación (pTrcHisA + *espD_C*). B) Digestión (D) para confirmar la presencia del inserto, se utilizó el segundo plásmido purificado para esta reacción (pTrcHisA + *espD_C* (2)). MW: marcador molecular.

➤ Predicción del peso molecular del carboxilo terminal de EspD (EspD_C).

De acuerdo con la secuencia del fragmento EspD_C clonada en el vector pTrcHisA se realizó una predicción de la masa molecular del fragmento junto con la etiqueta

de seis histidinas. Para esto se utilizó el servidor Expasy del Instituto de bioinformática suizo (<https://www.expasy.org/resources/compute-pi-mw>), donde el servidor dio como resultado que EspD_C presenta una masa molecular teórica de 17.57 kDa.

➤ Purificación de His-EspD_C mediante una cromatografía de afinidad.

Una vez purificado His-EspD_C de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos, se identificaron en las cuatro eluciones una proteína en peso aproximado de 25 kDa, lo cual entra en contraste con lo predicho por el servidor Expasy. Además, de esta proteína predominante también se observaron bandas por arriba de la marca de 25 kDa, esto puede indicar la presencia de formas oligoméricas de EspD_C. En las eluciones E3 y E4 se puede observar una banda con una masa molecular cercana a 15 kDa, esta banda podría ser la versión monomérica de EspD_C (Figura 22A). Las cuatro eluciones se juntaron, dializaron y concentraron (Figura 22B). Después se cuantificó la cantidad de proteína en la muestra, esta muestra se utilizó para la producción de un anticuerpo policlonal anti-EspD (Tabla 4).

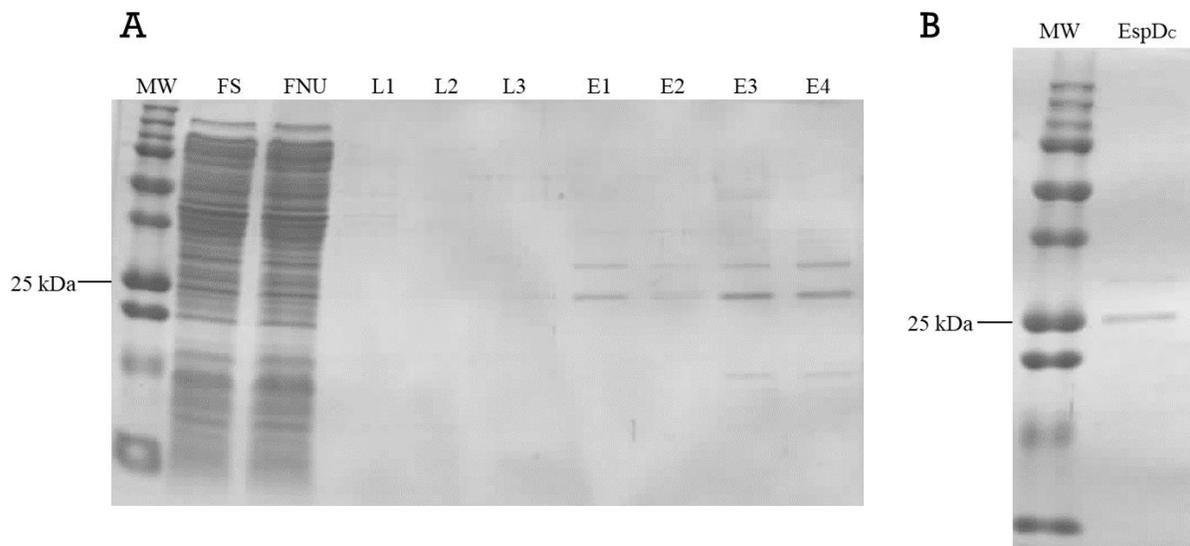


Figura 22. Purificación de His-EspD_C inducido en *Salmonella* SJW1368. A) Purificación de EspD_C mediante una resina acoplada a níquel. MW: peso molecular en kDa, FS: fracción soluble, FNU: fracción no unida, L1 – 3: lavados y E1 – 4:

eluciones con imidazol. B) Diálisis y concentración de las eluciones con EspDc purificado.

Para la segunda muestra utilizada en la producción del anticuerpo anti-EspD, se probó en la cepa BDP si se podían obtener mayores cantidades de proteína en comparación con la purificación de la proteína inducida en *Salmonella* (Figura 23). En la Figura 23 se puede observar que en las dos purificaciones se obtuvo una cantidad similar de proteína en las dos primeras eluciones de cada purificación, por lo tanto, no hubo una diferencia significativa en la inducción de la proteína en las diferentes cepas.

A través de la diálisis y concentración de las eluciones de His-EspDc inducido en las dos cepas se observó una única banda predominante con una masa molecular aproximada de 25 kDa (Figura 23C), esta muestra se cuantificó y se administró a un conejo (Tabla 4).

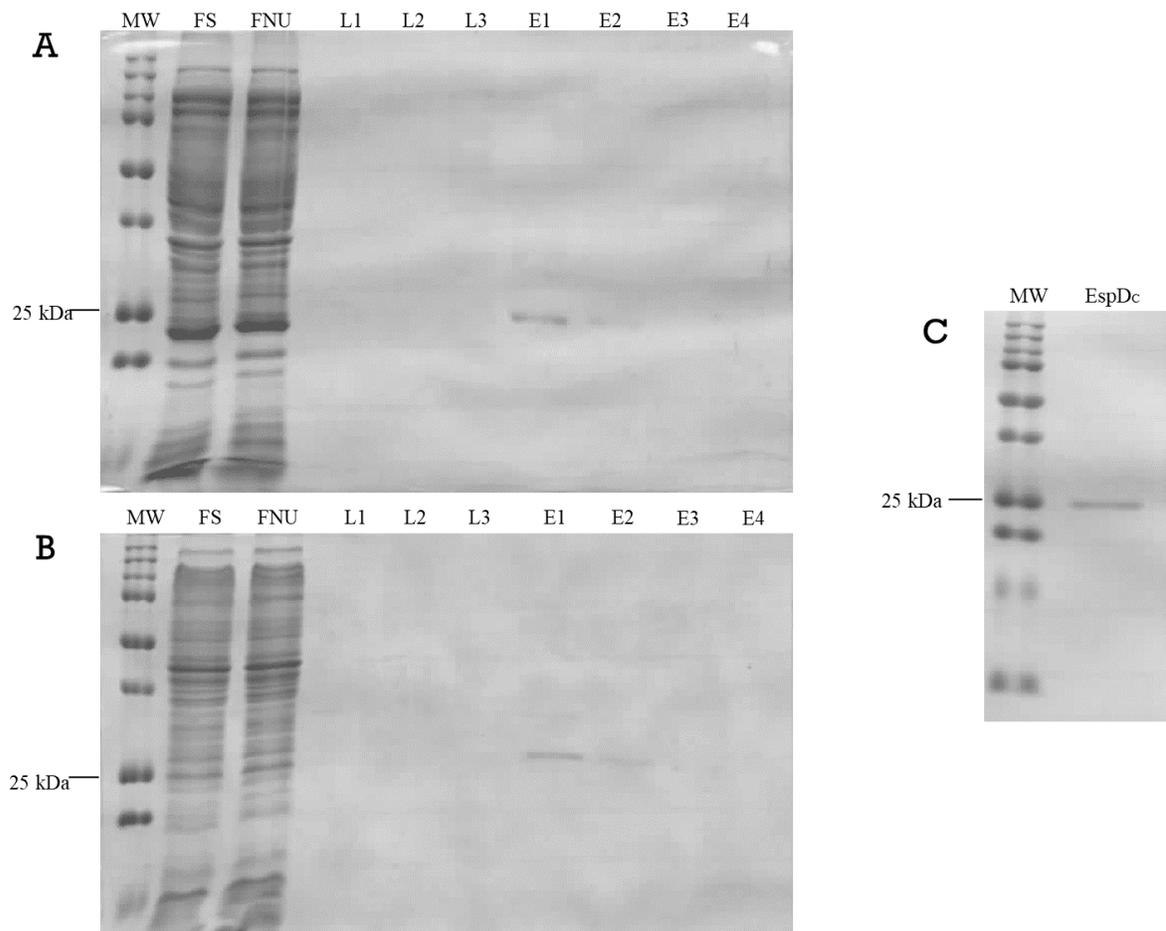


Figura 23. Purificación de EspD_c inducido en A) *E. coli* BL21 DE3 pLysS (BDP) y B) *Salmonella* SJW1368. C) Diálisis y concentración de las eluciones con EspD_c purificado.

➤ Inmunodetección de EspD con anticuerpo policlonal anti – EspD.

Se realizó un ensayo de secreción con las cepas EPEC silvestre (WT) y $\Delta espD$ donde las muestras del sobrenadante se utilizaron para determinar si el plasma obtenido del conejo inmunizado con His-EspD_c es capaz de detectar específicamente a la proteína completa EspD mediante un ensayo de inmunodetección tipo Western Blot. En la Figura 24A se observa que de hecho el plasma contiene anticuerpos que detectan proteínas inespecíficas con peso mayor a los 75 kDa y también, parece ser, que detecta a los translocadores EspD y EspB.

Para confirmar la capacidad inespecífica del plasma para detectar los translocadores, se decidió utilizar a la cepa $\Delta sepL$ la cual no secreta translocadores (Gaytán et al., 2018). De esta manera se realizó un ensayo de secreción con la cepa WT y $\Delta sepL$ en donde se observa que efectivamente el plasma detecta a las proteínas EspD y EspB y en la cepa $\Delta sepL$ ya no detecta a ningún translocador (Figura 24B).

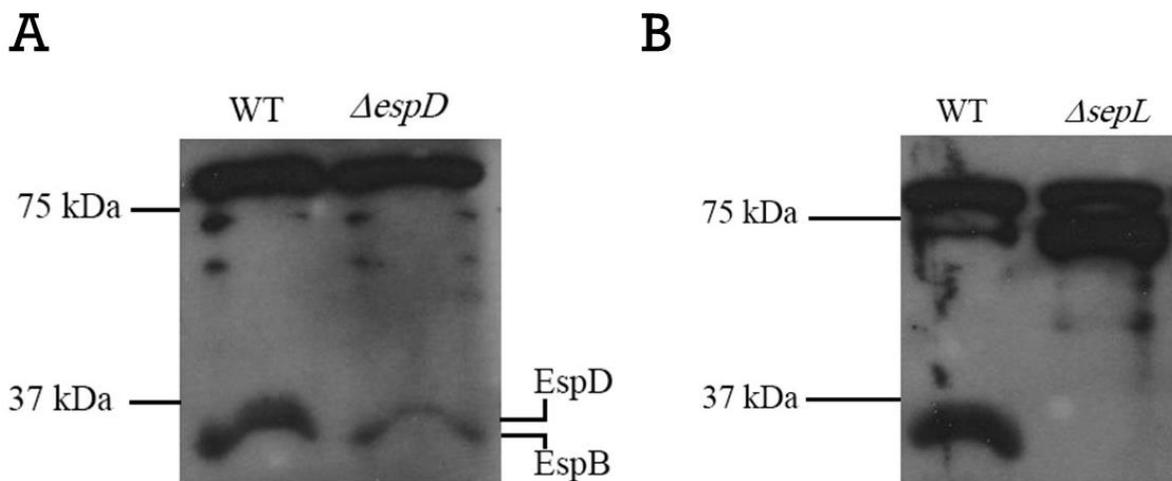


Figura 24. Inmunodetección de la proteína EspD a partir de un anticuerpo policlonal producido en conejo. A) Inmunodetección de la proteína EspD en muestras del sobrenadante de un ensayo de secreción de las cepas EPEC silvestre (WT) y

ΔespD. B) Inmunodetección de los translocadores en el sobrenadante de las cepas WT y *ΔsepL*.

Discusión

La entrega de sustratos al aparato de exportación del SST3 es un proceso complejo el cual todavía no se comprende en su totalidad. Principalmente se entiende que las chaperonas moleculares se encargan de dirigir los sustratos tempranos, intermedios y algunos efectores a la base del sistema (Wagner et al., 2018). Sin embargo, se ha observado en *Shigella flexneri* que existe una ruta de secreción de efectores independiente de las chaperonas moleculares donde la plataforma de clasificación podría ser quien esté involucrada en la entrega de estos sustratos a la base del sistema (Ernst et al., 2018).

La plataforma de clasificación de sustratos se denominó así debido a su capacidad de interaccionar de manera selectiva con los sustratos intermedios y tardíos, indicando que esta estructura es capaz de participar en la jerarquización en la secreción de sustratos en el SST3 de *Salmonella* (María Lara-Tejero et al., 2011). En concordancia con lo anterior, en *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* se observó que HrcQ (análogo funcional de EscQ) es capaz de interaccionar con diferentes efectores y con el sustrato temprano HrpB2 del sistema, permitiendo su entrega al aparato de exportación para su correcta secreción (Lorenz et al., 2012).

En el sistema flagelar se ha observado un mecanismo de entrega de sustratos en donde el complejo FliH₂-FliI (EscL₂-EscN) se forma en el citoplasma y es capaz de formar, junto con FliJ (EscO), un macrocomplejo con el complejo chaperona-sustrato, el cual permite la correcta entrega de los sustratos al aparato de exportación (Gonzalez-Pedrajo et al., 2002; Minamino et al., 2016). De esta manera, en el flagelo de *Salmonella* se propone que la entrega de sustratos a la base del sistema depende directamente de las interacciones cooperativas entre el complejo FliH₂-FliI, FliJ y el complejo chaperona/sustrato.

En el presente estudio se demostró que EscO es capaz de interaccionar con la proteína principal de la plataforma de clasificación EscQ *in vivo* mediante el ensayo

de doble híbrido en levadura (Figura 16), pero no con la proteína adaptadora EscK (Figura 15) ni con la chaperona CesT (Figura 14). Esto último puede ser ocasionado por la presencia de un falso negativo en la técnica, debido a que no se conoce si la unión del dominio de unión o de activación de GAL4 a la chaperona CesT esté afectando su plegamiento o su dimerización, ya que el dominio de dimerización podría estar involucrado en su interacción con EscO, o en la estabilidad de la proteína. Para el caso de la interacción entre EscO con EscK, se conoce por estudios previos del laboratorio que la proteína EscK es funcional en este sistema (Soto et al., 2017), esto permite pensar que este resultado no es un falso negativo. De tal manera, EscO estaría interaccionando con la plataforma de clasificación a través de su interacción con EscQ.

La interacción de las proteínas SctO-SctQ se ha reportado con anterioridad en el SST3 de virulencia de *Shigella flexneri* (Cherradi et al., 2014), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Drehkopf et al., 2020) y en el flagelo de *Salmonella* (Gonzalez-Pedrajo et al., 2006). Para el caso del sistema flagelar se propuso que la interacción entre FliJ con FliM (EscQ) promovía la entrega de complejos chaperona/sustrato específicos hacia el complejo FliI-FliH₂ preformado en el anillo-C (Gonzalez-Pedrajo et al., 2006). Lo anterior se propuso debido a que en ese entonces se consideraba a FliJ como una chaperona general de sustratos flagelares, después se demostró que éste no era el caso y que en realidad FliJ interacciona con chaperonas del sistema flagelar, que son FlgN y FliT, provocando un ciclo entre chaperonas vacías y complejos chaperona/sustrato en la base del sistema que promueve la secreción de sustratos minoritarios (Evans et al., 2006). Aun así, la función propuesta para la interacción FliJ-FliM no excluye este papel de FliJ, de esta manera el complejo FliJ-chaperona podría estar llegando al anillo-C a través de su interacción con FliM y entregando estos complejos al complejo FliI-FliH₂; en el caso de los sistemas de virulencia solo se ha reportado la interacción sin una posible función.

En el flagelo el anillo-C está conformado por tres proteínas FliG, FliM y FliN, en donde esta estructura actúa no solo como la parte central del rotor para la

generación de torque del flagelo, sino que también es un aparato estructural que permite el cambio en la dirección de la rotación del rotor. Además, se ha observado que el anillo-C es una estructura dinámica que permite el intercambio de subunidades de las proteínas que la componen (Nakamura & Minamino, 2019). Este proceso dinámico de intercambio de subunidades se ha observado también en la plataforma de clasificación en el SST3 de *Yersinia* (Diepold et al., 2017). En *Yersinia* se observó por fluorescencia que la formación del complejo de la plataforma de clasificación depende de la ATPasa YscN (EscN), de su regulador negativo YscL (EscL), de la proteína del anillo-C YscQ (EscQ) y de la proteína adaptadora YscK (EscK). Además, estas proteínas forman complejos dinámicos en el citoplasma que no están unidos al cuerpo basal del SST3 (Diepold et al., 2017).

Con base en lo descrito anteriormente se propone un modelo en el cual se incluye la interacción de EscO con EscQ descrita en este trabajo (Figura 16). En el primer paso (Figura 25) se encuentran libres en el citoplasma los complejos EscO-EscQ, EscQ-EscL₂-EscK, EscL₂-EscN y los complejos chaperona-sustrato, las proteínas mencionadas en estos complejos también se encuentran formando otros complejos entre ellas de manera cooperativa para la correcta secreción de sustratos, por lo tanto esta propuesta solo se enfoca en los cuatro complejos mencionados anteriormente (en este modelo los complejos chaperona-sustrato no se diferencian entre sustratos tempranos, intermedios o tardíos). Estas proteínas se encuentran en equilibrios dinámicos en donde se forman diferentes complejos proteicos de manera cooperativa, esto se ha observado por microscopía de fluorescencia con las proteínas YscQ (EscQ), YscK (EscK) y YscL (EscL) (Diepold et al., 2017; Rocha et al., 2018). En el citoplasma la interacción de EscL con EscN está encargada de evitar la formación del hexámero y así evitar la actividad hidrolítica que tiene EscN sobre el ATP, por esto mismo se propuso que era poco probable que EscO estuviera interaccionando con el complejo EscN-EscL en el citoplasma (Romo-Castillo et al., 2014). De esta manera, sugiero que el papel de la interacción entre EscO y EscQ en el citoplasma pudiera ser para evitar que EscO interaccione prematuramente con EscN. Como segundo paso, los complejos citoplasmáticos formarán la estructura conocida como la plataforma de clasificación donde se encuentra anclado el

complejo de la ATPasa. Por lo tanto, es probable que la interacción entre EscO con EscQ ya no esté presente en este complejo y ahora EscO estaría actuando como el tallo central de la ATPasa permitiendo la hexamerización de EscN y su actividad hidrolítica (Romo-Castillo et al., 2014). Lo anterior posiblemente se lleve a cabo a través de un equilibrio en el que la afinidad de EscO por EscN es mayor que EscO por EscQ que ya está ensamblado en la plataforma de clasificación, aquí hay que considerar que cuando EscQ está formando la plataforma de clasificación también está en complejo con EscK y con EscL, por lo que se puede pensar que el complejo EscQ-EscK-EscL modifica la afinidad de EscQ por EscO, donde ahora la afinidad de EscO por EscN es mayor. En la tercera etapa estos complejos se encuentran correctamente ensamblados en la base del SST3, por lo tanto, EscO estaría interaccionando con la región citoplasmática de EscV del aparato de exportación permitiendo que este complejo pase a ser un eficiente antiportador protón-proteína, como se ha propuesto en el flagelo de *Salmonella* y en el SST3 de *Chlamydia* (Jensen et al., 2020; Minamino et al., 2011). Una vez que el cuerpo basal y los componentes citoplasmáticos del SST3 están correctamente ensamblados y gracias a la capacidad de la plataforma de concentrar los sustratos (Soto et al., 2017) en la base del sistema, ahora se puede llevar a cabo la secreción de sustratos. Debido a que la plataforma de clasificación es un complejo altamente dinámico, este eventualmente se disociará (cuarta etapa) permitiendo que se formen nuevos complejos en el citoplasma y se inicie un nuevo ciclo de secreción de sustratos. Así todas estas proteínas estarían actuando de manera cooperativa para eficientizar la secreción de sustratos en el sistema de secreción tipo III en *Escherichia coli* enteropatógena.

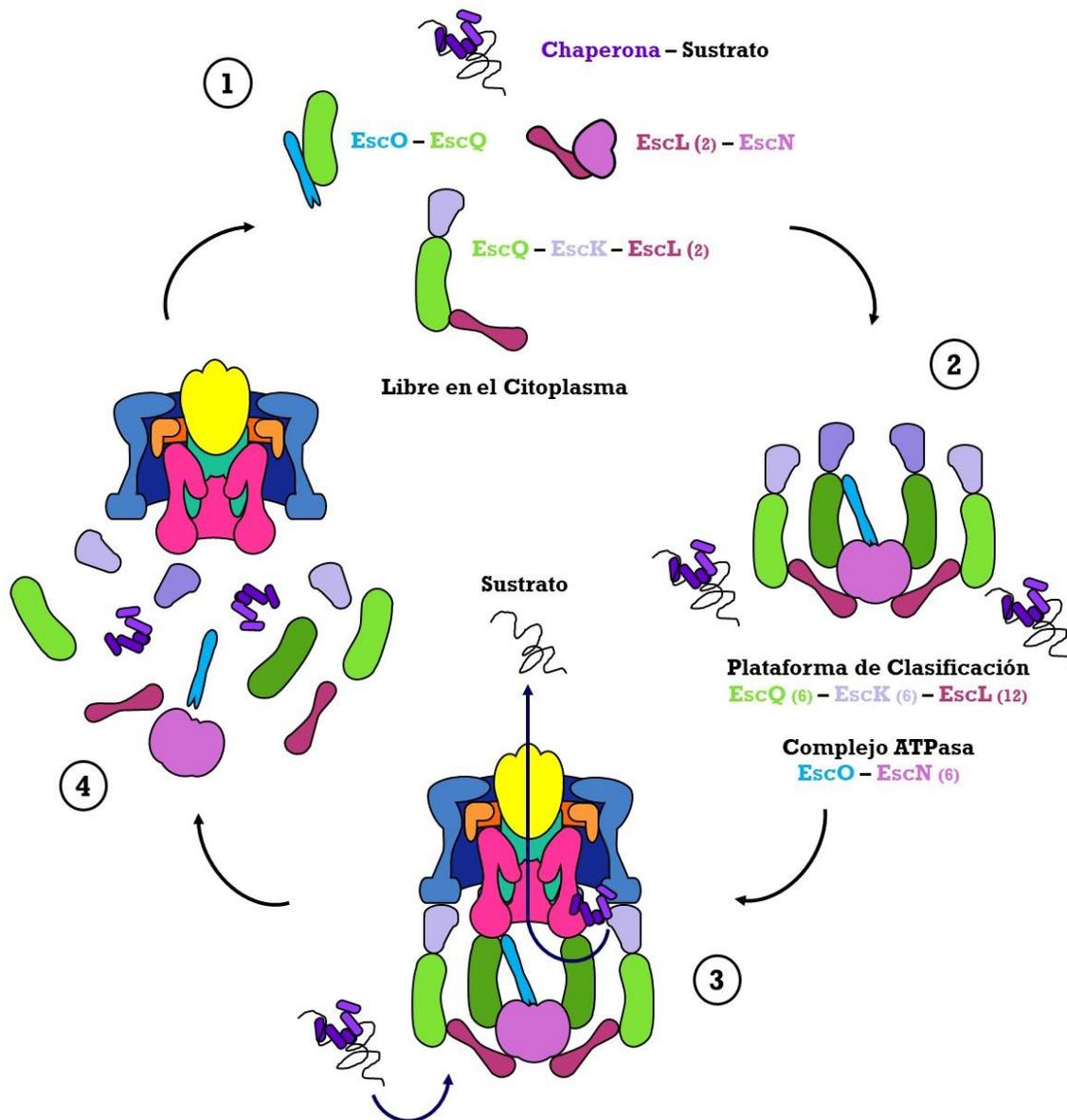


Figura 25. Modelo de secreción de sustratos mediado por componentes de la plataforma de clasificación y del complejo ATPasa.

En este estudio no se pudo determinar a través del ensayo de doble híbrido en levadura si la chaperona multi cargo de efectores, CesT, era capaz de interactuar con EscO, por lo tanto, no se incluyó en el modelo propuesto en este trabajo. Aun

así, como se mencionó anteriormente en los antecedentes, en los análogos funcionales de EscO se ha observado su capacidad de interactuar con diferentes chaperonas moleculares como es el caso de FliJ con las chaperonas FlgN y FliT (Bryant et al., 2021; Evans et al., 2006), Spa13 con IpgC (Cherradi et al., 2014), PscO con PcrG (Lee et al., 2014), YscO con SycD y SycT e Invl con SicA (Evans & Hughes, 2009). Debido a todas estas evidencias en los diferentes SST3 podemos concluir con un resultado negativo (Figura 14) que EscO no puede interactuar con la chaperona CesT, esto necesita confirmación mediante otros ensayos como por ejemplo ensayos de co-purificación tipo pull-down y el ensayo de doble híbrido en bacteria acoplado a la función de la adenilato ciclasa.

Para el caso de FliJ, como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que la interacción entre FliJ y las chaperonas FlgN y FliT forman un ciclo en la base del sistema capaz de promover la secreción de sustratos minoritarios, los cuales deben ser secretados antes que el sustrato mayoritario que es FliC (la flagelina). Esta propuesta viene de que FliJ puede interactuar con las chaperonas vacías y no así cuando FlgN y FliT están en complejo con sus respectivos sustratos y por qué FliJ es incapaz de interactuar con la chaperona de FliS, chaperona de la flagelina (Evans et al., 2006). Así, se propuso que FliJ interactúa con la chaperona vacía una vez que se haya secretado su sustrato y ahora FliJ se encarga de mantener a la chaperona en la base del sistema lista para interactuar con un nuevo sustrato y que éste sea secretado, siendo así un proceso de reciclamiento de chaperonas para facilitar la secreción de estos sustratos minoritarios (Bryant et al., 2021; Evans et al., 2006). Este mismo mecanismo se propuso para YscO, Invl y Spa13 (Cherradi et al., 2014; Evans & Hughes, 2009). En *P. aeruginosa* se observó que la proteína PscO y la chaperona de un sustrato intermedio, PcrG, eran capaces de interactuar entre ellas y que además presentaban un papel regulatorio en el uso de la FPM del aparato de exportación, lo que llevó a los autores a proponer hasta tres funciones para PscO, siendo éstas el ensamblaje de la ATPasa, facilitar la secreción dependiente de la FPM y el reciclamiento de chaperonas (Lee et al., 2014). Este papel regulatorio de la FPM por parte de PscO también se ha observado para FliJ (Bange et al., 2010; Ibuki et al., 2013; Minamino et al., 2011) en donde

recientemente se ha relacionado esta función con la del reciclamiento de chaperonas. Se propone que la interacción chaperona-FliJ es capaz de romper la interacción FliJ-FliA (SctV), lo que indica que el ciclo de chaperonas que se genera en la base del sistema no sólo promueve la secreción de ciertos sustratos si no que eficientiza el uso de la FPM al interrumpir la interacción FliJ-FliA, ya que esta interacción hace al aparato de exportación un eficiente antiportador protón-proteína, hasta que llegue un nuevo sustrato y se forme un nuevo complejo chaperona-sustrato y éste sea secretado; después, la chaperona vacía interacciona con FliJ y rompe la interacción FliJ-FliA, evitando que FliJ active al aparato de exportación, de forma que sólo se utilice la energía cuando hay sustrato disponible para ser secretado (Bryant et al., 2021).

Todo lo descrito anteriormente indica que la interacción de SctO con chaperonas juega un papel importante en la secreción de sustratos y en el uso eficiente de la energía para este proceso. Por lo tanto, es difícil pensar que EscO no está interaccionando con chaperonas en el SST3 de EPEC, en donde este patógeno cuenta con al menos siete chaperonas (CesT, CesF, CesD, CesD2, CesAB, EscG y EscE). En el caso de *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Shigella* se observó que SctO interacciona con una chaperona de sustratos intermedios (Cherradi et al., 2014; Evans & Hughes, 2009; Lee et al., 2014) por lo que también existe la posibilidad de que EscO esté interaccionando con una o más de las chaperonas de sustratos intermedios que son CesD, CesD2 y CesAB. También se observó que YscO además de interaccionar con la chaperona de sustratos intermedios podía interaccionar con una chaperona de un efector (Evans & Hughes, 2009), por lo que sigue siendo llamativo corroborar el resultado descrito en este estudio (Figura 14) y además determinar la capacidad de EscO de interaccionar con CesF (chaperona del efector EspF). Por último, se observó en EHEC que EscO es capaz de interaccionar con la chaperona de sustratos tempranos CesA2 (EscG) (Lin et al., 2014), por lo que es interesante determinar si EscO puede interaccionar con EscG y si también este proceso de reciclamiento de chaperonas involucra a sustratos tempranos en EPEC. De esta manera, la interacción de EscO con chaperonas es

una función que podría presentar esta proteína en EPEC y además jugar un papel importante en la secreción de sustratos.

Conclusiones

- La proteína EscO interacciona con la plataforma de clasificación mediante la formación del complejo EscO-EscQ en el citoplasma.
- La proteína EscO no interacciona con la proteína adaptadora EscK en el sistema de doble híbrido en levadura.
- La proteína EscO no interacciona con la proteína chaperona CestT en el sistema de doble híbrido en levadura.

Perspectivas

- Corroborar a través de ensayos *in vitro* como la co-purificación tipo pull-down que las proteínas EscO y EscQ interaccionen.
- Determinar a través de ensayos *in vitro* como la co-purificación tipo pull-down si EscO interacciona con EscK y con CestT.
- Corroborar los resultados del doble híbrido en levadura con un segundo ensayo *in vivo*, como podría ser el doble híbrido en bacteria.
- A través de una disección molecular de EscO encontrar regiones de interacción y residuos específicos involucrados en la interacción con EscQ.
- Determinar el efecto *in vivo* de la secreción de sustratos en EPEC cuando se elimina específicamente la interacción de EscO y EscQ para conocer la funcionalidad de dicha interacción.

Referencias

- Abby, S. S., & Rocha, E. P. C. (2012). The Non-Flagellar Type III Secretion System Evolved from the Bacterial Flagellum and Diversified into Host-Cell Adapted Systems. *PLoS Genetics*, 8(9), e1002983. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002983>
- Andrade, A., Pardo, J. P., Espinosa, N., Pérez-Hernández, G., & González-Pedrajo, B. (2007). Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 468(1), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.09.020>
- Bai, F., Morimoto, Y. V., Yoshimura, S. D. J., Hara, N., Kami-Ike, N., Namba, K., & Minamino, T. (2014). Assembly dynamics and the roles of Flil ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. *Scientific Reports*, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep06528>
- Bange, G., Kümmerer, N., Engel, C., Bozkurt, G., Wild, K., & Sinning, I. (2010). FlhA provides the adaptor for coordinated delivery of late flagella building blocks to the type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25), 11295–11300. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001383107>
- Barba, J., Bustamante, V. H., Flores-Valdez, M. A., Deng, W., Finlay, B. B., & Puente, J. L. (2005). A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *Journal of Bacteriology*, 187(23), 7918–7930. <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.7918-7930.2005>
- Bardiau, M., Szalo, M., & Mainil, J. G. (2010). Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Veterinary Research*, 41(5). <https://doi.org/10.1051/vetres/2010029>
- Bray, J. (1945). Isolation of Antigenically Homogeneous Strains of *Bact. coli* neapolitanum from Summer Diarrhoea of Infants. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 57(2), 239–247.
- Bray, J., & Beavan, T. E. D. (1948). Slide Agglutination of *Bacterium coli* var. neapolitanum in Summer Diarrhoea. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 60(3), 395–401.
- Bryant, O. J., Chung, B. Y.-W., & Fraser, G. M. (2021). Chaperone-mediated coupling of subunit availability to activation of flagellar Type III secretion. *Molecular Microbiology*, 116(2), 538–549. <https://doi.org/10.1111/MMI.14731>
- Buerger, I., Burkholder, P. R., & Mcveigh, I. (1942). Synthesis of vitamins by intestinal bacteria. *Nature*, 150(3810), 553. <https://doi.org/10.1073/PNAS.28.7.285>
- Burkinshaw, B. J., Deng, W., Lameignère, E., Wasney, G. A., Zhu, H., Worrall, L. J., Finlay, B. B., & Strynadka, N. C. J. (2015). Structural analysis of a specialized

- type III secretion system peptidoglycan-cleaving enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(16), 10406–10417. <https://doi.org/10.1074/JBC.M115.639013>
- Butan, C., Lara-Tejero, M., Li, W., Liu, J., & Galán, J. E. (2019). High-resolution view of the type III secretion export apparatus in situ reveals membrane remodeling and a secretion pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(49), 24786–24795. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916331116>
- Celli, J., Deng, W., & Finlay, B. B. (2000). Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cellular Microbiology*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00033.x>
- Chatterjee, A., Caballero-Franco, C., Bakker, D., Totten, S., & Jardim, A. (2015). Pore-forming activity of the Escherichia coli type III secretion system protein EspD. *Journal of Biological Chemistry*, 290(42), 25579–25594. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.648204>
- Chen, L., Ai, X., Portaliou, A. G., Minetti, C. A. S. A., Remeta, D. P., Economou, A., & Kalodimos, C. G. (2013). Substrate-Activated Conformational Switch on Chaperones Encodes a Targeting Signal in Type III Secretion. *Cell Reports*, 3(3), 709–715. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.025>
- Cherradi, Y., Hachani, A., & Allaoui, A. (2014). Spa13 of Shigella flexneri has a dual role: Chaperone escort and export gate-activator switch of the type III secretion system. *Microbiology (United Kingdom)*, 160(PART 1), 130–141. <https://doi.org/10.1099/mic.0.071712-0>
- Corinaldesi, R., Stanghellini, V., Barbara, G., Tomassetti, P., & de Giorgio, R. (2012). Clinical approach to diarrhea. In *Internal and Emergency Medicine* (Vol. 7, Issue SUPPL. 3, pp. 255–262). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11739-012-0827-4>
- Creasey, E. A., Friedberg, D., Shaw, R. K., Umanski, T., Knutton, S., Rosenshine, I., & Frankel, G. (2003). CesAB is an enteropathogenic Escherichia coli chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB. *Microbiology*, 149(12), 3639–3647. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.26735-0>
- Crepin, V. F., Prasannan, S., Shaw, R. K., Wilson, R. K., Creasey, E., Abe, C. M., Knutton, S., Frankel, G., & Matthews, S. (2005). Structural and functional studies of the enteropathogenic Escherichia coli type III needle complex protein EscJ. *Molecular Microbiology*, 55(6), 1658–1670. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04508.X>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 26, Issue 4, pp. 822–880). American Society for Microbiology Journals. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Deane, J. E., Roversi, P., Cordes, F. S., Johnson, S., Kenjale, R., Daniell, S., Booy,

- F., Picking, W. D., Picking, W. L., Blocker, A. J., & Lea, S. M. (2006). Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(33), 12529–12533. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0602689103>
- Deborah Chen, H., & Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: Unravelling pathogenesis. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 29, Issue 1, pp. 83–98). FEMS Microbiol Rev. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.07.002>
- Deng, W., Marshall, N. C., Rowland, J. L., McCoy, J. M., Worrall, L. J., Santos, A. S., Strynadka, N. C. J., & Finlay, B. B. (2017). Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nature Reviews. Microbiology*, *15*(6), 323–337. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.20>
- Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B. A., Vázquez, A., Barba, J., Ibarra, J. A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T., & Finlay, B. B. (2004). Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(10), 3597–3602. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400326101>
- Díaz-Guerrero, M., Gaytán, M. O., Soto, E., Espinosa, N., García-Gómez, E., Marcos-Vilchis, A., Andrade, A., & González-Pedrajo, B. (2021). CesI regulates type iii secretion substrate specificity of the enteropathogenic e. Coli injectisome. *Microorganisms*, *9*(5), 1047. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051047>
- Diepold, A., & Armitage, J. P. (2015). Type III secretion systems: The bacterial flagellum and the injectisome. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 370, Issue 1679). Royal Society of London. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0020>
- Diepold, A., Sezgin, E., Huseyin, M., Mortimer, T., Eggeling, C., & Armitage, J. P. (2017). A dynamic and adaptive network of cytosolic interactions governs protein export by the T3SS injectisome. *Nature Communications* *2017* *8*:1, *8*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS15940>
- Diepold, A., Wiesand, U., Amstutz, M., & Cornelis, G. R. (2012). Assembly of the *Yersinia* injectisome: the missing pieces. *Molecular Microbiology*, *85*(5), 878–892. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08146.x>
- Drehkopf, S., Otten, C., Hausner, J., Seifert, T., & Büttner, D. (2020). HrpB7 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is an essential component of the type III secretion system and shares features of HrpO/FliJ/YscO family members. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/cmi.13160>
- Elliott, S. J., Hutcheson, S. W., Dubois, M. S., Mellies, J. L., Wainwright, L. A., Batchelor, M., Frankel, G., Knutton, S., & Kaper, J. B. (1999). Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *33*(6), 1176–1189.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01559.x>

- Elliott, S. J., O'Connell, C. B., Koutsouris, A., Brinkley, C., Donnenberg, M. S., Hecht, G., & Kaper, J. B. (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. *Infection and Immunity*, *70*(5), 2271–2277. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2271-2277.2002>
- Ernst, N. H., Reeves, A. Z., Ramseyer, J. E., & Lesser, C. F. (2018). High-throughput screening of type III secretion determinants reveals a major chaperone-independent pathway. *MBio*, *9*(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01050-18>
- Evans, L. D. B., & Hughes, C. (2009). Selective binding of virulence type III export chaperones by FliJ escort orthologues Invl and YscO. *FEMS Microbiology Letters*, *293*(2), 292–297. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01535.x>
- Evans, L. D. B., Stafford, G. P., Ahmed, S., Fraser, G. M., & Hughes, C. (2006). An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(46), 17474–17479. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0605197103>
- Feria, J. M., García-Gómez, E., Espinosa, N., Minamino, T., Namba, K., & González-Pedrajo, B. (2012). Role of escp (Orf16) in Injectisome Biogenesis and Regulation of Type III Protein Secretion in Enteropathogenic *Escherichia coli*. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 194, Issue 22, pp. 6029–6045). American Society for Microbiology Journals. <https://doi.org/10.1128/JB.01215-12>
- Fraser, G. M., González-Pedrajo, B., Tame, J. R. H., & Macnab, R. M. (2003). Interactions of FliJ with the *Salmonella* type III flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology*, *185*(18), 5546–5554. <https://doi.org/10.1128/JB.185.18.5546-5554.2003>
- Furniss, R. C. D., & Clements, A. (2018). Regulation of the locus of enterocyte effacement in attaching and effacing pathogens. *Journal of Bacteriology*, *200*(2). <https://doi.org/10.1128/JB.00336-17>
- Galán, J. E. (2008). Energizing type III secretion machines: What is the fuel? In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 15, Issue 2, pp. 127–128). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nsmb0208-127>
- García-Gómez, E., Espinosa, N., Mora, J. de la, Dreyfus, G., & González-Pedrajo, B. (2011). The muramidase EtgA from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion. *Microbiology*, *157*(4), 1145–1160. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.045617-0>
- Gaytán, M. O., Martínez-Santos, V. I., Soto, E., & González-Pedrajo, B. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *6*, 129. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00129>
- Gaytán, M. O., Monjarás Feria, J., Soto, E., Espinosa, N., Benítez, J. M., Georgellis,

- D., & González-Pedrajo, B. (2018). Novel insights into the mechanism of SepL-mediated control of effector secretion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*, 7(3), e00571. <https://doi.org/10.1002/mbo3.571>
- Gazi, A. D., Bastaki, M., Charova, S. N., Gkoukoulia, E. A., Kapellios, E. A., Panopoulos, N. J., & Kokkinidis, M. (2008). Evidence for a coiled-coil interaction mode of disordered proteins from bacterial type III secretion systems. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 34062–34068. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803408200>
- Gonzalez-Pedrajo, B., Fraser, G. M., Minamino, T., & Macnab, R. M. (2002). Molecular dissection of Salmonella FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway. *Molecular Microbiology*, 45(4), 967–982. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03047.x>
- Gonzalez-Pedrajo, B., Minamino, T., Kihara, M., & Namba, K. (2006). Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. *Molecular Microbiology*, 60(4), 984–998. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05149.x>
- H W Moon, S C Whipp, R A Argenzio, M M Levine, R A Giannella. (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infection and Immunity*, 41(3), 1340–1351. <https://doi.org/10.1128/IAI.41.3.1340-1351.1983>
- Ibuki, T., Imada, K., Minamino, T., Kato, T., Miyata, T., & Namba, K. (2011). Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases. *Nature Publishing Group*, 18. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1977>
- Ibuki, T., Uchida, Y., Hironaka, Y., Namba, K., Imada, K., & Minamino, T. (2013). Interaction between FliJ and FliH, components of the bacterial flagellar type iii export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 466–473. <https://doi.org/10.1128/JB.01711-12>
- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberleithner, H., & Schmidt, M. A. (2001). Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 3(10), 669–679. <https://doi.org/10.1046/J.1462-5822.2001.00146.X>
- Iizumi, Y., Sagara, H., Kabe, Y., Azuma, M., Kume, K., Ogawa, M., Nagai, T., Gillespie, P. G., Sasakawa, C., & Handa, H. (2007). The Enteropathogenic *E. coli* Effector EspB Facilitates Microvillus Effacing and Antiphagocytosis by Inhibiting Myosin Function. *Cell Host & Microbe*, 2(6), 383–392. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2007.09.012>
- Imada, K., Minamino, T., Kinoshita, M., Furukawa, Y., & Namba, K. (2010). Structural insight into the regulatory mechanisms of interactions of the flagellar type III chaperone FliT with its binding partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8812–8817.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1001866107>

- Inoue, Y., Ogawa, Y., Kinoshita, M., Terahara, N., Shimada, M., Kodera, N., Ando, T., Namba, K., Kitao, A., Imada, K., & Minamino, T. (2019). Structural Insights into the Substrate Specificity Switch Mechanism of the Type III Protein Export Apparatus. *Structure*, 27(6), 965-976.e6. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.03.017>
- Izoré, T., Job, V., & Dessen, A. (2011). Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. In *Structure* (Vol. 19, Issue 5, pp. 603–612). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.015>
- Jarvis, K. G., Girón, J. A., Jerse, A. E., McDaniel, T. K., Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1995). Enteropathogenic Escherichia coli contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7996–8000. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.17.7996>
- Jensen, J. L., Yamini, S., Rietsch, A., & Spiller, B. W. (2020). “The structure of the Type III secretion system export gate with CdsO, an ATPase lever arm.” *PLOS Pathogens*, 16(10), e1008923. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008923>
- Jiménez, R., Cruz-Migoni, S. B., Huerta-Saquero, A., Bustamante, V. H., & Puente, J. L. (2010). Molecular characterization of GrlA, a specific positive regulator of ler expression in enteropathogenic Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 192(18), 4627–4642. <https://doi.org/10.1128/JB.00307-10>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology* 2004 2:2, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO818>
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M., & Finlay, B. B. (1997). Enteropathogenic Escherichia coli Protein Secretion Is Induced in Response to Conditions Similar to Those in the Gastrointestinal Tract. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 65, Issue 7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/pmc/articles/PMC175369/pdf/652606.pdf>
- Kotloff, K. L. (2017). *The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries*. *Pediatr Clin N Am*. <https://www.clinicalkey.com/#!/content/playContent/1-s2.0-S003139551730038X?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS003139551730038X%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https:%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F28734511-the-burden-and-etiology>
- Kuhlen, L., Abrusci, P., Johnson, S., Gault, J., Deme, J., Caesar, J., Dietsche, T., Mebrhatu, M. T., Ganief, T., Macek, B., Wagner, S., Robinson, C. V., & Lea, S. M. (2018). Structure of the core of the type iii secretion system export apparatus. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(7), 583–590. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0086-9>
- Lai, Y., Rosenshine, I., Leong, J. M., & Frankel, G. (2013). Intimate host attachment:

- Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 15(11), 1796–1808. <https://doi.org/10.1111/cmi.12179>
- Lara-Tejero, Maria, & Galán, J. E. (2019). The Injectisome, a Complex Nanomachine for Protein Injection into Mammalian Cells. *EcoSalPlus*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0039-2018>
- Lara-Tejero, María, Kato, J., Wagner, S., Liu, X., & Galán, J. E. (2011). A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science*, 331(6021), 1188–1191. <https://doi.org/10.1126/science.1201476>
- Lee, P. C., Zmina, S. E., Stopford, C. M., Toska, J., & Rietsch, A. (2014). Control of type III secretion activity and substrate specificity by the cytoplasmic regulator PcrG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(19), E2027–E2036. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402658111>
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 3–32. https://doi.org/10.1007/82_2012_303
- Lin, C.-N., Sun, W.-S. W., Lu, H.-Y., Ng, S.-C., Liao, Y.-S., & Syu, W.-J. (2014). Protein Interactions and Regulation of EscA in Enterohemorrhagic *E. coli*. *PLoS ONE*, 9(1), e85354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085354>
- Lorenz, C., Hausner, J., & Büttner, D. (2012). HrcQ Provides a Docking Site for Early and Late Type III Secretion Substrates from *Xanthomonas*. *PLoS ONE*, 7(11), 51063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051063>
- Lorenzini, E., Singer, A., Singh, B., Lam, R., Skarina, T., Chirgadze, N. Y., Savchenko, A., & Gupta, R. S. (2010). Structure and protein-protein interaction studies on *Chlamydia trachomatis* protein CT670 (YscO homolog). *Journal of Bacteriology*, 192(11), 2746–2756. <https://doi.org/10.1128/JB.01479-09>
- Lyons, B. J. E., Atkinson, C. E., Deng, W., Serapio-Palacios, A., Finlay, B. B., & Strynadka, N. C. J. (2021). Cryo-EM structure of the EspA filament from enteropathogenic *Escherichia coli*: Revealing the mechanism of effector translocation in the T3SS. *Structure*, 29(5), 479-487.e4. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2020.12.009>
- Majewski, D. D., Lyons, B. J. E., Atkinson, C. E., & Strynadka, N. C. J. (2020). Cryo-EM analysis of the SctV cytosolic domain from the enteropathogenic *E. coli* T3SS injectisome. *Journal of Structural Biology*, 212(3), 107660. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107660>
- Majewski, D. D., Worrall, L. J., Hong, C., Atkinson, C. E., Vuckovic, M., Watanabe, N., Yu, Z., & Strynadka, N. C. J. (2019). Cryo-EM structure of the homohexameric T3SS ATPase-central stalk complex reveals rotary ATPase-like asymmetry. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08477-7>
- Mellies, J. L., Elliott, S. J., Sperandio, V., Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (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). *Molecular Microbiology*, 33(2), 296–306. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1999.01473.X>
- Mills, E., Baruch, K., Aviv, G., Nitzan, M., & Rosenshine, I. (2013). Dynamics of the type III secretion system activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *MBio*, 4(4). https://doi.org/10.1128/MBIO.00303-13/SUPPL_FILE/MBO004131579S1.DOCX
- Minamino, T., Chu, R., Yamaguchi, S., & Macnab, R. M. (2000). Role of FliJ in flagellar protein export in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 182(15), 4207–4215. <https://doi.org/10.1128/JB.182.15.4207-4215.2000>
- Minamino, T., Kinoshita, M., Hara, N., Takeuchi, S., Hida, A., Koya, S., Glenwright, H., Imada, K., Aldridge, P. D., & Namba, K. (2012). Interaction of a bacterial flagellar chaperone FlgN with FliA is required for efficient export of its cognate substrates. *Molecular Microbiology*, 83(4), 775–788. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07964.x>
- Minamino, T., Kinoshita, M., Inoue, Y., Morimoto, Y. V., Ihara, K., Koya, S., Hara, N., Nishioka, N., Kojima, S., Homma, M., & Namba, K. (2016). FliH and FliI ensure efficient energy coupling of flagellar type III protein export in *Salmonella*. *MicrobiologyOpen*, 5(3), 424–435. <https://doi.org/10.1002/mbo3.340>
- Minamino, T., & Macnab, R. M. (2000). Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Molecular Microbiology*, 35(5), 1052–1064. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01771.x>
- Minamino, T., Morimoto, Y. V., Hara, N., & Namba, K. (2011). An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. *Nature Communications*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms1488>
- Minamino, T., Tame, J. R. H., Namba, K., & Macnab, R. M. (2001). Proteolytic analysis of the FliH/FliI complex, the ATPase component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*. *Journal of Molecular Biology*, 312(5), 1027–1036. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5000>
- Mukerjea, R., & Ghosh, P. (2013). Functionally essential interaction between *Yersinia* YscO and the T3S4 domain of YscP. *Journal of Bacteriology*, 195(20), 4631–4638. <https://doi.org/10.1128/JB.00876-13>
- Nakamura, S., & Minamino, T. (2019). Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules* 2019, Vol. 9, Page 279, 9(7), 279. <https://doi.org/10.3390/BIOM9070279>
- Neter, E. ; Westphal, O. ; Lüderitz, O. ; Gino, Rosalie M. ; Gorzynski, E. A. (1955). *Demonstration of Antibodies against Enteropathogenic Escherichia coli in Sera of Children of Various Ages.* Pediatrics. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19562701741>

- Neves, B. C., Mundy, R., Petrovska, L., Dougan, G., Knutton, S., & Frankel, G. (2003). CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD. *Infection and Immunity*, *71*(4), 2130–2141. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2130-2141.2003>
- Padavannil, A., Jobichen, C., Mills, E., Velazquez-Campoy, A., Li, M., Leung, K. Y., Mok, Y. K., Rosenshine, I., & Sivaraman, J. (2013). Structure of GrIR–GrIA complex that prevents GrIA activation of virulence genes. *Nature Communications* *2013* *4*:1, *4*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS3546>
- Page, A. L., & Parsot, C. (2002). Chaperones of the type III secretion pathway: Jacks of all trades. In *Molecular Microbiology* (Vol. 46, Issue 1, pp. 1–11). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03138.x>
- Pallen, M. J., Bailey, C. M., & Beatson, S. A. (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 Science*, *15*(4), 935–941. <https://doi.org/10.1110/PS.051958806>
- Parsot, C., Hamiaux, C., & Page, A. L. (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 6, Issue 1, pp. 7–14). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00002-4)
- Patzi-Vargas, S., Zaidi, M. B., Perez-Martinez, I., León–Cen, M., Michel-Ayala, A., Chaussabel, D., & Estrada-Garcia, T. (2015). Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *9*(3), e0003510. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003510>
- Payne, P. L., & Straley, S. C. (1998). YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *Journal of Bacteriology*, *180*(15), 3882–3890. <https://doi.org/10.1128/jb.180.15.3882-3890.1998>
- Payne, P. L., & Straley, S. C. (1999). YscP of *Yersinia pestis* is a secreted component of the Yop secretion system. *Journal of Bacteriology*, *181*(9), 2852–2862. <https://doi.org/10.1128/jb.181.9.2852-2862.1999>
- Pearson, J. S., Giogha, C., Wong Fok Lung, T., & Hartland, E. L. (2016). The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. *Annual Review of Genetics*, *50*(1), 493–513. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035138>
- Platenkamp, A., & Mellies, J. L. (2018). Environment Controls LEE Regulation in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1694. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01694>
- Portaliou, A. G., Tsolis, K. C., Loos, M. S., Balabanidou, V., Rayo, J., Tsirigotaki, A., Crepin, V. F., Frankel, G., Kalodimos, C. G., Karamanou, S., & Economou, A. (2017). Hierarchical protein targeting and secretion is controlled by an affinity switch in the type III secretion system of enteropathogenic

- Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 36(23), 3517–3531. <https://doi.org/10.15252/emboj.201797515>
- Poyraz, Ö., Schmidt, H., Seidel, K., Delissen, F., Ader, C., Tenenboim, H., Goosmann, C., Laube, B., Thünemann, A. F., Zychlinsky, A., Baldus, M., Lange, A., Griesinger, C., & Kolbe, M. (2010). Protein refolding is required for assembly of the type three secretion needle. *Nature Structural & Molecular Biology* 2010 17:7, 17(7), 788–792. <https://doi.org/10.1038/NSMB.1822>
- Quinaud, M., Plé, S., Job, V., Contreras-Martel, C., Simorre, J. P., Attree, I., & Dessen, A. (2007). Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 7803–7808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610098104>
- Riordan, K. E., & Schneewind, O. (2008). YscU cleavage and the assembly of *Yersinia* type III secretion machine complexes. *Molecular Microbiology*, 68(6), 1485–1501. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06247.x>
- Riordan, K. E., Sorg, J. A., Beruhe, B. J., & Schneewind, O. (2008). Impassable YscP substrates and their impact on the *Yersinia enterocolitica* type III secretion pathway. *Journal of Bacteriology*, 190(18), 6204–6216. <https://doi.org/10.1128/JB.00467-08>
- Rocha, J. M., Richardson, C. J., Zhang, M., Darch, C. M., Cai, E., Diepold, A., & Gahlmann, A. (2018). Single-molecule tracking in live *Yersinia enterocolitica* reveals distinct cytosolic complexes of injectisome subunits. *Integrative Biology*, 10(9), 502–515. <https://doi.org/10.1039/C8IB00075A>
- Romo-Castillo, M., Andrade, A., Espinosa, N., Monjarás Feria, J., Soto, E., Díaz-Guerrero, M., & González-Pedrajo, B. (2014). EscO, a functional and structural analog of the flagellar FliJ protein, is a positive regulator of EscN ATPase activity of the enteropathogenic *Escherichia coli* injectisome. *Journal of Bacteriology*, 196(12), 2227–2241. <https://doi.org/10.1128/JB.01551-14>
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Stein, M., Reinscheid, D. J., Mills, S. D., & Finlay, B. B. (1996). A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *The EMBO Journal*, 15(11), 2613–2624. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1996.TB00621.X>
- Sal-Man, N., Biemans-Oldehinkel, E., Sharon, D., Croxen, M. A., Scholz, R., Foster, L. J., & Finlay, B. B. (2012). EscA is a crucial component of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194(11), 2819–2828. <https://doi.org/10.1128/JB.00103-12>
- Sal-Man, N., Setiাপutra, D., Scholz, R., Deng, W., Yu, A. C. Y., Strynadka, N. C. J., & Finlay, B. B. (2013). EscE and EscG are cochaperones for the type III needle protein EscF of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 195(11), 2481–2489. <https://doi.org/10.1128/JB.00118-13>

- Santos, A. S., & Finlay, B. B. (2015). Bringing down the host: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effector-mediated subversion of host innate immune pathways. *Cellular Microbiology*, 17(3), 318–332. <https://doi.org/10.1111/CMI.12412>
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C., & Abe, A. (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11638–11643. <https://doi.org/10.1073/pnas.191378598>
- Serapio-Palacios, A., & Finlay, B. B. (2020). Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 54, pp. 67–76). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.12.001>
- Soto, E., Espinosa, N., Díaz-Guerrero, M., Gaytán, M. O., Puente, J. L., & González-Pedrajo, B. (2017). Functional characterization of EscK (Orf4), a sorting platform component of the enteropathogenic *Escherichia coli* injectisome. *Journal of Bacteriology*, 199(1). <https://doi.org/10.1128/JB.00538-16>
- Sun, P., Tropea, J. E., Austin, B. P., Cherry, S., & Waugh, D. S. (2008). Structural Characterization of the *Yersinia pestis* Type III Secretion System Needle Protein YscF in Complex with Its Heterodimeric Chaperone YscE/YscG. *Journal of Molecular Biology*, 377(3), 819–830. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.067>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). *The population genetics of commensal Escherichia coli*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
- Terashima, H., & Imada, K. (2018). Novel insight into an energy transduction mechanism of the bacterial flagellar type III protein export. *Biophysics and Physicobiology*, 15(0), 173–178. https://doi.org/10.2142/biophysico.15.0_173
- Thomas, D. R., Francis, N. R., Xu, C., & DeRosier, D. J. (2006). The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7039–7048. <https://doi.org/10.1128/JB.00552-06>
- Thomas, N. A., Deng, W., Puente, J. L., Frey, E. A., Yip, C. K., Strynadka, N. C. J., & Finlay, B. B. (2005). CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 57(6), 1762–1779. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04802.x>
- Wagner, S., & Diepold, A. (2020). A unified nomenclature for injectisome-type type III secretion systems. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 427, pp. 1–10). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/82_2020_210
- Wagner, S., Grin, I., Malmsheimer, S., Singh, N., Torres-Vargas, C. E., & Westerhausen, S. (2018). Bacterial type III secretion systems: A complex device

- for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. *FEMS Microbiology Letters*, 365(19). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny201>
- Wainwright, L. A., & Kaper, J. B. (1998). EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 27(6), 1247–1260. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00771.x>
- Wilson, R. K., Shaw, R. K., Daniell, S., Knutton, S., & Frankel, G. (2001). Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 3(11), 753–762. <https://doi.org/10.1046/J.1462-5822.2001.00159.X>
- Worrall, L. J., Hong, C., Vuckovic, M., Deng, W., Bergeron, J. R. C., Majewski, D. D., Huang, R. K., Spreter, T., Finlay, B. B., Yu, Z., & Strynadka, N. C. J. (2016). Near-atomic-resolution cryo-EM analysis of the *Salmonella* T3S injectisome basal body. *Nature* 2016 540:7634, 540(7634), 597–601. <https://doi.org/10.1038/NATURE20576>
- Yip, C. K., Finlay, B. B., & Strynadka, N. C. J. (2004). Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nature Structural & Molecular Biology* 2004 12:1, 12(1), 75–81. <https://doi.org/10.1038/NSMB879>
- Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Brett Finlay, B., Miller, S. I., & Strynadka, N. C. J. (2005). Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* 2005 435:7042, 435(7042), 702–707. <https://doi.org/10.1038/NATURE03554>
- Younis, R., Bingle, L. E. H., Rollauer, S., Munera, D., Busby, S. J., Johnson, S., Deane, J. E., Lea, S. M., Frankel, G., & Pallen, M. J. (2010). SepL resembles an aberrant effector in binding to a class 1 type III secretion chaperone and carrying an N-terminal secretion signal. *Journal of Bacteriology*, 192(22), 6093–6098. <https://doi.org/10.1128/JB.00760-10>
- Zarivach, R., Vuckovic, M., Deng, W., Finlay, B. B., & Strynadka, N. C. J. (2007). Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nature Structural & Molecular Biology* 2007 14:2, 14(2), 131–137. <https://doi.org/10.1038/NSMB1196>
- Zhang, L., Wang, Y., Picking, W. L., Picking, W. D., & De Guzman, R. N. (2006). Solution Structure of Monomeric BsaL, the Type III Secretion Needle Protein of *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Molecular Biology*, 359(2), 322–330. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2006.03.028>
- Zilkenat, S., Franz-Wachtel, M., Stierhof, Y.-D., Galán, J. E., Macek, B., & Wagner, S. (2016). Determination of the Stoichiometry of the Complete Bacterial Type III Secretion Needle Complex Using a Combined Quantitative Proteomic Approach. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 15(5), 1598.

<https://doi.org/10.1074/MCP.M115.056598>